

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



---

**Maestría en Ciencias  
en Ciencias de la Vida  
con orientación en Microbiología Celular y Molecular**

---

**Selección y caracterización de nanoanticuerpos  
de camélidos Anti-CDH11**

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

Presenta:

**Iván Andrés Rosales Fuerte.**

Ensenada, Baja California, México  
2020

Tesis defendida por  
**Iván Andrés Rosales Fuerte**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dr. Rubén Darío Cadena Nava**  
Director de tesis

Miembros del comité  
**Dr. Alexei Federovish Licea Navarro**

**Dr. Andrés Zarate Romero**

**Dr. Israel Marck Martínez Pérez**



---

**Dra. Patricia Juárez Camacho**  
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

*Iván Andrés Rosales Fuerte © 2020*

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

Resumen de la tesis que presenta **Iván Andrés Rosales Fuerte** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología Celular y Molecular.

### **Selección y caracterización de nanoanticuerpos de camélidos anti-CDH11**

Resumen aprobado por:

---

Dr. Rubén Darío Cadena Nava  
**Director de tesis**

Las cadherinas son moléculas de adhesión fundamentales para el correcto funcionamiento de las células eucariotas. Además, las cadherinas están involucradas en la adhesión celular, son relevantes para diversas vías de señalización celular, promoviendo características como migración, crecimiento y diferenciación celular. Así mismo, la cadherina-11 (CDH11), esta sobre expresada en diversas patologías tales como artritis reumatoide y algunos cánceres epiteliales cuando se vuelven metastásicos. Es por esto, que en este trabajo se propone la selección de un dominio VHH (nanoanticuerpo) específico para el ectodominio 1 de la cadherina 11. (CDH11-EC1). El método de selección fue realizado por medio del despliegue en fagos, obteniendo bacteriófagos recombinantes con el dominio VHH contra la CDH1-EC1. Para la obtención de los bacteriófagos recombinantes, después de la inmunización de las llamas se generó una biblioteca inmune de  $\approx 10^7$  transformantes. Posteriormente, después de tres rondas de selección y pruebas de ELISA, se obtuvieron los bacteriófagos recombinantes capaces de reconocer al CDH11-EC1. De igual manera, se realizaron ensayos en la línea celular MDA-MB-231, la cual expresa CDH11. Estos resultados muestran que los bacteriófagos recombinantes son capaces de reconocer a la CDH11 en esta línea celular, con lo cual se demuestra la correcta selección del nanoanticuerpo anti-CDH11.

**Palabras clave:** Nanoanticuerpo, Cadherina-11, Despliegue en fagos, Dominio VHH.

Abstract of the thesis presented by **Iván Andrés Rosales Fuerte** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Cellular and Molecular Microbiology

### **Selection and characterization of camelids anti-CDH11 Nanobodies**

Abstract approved by:

---

Dr. Rubén Darío Cadena Nava  
Thesis Director

Cadherins are fundamental adhesion molecules for the correct functioning of eukaryotic cells. In addition, the cadherins are involved in cell adhesion, cell signaling pathways, and these are involved in migration, growth and cell differentiation. Likewise, cadherin-11 (CDH11) is overexpressed in various pathologies such as rheumatoid arthritis and some epithelial cancerous cells when they become metastatic. Therefore, in this work, the selection of a VHH domain (nanoantibody) specified for ectodomain 1 of cadherin 11 (CDH11-EC1) is proposed. The selection method was performed through phage display, obtaining recombinant bacteriophages with the VHH domain against CDH1-EC1. To obtain the recombinant bacteriophages, after the llama immunization, an immune library of  $\approx 10^7$  transformants was generated. Subsequently, after three rounds of ELISA selection and testing, the recombinant bacteriophages capable of recognizing CDH11-EC1 were obtained. Similarly, recombinant phages CDH11 were tested on the MDA-MB-231 cell line, which expresses CDH11. These results showed that recombinant bacteriophages are capable of recognizing CDH11 in this cell line, thereby demonstrating the correct selection of the anti-CDH11 nanoantibody.

**Keywords:** Nanobody, Cadherin-11, Phage Display, VHH Domain

## **Dedicatoria**

A todos mis seres queridos, con cariño especial a mi Mamá. Y a todos los que se fueron antes en el camino (Papá y Abuela).

“Brindemos por los que están aquí ahora; brindemos por los que hemos perdido en el camino”

## Agradecimientos

Es importante agradecer principalmente a la institución CICESE por abrirme sus puertas al permitirme estudiar un posgrado. De igual manera, agradezco a la UNAM, principalmente al departamento de Bionanotecnología por permitirme formar parte en el equipo de investigación. De igual manera, agradezco al CONACyT por permitirme estudiar el posgrado con el apoyo económico para ser estudiante de tiempo completo. También agradezco al proyecto CONACyT CB 239878, porque fue el que financió los recursos para el proyecto realizado.

Agradezco de manera inmensurable al Dr. Rubén Cadena por guiarme y apoyarme de manera académica y personalmente durante estos dos años de ardua labor, gracias por confiar en mí. Agradezco al Dr. Andrés Zarate por estar siempre presente y disponible para cualquier duda surgida durante las horas de trabajo en el laboratorio. Agradezco al Dr. Alexei por el apoyo inmediato cuando surgían dudas en todo lo relacionado con la técnica de despliegue en fagos. Y agradezco al Dr. Israel Martínez por su tiempo y disposición durante todo el tiempo del proyecto.

Agradezco a todos los que son y fueron miembros del Departamento de Bionanotecnología del CNyN (Carlos, Eduardo, Alegría, José, Kendra, Oscar, Gaby, Isamara, Carmen, por mencionar algunos), ya que de ellos aprendí que todo momento de estrés y desesperación puede convertirse en un momento agradable y ameno. De igual manera, agradezco a la Mtra. Itandehui Betanzo, ya que a su labor excepcional en la compra de reactivos fue posible llegar a concluir mi trabajo. De igual manera, quiero agradecer a la Dra. Rosa Mouriño y, en especial, al Mtro Fausto Villascencio. Ya que gracias a su conocimiento y experiencia me ayudaron a salir en un “bache” académico que tuve por meses (Biología molecular). Sin ellos el trabajo sería muy incompleto. De igual manera agradezco al Dr. Estefano por el apoyo durante la técnica de despliegue en fagos, así como a la Dra. Ana Rodríguez por su ayuda en los experimentos de fluorescencia confocal.

Finalmente, agradezco de manera infinita a mi **Mamá**, ya que ha soportado martirios y sacrificado muchas cosas, con tal en que yo cumpla mis sueños. Espero poder, algún día, pagarte todo lo que has hecho por mi (es una deuda que nunca podré pagar).

Agradezco a mis amigos que formé a lo largo de mi estadía en Ensenada, entre ellos: Mario, Daryl, Rafa, y en especial a Doña Karla, así como a mis amigos de mi ciudad natal, entre ellos: Diego, Marco, Daniel, Humberto, Miguel y Javier. Los considero amigos para toda la vida. Y para finalizar te agradezco Cassandra, por aguantarme y seguir apoyando con amor y cariño.

## Tabla de contenido

	<b>Página</b>
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xi
<b>Capítulo 1. Introducción</b>	
1.1 Antecedentes.....	<b>1</b>
1.1.1 Moléculas de adhesión celular (CAM's).....	<b>1</b>
1.1.2 Cadherina-11, el significado de su sobreexpresión.....	<b>7</b>
1.1.3 Inmunoterapia: anticuerpos monoclonales y sus derivaciones monoclonales.....	<b>11</b>
1.1.4 Nanoanticuerpos, otra posible alternativa.....	<b>14</b>
1.1.5 Despliegue en fagos (Phage Display).....	<b>17</b>
1.2 Justificación.....	<b>22</b>
1.3 Hipótesis.....	<b>22</b>
1.4 Objetivos.....	<b>22</b>
1.4.1 Objetivo general .....	<b>22</b>
1.4.2 Objetivos específicos.....	<b>23</b>
<b>Capítulo 2. Metodología</b>	
2.1 Inmunización del espécimen.....	<b>24</b>
2.1.1 Obtención de linfocitos.....	<b>24</b>
2.2 Generación de la biblioteca inmune.....	<b>25</b>
2.2.1 Extracción de ARN total.....	<b>25</b>
2.2.2 Síntesis de ADNc.....	<b>26</b>
2.2.3 Diseño de oligonucleótidos para amplificación del fragmento VHH.....	<b>26</b>
2.2.4 Amplificación del fragmento VHH mediante la técnica de PCR anidado.....	<b>27</b>
2.2.4.1 PCR anidado con oligonucleótidos CALL001 y CALL002.....	<b>27</b>
2.2.4.2 PCR VHHBACK- <i>Sfil</i> y VHHFOR- <i>Sfil</i> .....	<b>28</b>
2.2.5 Digestión del fagémido pComb3XSS y fragmento VHH.....	<b>29</b>

2.2.5.1 Digestión del fagémido pComb3XSS.....	29
2.2.5.2 Digestión del gen VHH- <i>Sfil</i> .....	29
2.2.6 Ligación del fagémido pComb3XSS y fragmento VHH a pequeña escala.....	30
2.2.7 Clonación en células competentes 5 $\alpha$ F.....	31
2.2.8 PCR de colonia.....	31
2.2.9 Ligación del fagémido pComb3XSS y el fragmento VHH a gran escala.....	32
2.3 Expresión del dominio VHH en bacteriófagos mediante la técnica de despliegue en fagos.....	33
2.3.1 Amplificación del bacteriófago ayudador VCM13.....	33
2.3.2 Amplificación a partir de la biblioteca inmune.....	34
2.3.3 Rondas de selección.....	34
2.3.4 Titulación de los bacteriófagos recombinantes.....	35
2.3.5 Cuantificación de los bacteriófagos recombinantes.....	35
2.3.6 Ensayo ELISA de los bacteriófagos recombinantes.....	36
2.4 Evaluación del bacteriófago recombinante contra las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7.....	37
2.4.1 Ensayo de inmunofluorescencia de los bacteriófagos recombinantes.....	37
2.4.2 Ensayo de viabilidad celular de los bacteriófagos recombinantes en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7.....	38

### Capítulo 3. Resultados

3.1 Extracción de ARN total a partir de los linfocitos purificados.....	39
3.2 Síntesis del ADNc.....	39
3.3 Diseño de oligonucleótidos para amplificación del fragmento VHH.....	39
3.4 Amplificación del fragmento VHH mediante la técnica de PCR anidado.....	40
3.4.1 Amplificación del fragmento hcAb.....	41
3.4.2 Amplificación del fragmento VHH.....	42
3.5 Digestión del fagémido pComb3XSS y fragmento VHH.....	43
3.5.1 Digestión del fagémido pComb3XSS.....	43
3.5.2 Digestión del fragmento VHH.....	44
3.6 Ligación del fagémido pComb3XSS y el fragmento VHH a pequeña escala.....	44
3.7 Clonación en células competentes 5 $\alpha$ F' .....	45
3.8 PCR de colonia.....	46
3.9 Rescate y amplificación del bacteriófago recombinante usando la biblioteca inmune.....	47
3.10 Titulación de los bacteriófagos recombinantes ( $R_0$ ).....	48
3.11 Amplificación del bacteriófago ayudador VCM13.....	49

3.12	Rondas de selección.....	49
3.12.1	Ensayo ELISA de los bacteriófagos recombinantes.....	50
3.13	Evaluación del bacteriófago recombinante contra las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7.....	51
3.13.1	Ensayo de inmunofluorescencia de los bacteriófagos recombinantes.....	51
3.13.2	Ensayo de viabilidad celular de los bacteriófagos recombinantes en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7.....	55
<b>Capítulo 4. Discusión.....</b>		<b>56</b>
<b>Capítulo 5. Conclusiones</b>		
5.1	Conclusiones.....	60
5.2	Trabajo a futuro.....	60
<b>Literatura citada.....</b>		<b>61</b>
<b>Anexos.....</b>		<b>68</b>

## Lista de figuras

Figura		Página
1	Moléculas de adhesión celular.....	1
2	Familias mayores de las moléculas de adhesión celular (CAMs).....	2
3	E-Cadherina media las conexiones epiteliales en células epiteliales MDCK.....	3
4	Interacciones <i>cis</i> y <i>trans</i> de las cadherinas clásicas.....	5
5	Interacción de proteínas adaptadoras con las cadherinas clásicas.....	6
6	Ensayo de inmunofluorescencia para cadherina-11 (FITC).....	8
7	Vía de señalización Wnt.....	10
8	Microscopía inmunofluorescente en sinoviocitos tipo fibroblastos.....	11
9	Representación esquemática de anticuerpos encontrados en suero de llama.....	14
10	Comparación del dominio VHH de un anticuerpo de cadena pesada con su contraparte VH-VL de un anticuerpo convencional.....	16
11	Estructura del bacteriófago M13.....	19
12	Obtención de bacteriófago M13 recombinante.....	20
13	Selección del M13 recombinante contra el antígeno específico.....	21
14	Extracción y obtención de linfocitos.....	24
15	Fragmento VHH anti-Vp6. ....	40
16	Producto de PCR utilizando los oligonucleótidos CALL001 y CALL002.....	41
17	Producto de PCR del fragmento VHH.....	42
18	Digestión del fagémido pComb3XSS. ....	43
19	Ligación del fagémido pComb3XSS y el fragmento VHH. ....	45
20	Transformación de células 5 $\alpha$ F' .....	46
21	PCR de colonia de las células 5 $\alpha$ F' .....	47
22	Transformación de las células 5 $\alpha$ F' a gran escala. ....	48

<b>23</b>	Titulación de bacteriófago recombinante $R_0$ . .....	<b>48</b>
<b>24</b>	Bacteriófagos recombinantes amplificados de las rondas de selección.....	<b>49</b>
<b>25</b>	Ensayo ELISA de los bacteriófagos recombinantes de cada ronda de selección hacia la CDH11-EC1. ....	<b>50</b>
<b>26</b>	Ensayo de inmunofluorescencia en células MCF-7. ....	<b>53</b>
<b>27</b>	Ensayo de inmunofluorescencia en células MDA-MB-231.....	<b>54</b>
<b>28</b>	Ensayo MTT en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7. ....	<b>55</b>
<b>29</b>	Secuencia del péptido CDH11-EC1.....	<b>68</b>

## Lista de tablas

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
<b>1</b> Componentes utilizados para la alineación de los nucleótidos libres sobre la cadena de ARN.....	<b>26</b>
<b>2</b> Componentes utilizados para la síntesis de ADNc y eliminación de la cadena de ARN	<b>26</b>
<b>3</b> Componentes utilizados para PCR con los oligonucleótidos CALL001 y CALL002.....	<b>27</b>
<b>4</b> Condiciones utilizadas en el termociclador para el PCR usando los oligonucleótidos CALL001 y CALL002.....	<b>27</b>
<b>5</b> Componentes utilizados para PCR con los oligonucleótidos VHHBACK- <i>Sfi</i> I y VHHFOR- <i>Sfi</i> I.....	<b>28</b>
<b>6</b> Condiciones utilizadas en el termociclador para el PCR usando los oligonucleótidos VHHBACK- <i>Sfi</i> I y VHHFOR- <i>Sfi</i> I.....	<b>28</b>
<b>7</b> Componentes utilizados para llevar a cabo la reacción de digestión del vector pComb3xSS. ....	<b>29</b>
<b>8</b> Componentes utilizados para llevar a cabo la reacción de digestión del fragmento VHH.....	<b>30</b>
<b>9</b> Componentes utilizados para llevar a cabo la reacción de digestión del fragmento VHH.....	<b>31</b>
<b>10</b> Componentes utilizados para realizar el PCR de colonia.....	<b>32</b>
<b>11</b> Condiciones utilizadas en el termociclador para el PCR de colonia.....	<b>32</b>
<b>12</b> Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del fragmento VHH.....	<b>39</b>

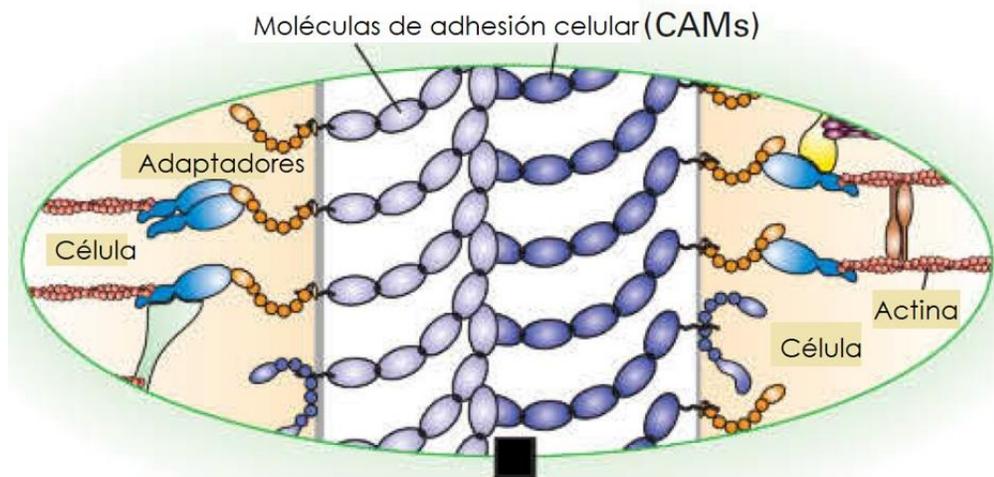
## Capítulo 1. Introducción

### 1.1 Antecedentes.

#### 1.1.1 Moléculas de adhesión celular.

Las células en los diversos tejidos animales pueden adherirse directamente con otra célula a través de proteínas de membrana especializadas conocidas como moléculas de adhesión celular (CAMs, por sus siglas en inglés) (Figura 1). De igual manera, estas células pueden adherirse de manera indirecta a través de receptores de adhesión, que se encuentran en la membrana plasmática de estas células, hacia la matriz extracelular. Algunos de estos receptores celulares incluso pueden llegar a cumplir la función de las CAMs (Humphrey et al., 2014; Jansen et al., 2015).

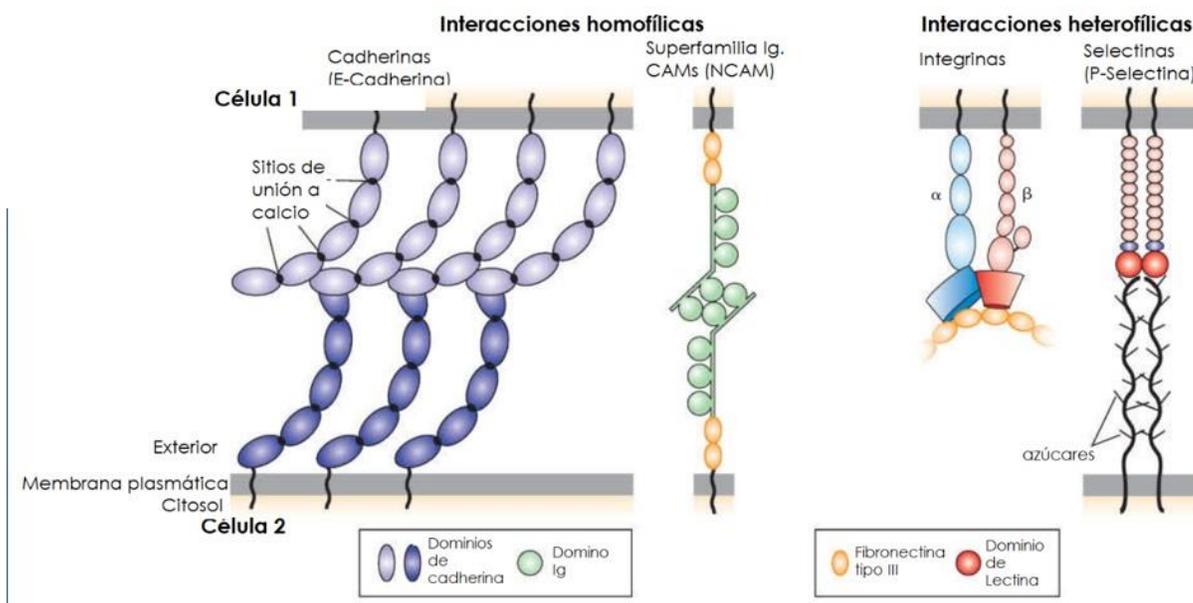
La adhesión célula-célula no solamente permiten la formación de diferentes tejidos celulares, sino que, además permiten la transferencia bidireccional de información entre el exterior y el interior de las células. Esto es porque este tipo de adhesión está relacionado intrínsecamente con el citoesqueleto, así como con diversas rutas de señalización. Por lo que la presencia de proteínas de adhesión se ve íntimamente involucrado en varios procesos celulares, incluyendo la supervivencia, proliferación, diferenciación y migración celular. Debido a lo cual, los defectos que puedan interferir con estas interacciones adhesivas pueden ser la causa o contribuir en el desarrollo de enfermedades, incluyendo desordenes neuromusculares o incluso en cáncer (Nieto, 2013).



**Figura 1. Moléculas de adhesión celular.** Las moléculas de adhesión celular (CAMs) permiten la unión con otras CAMs mediante adhesiones célula-célula. De igual manera, las CAMs están relacionadas intrínsecamente con el citoesqueleto, principalmente se encuentran en el espacio extracelular, permitiendo la comunicación celular (Imagen modificada de Lodish et al., 2016).

La mayoría de las CAMs se agrupan en cuatro familias principales: las cadherinas, la familia de las inmunoglobulinas (Ig), las integrinas y selectinas (Figura 2). Las CAMs están conformadas por dominios múltiples, los cuales pueden encontrarse en más de un tipo de proteína. Alguna de las propiedades de las CAMs es que pueden conferir la habilidad de unirse específicamente a otras CAMs de células adyacentes, o incluso a CAMs de la misma célula. Las CAMs permiten, mediante dominios extracelulares, las interacciones adhesivas entre las células del mismo tipo (adhesiones homotípicas) o entre células de diferente tipo (adhesión heterotípica). De igual manera, una CAM de una célula puede unirse directamente al mismo tipo de CAM de otra célula adyacente (unión homofílica) o unirse a otro tipo de CAM (unión heterofílica)(Anderson y Van Itallie, 2009; Niessen, 2007).

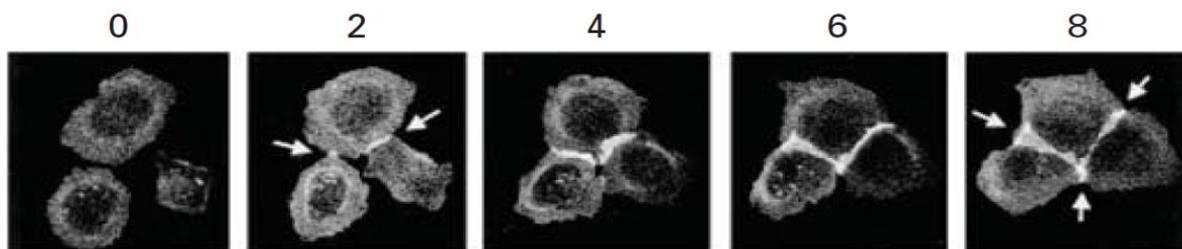
Los dominios citosólicos de las CAMs pueden reclutar a un conjunto de proteínas adaptadoras (Figura 1). Estas proteínas actúan como uniones que conectan a las CAMs a elementos del citoesqueleto; también pueden reclutar moléculas intracelulares que son esenciales para las vías de señalización (Anderson y Van Itallie, 2009; Niessen, 2007).



**Figura 2. Familias mayores de las moléculas de adhesión celular (CAMs).** Las E-cadherinas comúnmente forman uniones con otras E-cadherinas (unión homofílica) sobre la misma o con la célula adyacente. La superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) de las CAMs pueden funcionar como receptores de adhesión o como CAMs que forman uniones homofílicas (NCAM) o uniones heterofílicas (uniones con otros tipos de CAMs). Las integrinas funcionan como CAMs o receptores de adhesión que se unen a proteínas multiadhesivas, como la fibronectina. Las selectinas, contiene un dominio de lectina que reconoce glicoproteínas o glucolípidos en células adyacentes (Imagen modificada de Lodish et al., 2016).

Las CAMs principales que se encuentran en las uniones adherentes en los desmosomas pertenecen a la familia de las cadherinas. Esta superfamilia de cadherinas de más de cien miembros puede ser agrupada en seis subfamilias, en las cuales se encuentran incluidas las cadherinas clásicas y las cadherinas desmosomales.

**Cadherinas clásicas:** Estas incluyen a las E-, N-, P-cadherina, las cuales reciben su nombre de acuerdo con el tejido en las que se identificaron inicialmente (epitelial, neuronal, placenta, respectivamente). Las E- y N- cadherinas son las que más se expresan, particularmente en la diferenciación temprana. En el caso de la E-cadherina, está concentrada en las uniones adherentes, así como en las superficies laterales de las células, los cuales permiten la adhesión de las membranas celulares adyacentes. La mayoría de las cadherinas clásicas son mediadas por interacciones homofílicas. La capacidad de adhesión de las cadherinas es mediada por la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular; es por esta propiedad por la que reciben su nombre. Algunas moléculas de adhesión requieren cantidades mínimas de  $\text{Ca}^{2+}$  en el fluido extracelular para que puedan funcionar correctamente (Oda y Takeichi, 2011). Sin embargo, existen otras moléculas de adhesión que son totalmente independientes del  $\text{Ca}^{2+}$  (IgCAMs). La adhesión inicial de las células epiteliales está formada por “acumulaciones” de E-cadherinas, las cuales median la unión inicial de las células epiteliales y la subsecuente formación de monocapas celulares (Figura 3) (Adams et al., 1998).



**Tiempo transcurrido después de mezclar las células epiteliales (h)**

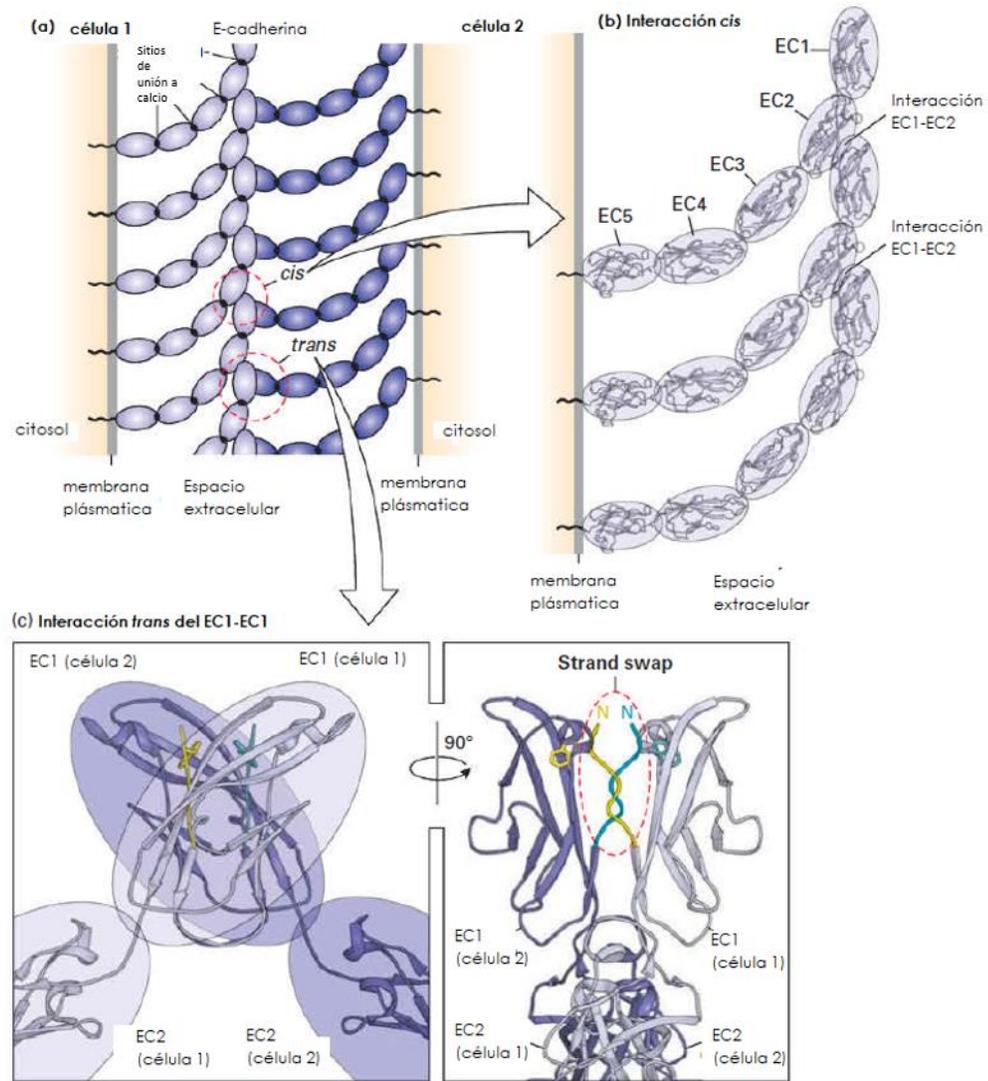
**Figura 3. La E-Cadherina media las conexiones epiteliales en células epiteliales MDCK.** El gen de la E-cadherina se fusionó a la proteína verde fluorescente (GFP) y se expresó en las células MDCK. Las células se cultivaron con medio suplementado con calcio, la distribución la E-cadherina fluorescente se visualizó con el paso del tiempo (horas). Las acumulaciones de E-cadherina median la adhesión inicial de las células epiteliales (Imagen modificada de Adams et al., 1998).

Cada molécula de cadherina contiene un sólo dominio transmembranal, un dominio citosólico C-terminal y cinco dominios extracelulares de cadherinas, nombrados EC1 a EC5. Los dominios extracelulares son necesarios para la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  y para la adhesión célula-célula mediada por cadherinas. Las adhesiones mediadas por cadherinas utilizan dos tipos de adhesiones: conformadas por interacciones tipo cis (interacciones intracelulares) y, las conformadas por interacciones tipo trans (interacciones intercelulares)

(Figura 4.a). La unión de tres iones de  $\text{Ca}^{2+}$  en cada uno de los sitios localizados entre las repeticiones de cadherinas permite la estabilización de la estructura alargada y curvada del dominio extracelular (Figura 4.b). Esta estructura curvada es necesaria para la complementariedad molecular que permite la estabilización de las adhesiones cis y trans entre las moléculas de cadherinas. Estas adhesiones cis y trans de las propias cadherinas, en conjunto con las interacciones con las moléculas adaptadoras y citoesqueléticas, permiten las uniones entre las cadherinas de células adyacentes formando arreglos adhesivos. La unión del dominio EC1 de una molécula de cadherina al dominio EC1 de otra célula adyacente es la responsable de las adhesiones cis (Figura 4.b)(Glentis et al., 2014; Oda y Takeichi, 2011).

Las características clave de las interacciones cis y trans de las cadherinas son: (1) La curvatura dependiente de calcio de los cinco dominios de cadherina extracelulares que permite la orientación adecuada de los dominios EC1 y EC2; (2) para las interacciones cis, en el cual la unión de un lado del dominio EC1 a la superficie complementaria del dominio EC2 de una molécula adyacente sobre la misma membrana celular; y (3) para las interacciones trans, la unión del dominio EC1 de la superficie de una célula con el dominio EC1 de otra cadherina de una célula adyacente. La unión trans EC1-EC1 es estabilizada cuando un segmento pequeño, en el N-terminal, de cada uno de los dos dominios EC1 se balancean y se contraponen con su segmento equivalente del dominio de cadherina de la célula adyacente (“strand swap”, Figura 4.c)(Brasch et al., 2012).

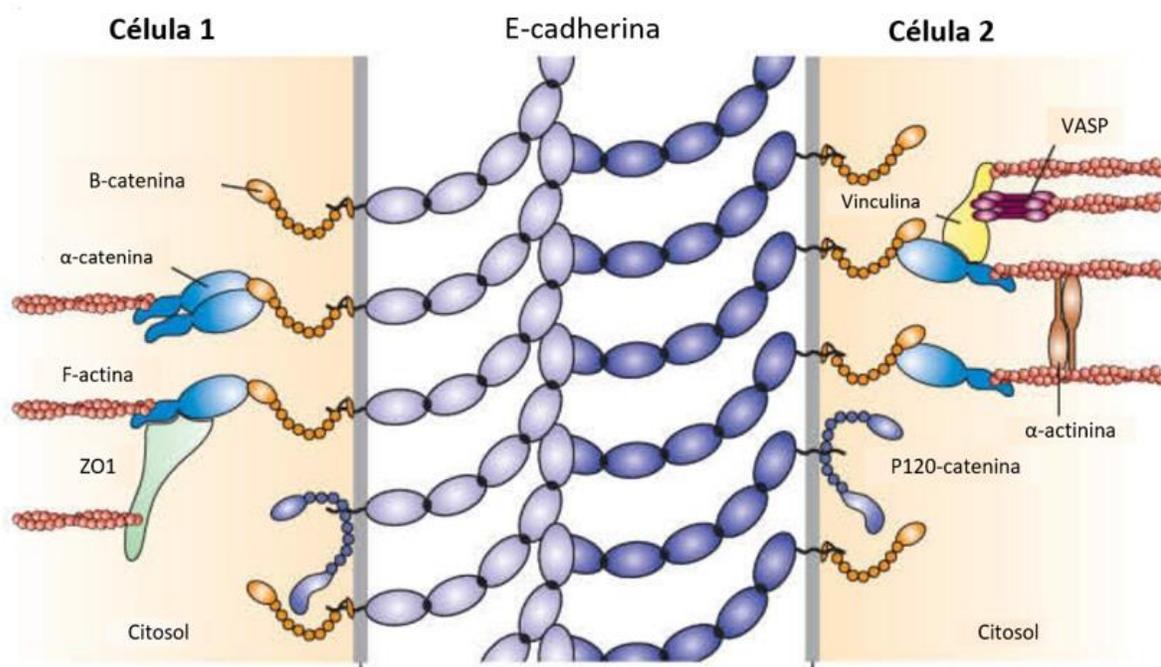
El dominio citosólico C-terminal de las cadherinas clásicas está unido a los filamentos de actina del citoesqueleto por proteínas adaptadoras (Figura 5); estas uniones son esenciales para adhesiones fuertes. Mientras aumenta la tensión generada por los filamentos de actina, esto induce a la formación de grandes agrupaciones de cadherinas, haciendo la adhesión intracelular más fuerte. Algunas de estas adhesiones mediadas por cadherinas y filamentos de actina están mediadas por un tipo de proteína adaptadora, la  $\alpha$ -catenina y la  $\beta$ -catenina son ejemplos importantes (Y. Wu et al., 2015). Ambas son mecanosensores que permiten la unión de las cadherinas y los filamentos de actina (Figura 5) y permiten el cambio de forma cuando la célula está sujeta a una fuerza física. La ruptura de las interacciones entre las cadherinas clásicas y las proteínas adaptadoras reduce de manera drástica la adhesión celular mediada por cadherinas. Estas disrupciones ocurren espontáneamente en células tumorales, en las cuales a veces ocurre una falla en la expresión de  $\alpha$ -catenina. La  $\beta$ -catenina tiene un doble rol, no solamente media la unión con el citoesqueleto; también funciona como una molécula de señalización, esta se transloca al núcleo y altera la transcripción génica de la vía de señalización de la Wnt (McMillen y Holley, 2015).



**Figura 4. Interacciones *cis* y *trans* de las cadherinas clásicas.** (A) Los dominios exoplasmáticos de cadherina están unidas por interacciones homofilicas *cis* y *trans*. Los dominios extracelulares de cadherina dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  son necesarios para formar las interacciones estables de tipo *cis* y *trans*. (B) La unión de un dominio EC1 de una cadherina con un dominio EC2 de una cadherina adyacente de la misma célula es la responsable de las interacciones *cis*. (C) Las dos vistas rotadas  $90^\circ$  de la unión *trans* de un dominio EC1 de una cadherina a un dominio EC1 de una cadherina de una célula adyacente. En la imagen del lado izquierdo se muestran las orientaciones relativas de los dominios EC1. La imagen del lado derecho muestra como un pequeño segmento de polipéptido en el N-terminal de cada uno de los dos dominios EC1 (remarcado de color amarillo y azul) se balancea y se sustituye el segmento equivalente del dominio adyacente ("strand swap"). El "strand swap" coloca la cadena lateral de un residuo de triptófano en cada uno de los segmentos en un "binding pocket" sobre el dominio EC1 adyacente. Esta interacción permite estabilizar la unión *trans* (Imagen modificada de Lodish et al., 2016).

Las cadherinas clásicas tienen una distribución característica y un rol importante durante la diferenciación de los tejidos. En el transcurso de la diferenciación, las cadherinas expresadas en la superficie celular

cambian, afectando de diversas maneras la adhesión, migración y división celular. La reorganización de los tejidos celulares durante la morfogénesis es dada por la conversión de células epiteliales no móviles, conocidas como células mesenquimales, las cuales son precursoras de otros tejidos. Esta transición de epitelio a mesenquimal (EMT, por sus siglas en inglés) está asociada con la reducción de la expresión de la E-cadherina. La EMT está relacionada con diversas patologías, un ejemplo es la transición de células epiteliales a células de carcinoma. Se sabe que el contacto célula-célula puede inhibir la proliferación celular. Durante el desarrollo de los tejidos, una vez que las células epiteliales se han dividido para formar un tejido bien definido, la división se detiene a no ser que estas hayan sido dañadas o reciban una señal para ir a la EMT (J. M. Lee et al., 2006). Uno de los mecanismos que es usado para detener la proliferación de las células epiteliales es por medio de la regulación de la E-cadherina y la catenina de la vía de señalización de Hippo, la cual controla la proliferación celular (C. C. Yang et al., 2015).



**Figura 5. Interacción de proteínas adaptadoras con las cadherinas clásicas.** Los dominios citosólicos de las E-cadherinas se unen directa o indirectamente a múltiples proteínas adaptadoras (ej.  $\beta$ -catenina), las cuales se unen a los filamentos de actina (F-actina) del citoesqueleto y participan en las vías de señalización intracelulares. En la imagen se muestran diferentes tipos de proteínas adaptadoras enfatizando la variedad de interacciones que pueden ocurrir con las uniones adherentes (Imagen modificada de Lodish et al., 2016).

### **1.1.2 Cadherina-11, el significado de su sobreexpresión.**

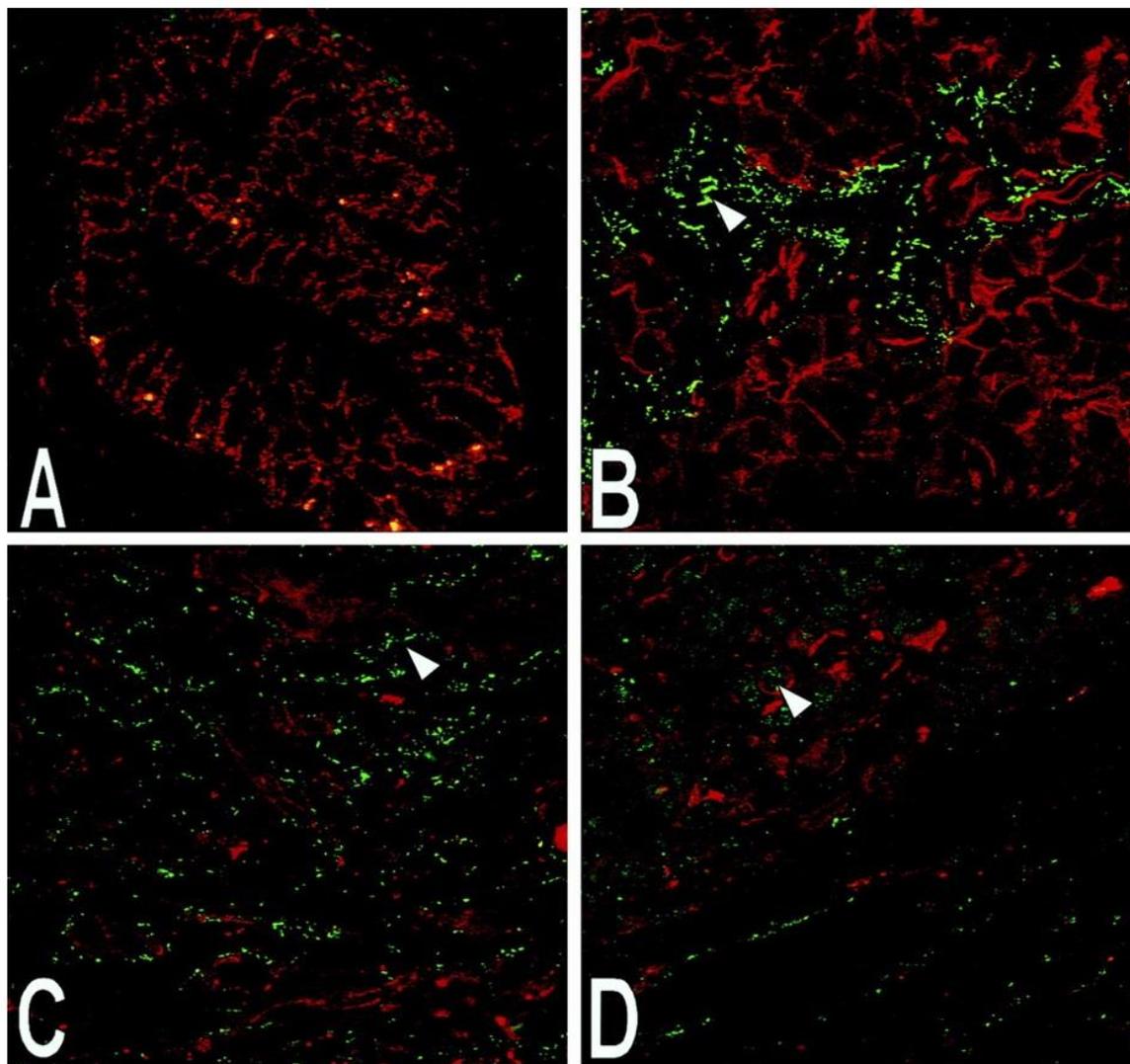
La cadherina 11 (CDH11), también conocida como OB-cadherina, es una cadherina del tipo II que se expresa preferentemente en los osteoblastos. De igual manera, se expresa pobremente en diversos tejidos; como cerebro, pulmones y tejido testicular (Kimura et al., 1995, 1996; Okazakis et al., 1994). La expresión de la CDH11 está asociada con la diferenciación de los osteoblastos y se ha propuesto que juega un papel importante en la migración celular durante la maduración de los osteoblastos (Kawaguchi et al., 2001). De igual manera, durante la embriogénesis temprana, la CDH11 es expresada primordialmente en tejidos de tipo mesenquimal y no en los de tipo epitelial (Simonneau et al., 1995).

Diferentes tipos de cadherinas han mostrado capacidad de promover la migración celular (Becker et al., 2012). En particular, la OB-cadherina promueve la migración celular en diferentes tipos celulares. En humanos, por ejemplo, la activación de la cadherina-11 está correlacionada con la progresión tumoral, así como con la artritis inflamatoria (Bussemakers et al., 2000; Chang et al., 2011; Ding et al., 2015; Pishvaian et al., 1999).

En el caso de la tumorigénesis, se ha demostrado que la CDH11 es sobreexpresada en diferentes tipos de cáncer; incluyendo al cáncer de mama, próstata, colon y sarcoma de Ewing (Bussemakers et al., 2000; Hatano et al., 2015; Pishvaian et al., 1999; Sarrió et al., 2008). En el caso de los cánceres de tipo epitelial, mejor conocidos como carcinomas, uno de sus sellos característicos es la pérdida de la E-cadherina para convertirse en un carcinoma poco diferenciado, es decir, pasan por la transición EMT (J. Yang y Weinberg, 2008). Las células que sufren este proceso pierden su polaridad, se vuelven resistentes a la apoptosis y, por ende, se vuelven invasivas. Estas células tumorales poco diferenciadas se asemejan a las células de tipo mesenquimal y logran expresar cadherinas de este mismo tipo celular; como la N-cadherina y, de igual manera, la CDH11. Por lo tanto, ambas cadherinas están involucradas íntimamente en el proceso metastásico (Gravdal et al., 2007; Pishvaian et al., 1999).

Se ha demostrado que la CDH11 se expresa en células de cáncer de próstata que están pobremente diferenciadas, ocasionando que ocurra la transición de E-cadherina a una de tipo mesenquimal, en este caso, la CDH11. Esta cadherina se expresa en el estroma de los tumores prostáticos (Figura 6), así como en la membrana de los cánceres de alto grado de tipo epitelial (Tomita et al., 2000). Debido a que, en este caso el cáncer de próstata, es común que realice metástasis hacia los tejidos óseos, se ha propuesto que la CDH11 es la responsable de mediar la adhesión de las células de cáncer de próstata hacia los osteoblastos (Huang et al., 2010). De igual manera, la CDH11 no sólo provee una unión física entre las

células de cáncer de próstata y los osteoblastos, también incrementa la motilidad celular y la invasión que facilita la colonización metastásica de estas células en los huesos. Esto ocurre debido a la interacción de la CDH11 con los dominios de la yuxtamembrana y la  $\beta$ -catenina (Huang et al., 2010).

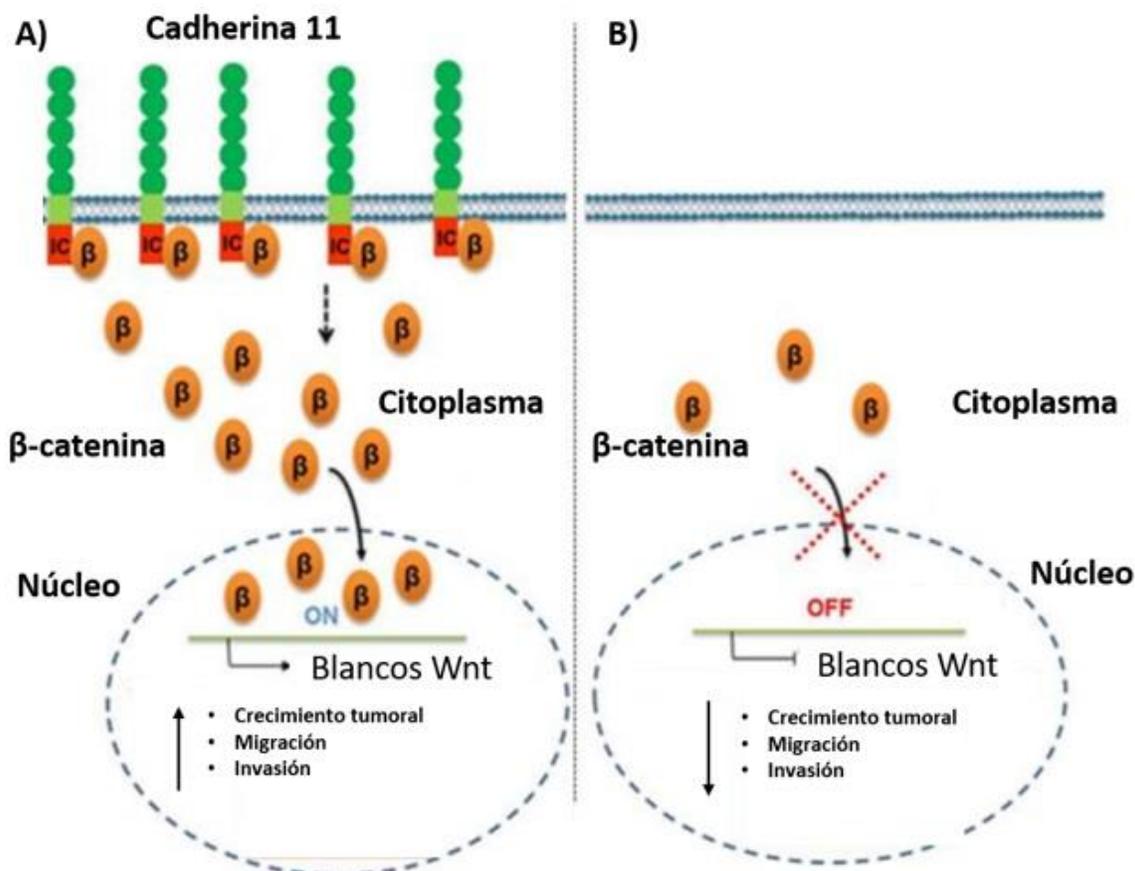


**Figura 6. Ensayo de inmunofluorescencia para cadherina-11 (FITC).** (A) Muestra normal de próstata. (B) Muestra de cáncer primario de próstata. (C y D) Muestra de metástasis a nodos linfáticos. (A) En áreas no malignas, sólo un pequeño marcaje es observado en el estroma. (B) La expresión de la Cadherina-11 es fuertemente inducida en las áreas estromales (indicado por el puntero). (C y D) En cánceres de alto grado y en metástasis la expresión de cadherina-11 deja de ser notoria en células estromales, pero sigue presente en células de cáncer (indicados con el puntero) ( Imagen tomada de Tomita et al., 2000).

Otro caso común en donde existe una sobreexpresión de CDH11 es en los tejidos metastásicos de cáncer de mama. A pesar de los avances en estrategias terapéuticas y de diagnóstico, y del avance en la patobiología de este tipo de cáncer, sólo se ha manejado terapéuticamente, pero no ha logrado curar; por lo que es necesario avanzar más en la búsqueda de blancos terapéuticos o en el desarrollo de estrategias terapéuticas efectivas que logren limitar la metástasis (Chen et al., 2019).

Además del descubrimiento de las células madre cancerosas en tumores en cáncer de mama (Al-Hajj et al., 2003), también se han reportado este tipo de células madre cancerosas en otros tipos de tumores, con lo cual han dejado de ser propias en el cáncer de mama (Koury et al., 2017). Este tipo de células tienen la capacidad de auto renovación, así como de diferenciarse en células tumorales heterogéneas. Además, estas células han sido implicadas en la diseminación metastásica de células cancerosas en diversos modelos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama, y han mostrado una mayor resistencia a los tratamientos quimioterapéuticos, llevando a una recaída de los pacientes (Abdullah y Chow, 2013).

La vía de señalización Wnt es la principal reguladora de la auto renovación celular y ayuda a mantener el estado indiferenciado tanto de las células de tipo mesenquimal, así como de las células madre cancerosas (Ling et al., 2009; Pohl et al., 2017). La presencia del ligando Wnt ha mostrado que promueve la translocación de la  $\beta$ -catenina al núcleo y activa la vía de señalización Wnt (Zhan et al., 2017). Se ha demostrado que, detener la expresión de la  $\beta$ -catenina reduce la población de las células tipo madre, así como su quimioresistencia a la doxorrubicina (Xu et al., 2015). En la membrana, la  $\beta$ -catenina se une a diferentes cadherinas en el complejo de unión de adhesión y se estabiliza; sin embargo, la  $\beta$ -catenina es degradada en el citoplasma por el complejo APC-Axin-GSK3 $\beta$  en ausencia de ligandos Wnt (Hendriksen et al., 2008). De hecho, las cadherinas inhiben la activación canónica de la vía de señalización Wnt; debido a que mantienen a la  $\beta$ -catenina en la membrana. De igual manera, la translocación de la  $\beta$ -catenina es prevenida debido a la ausencia del ligando Wnt (Orsulic et al., 1999). Durante el proceso EMT, las cadherinas actúan como un grupo de  $\beta$ -catenina competente en adherencia dependiente de calcio, el cual es el principal mediador para la activación canónica de la vía de señalización Wnt, por lo que, retirando las cadherinas reduce la  $\beta$ -catenina en la membrana y suprime la activación de la vía de señalización Wnt a pesar de la presencia de  $\beta$ -catenina en el citoplasma (Figura 7) (Howard et al., 2011).

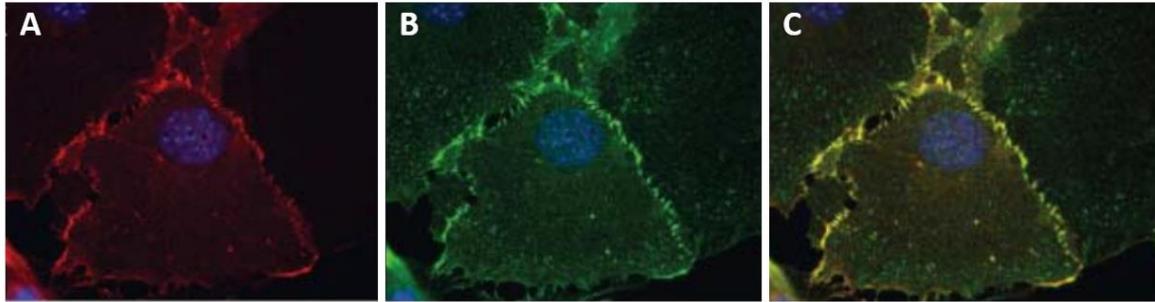


**Figura 7. Vía de señalización Wnt.** (A) En presencia de la señal Wnt, la  $\beta$ -catenina es liberada de la CDH11, la cual se acumula en la región perinuclear y se transloca al núcleo donde activa genes reguladores que aumentan la autorenovación, migración e invasión celular. (B) En ausencia de CDH11, la cantidad de  $\beta$ -catenina es disminuida considerablemente, por lo que la señalización Wnt es detenida, y los genes de regulación de la vía canónica de señalización Wnt permanecen inactivos (Imagen modificada de Satriyo et al., 2019).

Finalmente, la CDH11 es considerada un blanco importante en la artritis reumatoide, la cual es una enfermedad inflamatoria con propiedades incluso comparadas con el cáncer; esto debido a que la sobreexpresión de CDH11 está relacionada con las mismas propiedades de proliferación y migración que se ha demostrado en diversos cánceres. Por lo que la administración sistémica de un anticuerpo anti-CDH11, revierte la proliferación y migración de los sinoviocitos a los sitios de la inflamación de las articulaciones y, por lo tanto, atenúa los síntomas de la artritis reumatoide (D. M. Lee et al., 2007).

El sinovio consiste en un revestimiento de fibroblastos y macrófagos que se superponen a un subrevestimiento de tejido conectivo. El tejido sinovial normal, forma una membrana en las esquinas de las articulaciones y se encarga de proveer lubricación y nutrientes para el cartílago. En el caso de la artritis

reumatoide, el sinovio es el sitio principal de inflamación y participa en una respuesta del mismo tejido que daña el cartílago y el hueso. En 2007, se demostró que la CDH11 es esencial para el desarrollo del sinovio. De igual manera, la CDH11 determina el comportamiento de los sinoviocitos en la respuesta del tejido proinflamatorio y del destructivo en la artritis inflamatoria (D. M. Lee et al., 2007). La presencia de CDH11 (Figura 8.A), así como de  $\beta$ -catenina en sinoviocitos tipo fibroblastos (Figura 8.B) ha sido confirmada por microscopía confocal.



**Figura 8. Microscopía inmunofluorescente en sinoviocitos tipo fibroblastos.** (A) Células marcadas con anti-CDH11, mostrando expresión de CDH11 en las uniones adherentes. (B) Células marcadas con anti- $\beta$ -catenina. (C) Colocalización de la CDH11 con la  $\beta$ -catenina en sitios de la interfase celular, los cuales corresponden con las uniones adherentes de la célula (Imagen tomada de D. M. Lee et al., 2007).

Es por esto, que la cadherina-11 puede ser un blanco potencial para tratar diferentes tipos de cánceres (mama, próstata, colon), por ser considerado como un promotor metastásico (Li et al., 2014). De igual manera, su sobreexpresión está íntimamente relacionada en el desarrollo de la artritis reumatoide. El desarrollo de un tratamiento contra la CDH11 podría ser crucial para mejorar la prognosis de las patologías mencionadas anteriormente.

### 1.1.3 Inmunoterapia: anticuerpos monoclonales y sus derivaciones recombinantes.

Frente a una afección ocasionada por alguna patología en mamíferos, se desencadena una respuesta por receptores para motivos proteicos de dichas patologías lo cual permite el inicio de una cascada efectora contra dichas patologías (Beutler, 2004). Como resultado, se origina una respuesta adaptada hacia el patógeno, la cual se caracteriza por la diferenciación de linfocitos que reconocen específicamente los antígenos del patógeno en cuestión, contribuyendo en su eliminación y generando memoria inmunológica

contra dicho antígeno. En estos procesos mencionados participan los linfocitos B y los linfocitos T (Delves y Roitt, 2000).

En cuanto a la estructura de los anticuerpos convencionales, conocidos como inmunoglobulinas (Ig), tienen una estructura compuesta por un par de cadenas pesadas idénticas (*Heavy*, por sus siglas en inglés) y un par de cadenas livianas idénticas (*Light*, por sus siglas en inglés) ambas unidas por puentes disulfuro (Porter, 1963). Cada cadena liviana consiste en un dominio variable ( $V_L$ ) y uno constante ( $C_L$ ). Por otra parte, cada cadena pesada consiste en un dominio variable ( $V_H$ ) y hasta cuatro dominios constantes ( $C_{H1-H3}$ ). De igual manera, en la cadena pesada existe una región bisagra la cual le confiere flexibilidad a la Ig y a través de donde tiene lugar la interacción de cada heterodímero ( $V_L/C_L:V_H/C_H$ ) permitiendo la formación típica en “Y” (Cohen y Milstein, 1967). La unión de los dominios variables de cada cadena forma el sitio de unión a antígeno *Fab* (*antigen binding fragment*, por sus siglas en inglés), la cual representa el paratopo del anticuerpo. De igual manera, la unión de la región constante de las Ig forma la región cristalizable (Fc), la cual se encarga de la mayoría de las funciones efectoras (Figura 9.A) (Steinmeyer y McCormick, 2008).

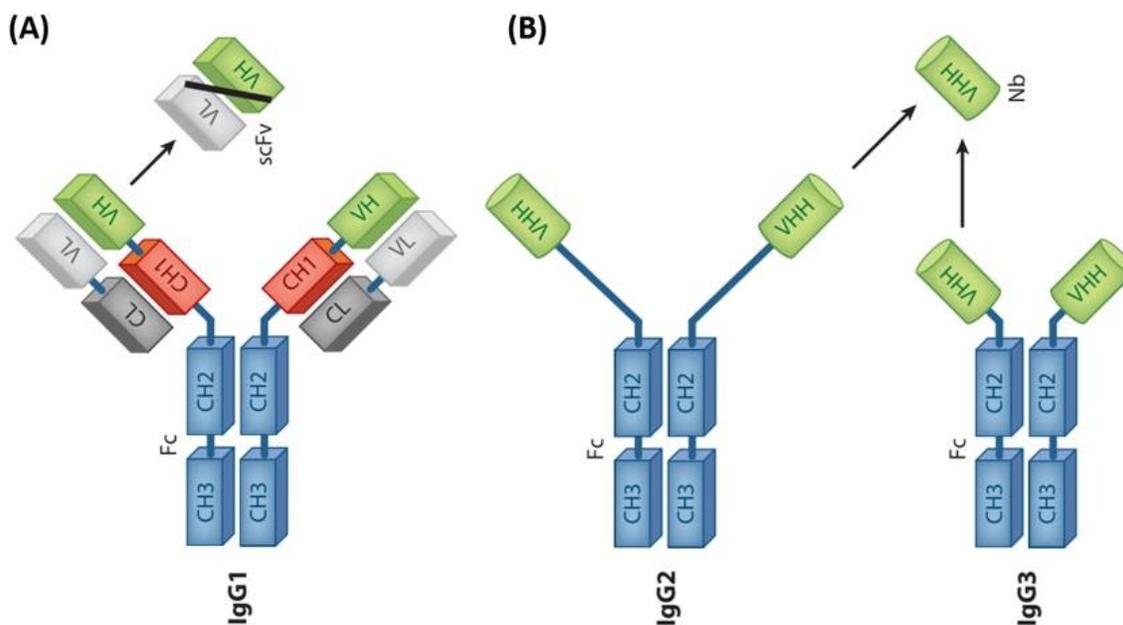
Las Ig se clasifican en cinco isotipos: IgM, IgD, IgG, IgE e IgA. Las IgM poseen una potente capacidad de activación del complemento y promoción de la fagocitosis para la contención del patógeno. Las IgA se encuentran en las superficies de las mucosas. Las IgE están involucradas en la contención contra parásitos y en enfermedades ocasionadas por alérgenos. Las IgD se coexpresan con las IgM sobre la superficie de los linfocitos B maduros antes de la estimulación antigénica (Finkelman et al., 1976; Ruddick y Leslie, 1977). Finalmente, las IgG son la clase más abundante, constituyendo el 70-75% de las Ig totales (Cohen y Milstein, 1967).

La variación en la capacidad de reconocimiento de antígenos de los anticuerpos se debe a la presencia de las regiones hipervariables de complementariedad (CDRs, *Complementarity Determinant Region*, por sus siglas en inglés). La región variable de cada cadena de Ig contiene tres de estas regiones, CDR1, CDR2 y CDR3, las cuales están unidas a regiones menos variables denominadas marcos (FR, *framework*, por sus siglas en inglés) (Kabat y Wu, 1991). Los FR están altamente conservados y son de importancia en la preservación de la estructura, plegamiento y estabilidad del anticuerpo (David et al., 2007; Padlan, 1994). Cuando los dominios  $V_H$  y  $V_L$  se aparean en el anticuerpo, se ponen en contacto las tres CDRs, conformando el paratopo, en el cual el CDR3 de ambas cadenas ocupa la porción central. Entre diferentes especies la longitud de los CDR1 y CDR2 resulta muy similar, sin embargo; la longitud de la CDR3 varía considerablemente (Elvin A. Kabat, Tai Te Wu, Harold M. Perry, Carl Foeller, 1991).

Las aplicaciones de los anticuerpos son varias debido a su extraordinaria propiedad de ser específicos. Esto los hace herramientas de suma importancia para labores de investigación, diagnóstico y terapia. El descubrimiento más importante para el uso a gran escala de los anticuerpos fue debido al desarrollo de las tecnologías de producción en hibridomas por Georges Köhler y César Milstein. El método consistía en producir líneas celulares estables, conocidas como hibridomas, las cuales pudieran producir una cantidad ilimitada de anticuerpos monoclonales (mAbs) a través de la fusión de linfocitos B productoras de anticuerpos con una línea celular de mieloma que fuera compatible. Las líneas celulares exitosas para este método fueron las de ratón, rata y conejo (Köhler y Milstein, 1975).

Por otra parte, las estimaciones sitúan al mercado mundial de anticuerpos usados en investigación en 200 millones de dólares anuales y en aplicaciones diagnósticas en 800 millones de dólares. Las mayores cifras están asociadas a la comercialización de anticuerpos terapéuticos, siendo 75,000 millones de dólares en 2013 (Ecker et al., 2015). La efectividad del tratamiento con los mAbs se debe al efecto directo de la interacción con el antígeno, ya sea por neutralización o por su acción biológica, por ejemplo, al activar el receptor celular blanco sobreexpresado en células tumorales induciendo la apoptosis. En otros casos, la actividad resulta de las funciones efectoras asociadas al dominio Fc (Scott et al., 2012).

El fragmento recombinante funcional más pequeño derivado de los anticuerpos convencionales es la unidad scFv (*Single chain*, por sus siglas en inglés), donde los dominios  $V_H$  y  $V_L$  se encuentran unidos por enlaces covalentes (Hudson, 1998) (Figura 9.A). Debido a su tamaño de 25 kDa, pueden ser producidos de forma recombinante en bacterias con altos rendimientos (Skerra y Plückthun, 1988). Sin embargo, su uso para aplicaciones terapéuticas es limitado por su corta vida media en circulación debido a su rápida absorción y excreción por los riñones (Sanz et al., 2005).



**Figura 9. Representación esquemática de anticuerpos encontrados en suero de llama.** (A) Los anticuerpos convencionales (IgG<sub>1</sub>) contienen dos cadenas ligeras (L) (dominios V<sub>L</sub> y C<sub>L</sub>) y dos cadenas pesadas (H) (compuestos de dominios V<sub>H</sub>, CH<sub>1-3</sub> y bisagra) los primeros dos dominios de la cadena H y la cadena L forman el fragmento Fab. Un par de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> pueden ser unidos genéticamente en un sólo fragmento variable de una sola cadena (scFv). (B) los IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>3</sub>, los cuales sólo se componen de cadenas pesadas (hcAbs); cada cadena pesada contiene dominios VHH, bisagra y CH<sub>2-3</sub>. El dominio bisagra de los IgG<sub>2</sub> es más larga en comparación con el de los IgG<sub>3</sub>. Como se indica en la figura, los dominios CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> conforman la parte Fc. Un dominio VHH recombinante es conocido como nanoanticuerpo (nb), el cual es altamente soluble y no muestra unión a otras proteínas hidrofóbicas (Bannas et al., 2017; Muyldermans, 2013) (Imagen tomada de Muyldermans, 2013).

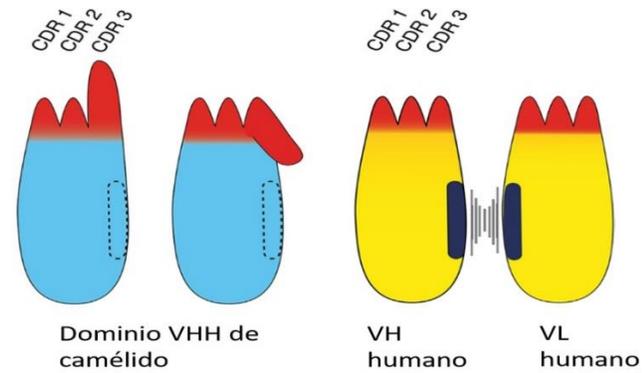
#### 1.1.4 Nanoanticuerpos, otra posible alternativa.

En los años 90's se encontró que los camellos, además de tener anticuerpos convencionales Ig, tenían anticuerpos estructuralmente diferentes que carecían de cadenas livianas. Estos anticuerpos homodiméricos están compuestos solamente de dos cadenas pesadas hcAbs (*heavy chain antibodies*, por sus siglas en inglés). Cada cadena pesada está formada por regiones variables y constantes referidas como V<sub>H</sub>H y C<sub>H</sub>H, respectivamente. De igual manera, estos tipos de anticuerpos se encontraron en llamas y alpacas (Hamers-Casterman et al., 1993) (Figura 9.B). En 1995, se encontró una forma similar de hcAbs en peces cartilaginosos que recibieron el nombre de NAR (*New Antigen Receptor*, por sus siglas en inglés)(Greenberg et al., 1995). Con base a estudios se han diferenciado tres tipos de IgG en camélidos (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>3</sub>). La IgG<sub>1</sub> es la más abundante y corresponde a los anticuerpos tetraméricos convencionales y las IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>3</sub> corresponden a los hcAbs (Hamers-Casterman et al., 1993). En los hcAbs, la región bisagra es lo que permite diferenciar entre las IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>3</sub>. La primera presenta una región de

bisagra de 35 aminoácidos, mientras que la segunda es de 15 aminoácidos (Muyldermans, 2013) (Figura 9.B). La estructura general de los hcAbs se asemeja a la IgG convencional, en la cual los dominios variables están formados por cuatro *frameworks* y tres CDRs. Sin embargo, presentan características que los diferencian. Primero, los hcAbs carecen del dominio constante  $C_{H1}$ , lo cual genera que el dominio variable VHH (nanoanticuerpo) se conecte directamente a la región bisagra y al dominio Fc (Hamers-Casterman et al., 1993). Segundo, el Fab está reducido a un único dominio (Figura 9.B). Esto surge por la ausencia del dominio  $C_{H1}$ , en el cual los anticuerpos convencionales interactúan con el dominio constante  $C_L$  estabilizando el fragmento de unión a antígeno ( $V_H/V_L$ ).

Así en camélidos como en tiburones, el dominio de unión al antígeno de los hcAb está reducido a aproximadamente  $\approx 130$  aminoácidos ( $\approx 14$  kDa, 4 nm de largo y 2 nm de ancho). Y representan los fragmentos de unión a antígeno más pequeños conocidos derivados de Ig convencionales (Muyldermans, 2013). De igual manera, presentan la particularidad que reconocen epítomos muy diferentes a los que normalmente son reconocidos por los anticuerpos convencionales. La ausencia de la cadena liviana en los hcAbs requirió de una modificación en su estructura para su adaptación. Este cambio surgió, en el dominio VHH, a nivel del FR2 en el cual presenta sustituciones en cuatro aminoácidos altamente conservados:  $V^{42}G^{49}L^{50}W^{52}$ . Estos aminoácidos se encuentran en el  $V_H$  e interactúan directamente con el  $V_L$  por medio de interacciones hidrofóbicas (Chothia et al., 1985), por lo que la ausencia de este dominio se produciría la agregación de estos. La sustitución por otros aminoácidos más hidrofílicos ( $F^{42}E^{49}R^{50}G^{52}$ ) aumenta la solubilidad de los VHH evitando la agregación de estos (Muyldermans, 2001). Esta característica, además proporciona que el dominio VHH presente propiedades como resistencia química y térmica (Muyldermans, 2013).

Una de las características importantes en los VHH es la longitud del CDR3, la cual es 50% más largo en comparación con los anticuerpos convencionales (Figura 10) (Muyldermans, 2001; T. Te Wu et al., 1993). Además, el CDR3 presenta una gran flexibilidad conformacional, lo cual permite ajustarse a la interacción con el antígeno, particularmente cuando se trata de epítomos cóncavos. El CDR3, por sí sólo, contribuye con el 50% al 100% de la superficie de interacción con el antígeno (Muyldermans, 2013). Otra característica importante, es que el dominio VHH es considerado de “baja” inmunogenicidad, debido a que presenta una homología del 80% en comparación con la secuencia del dominio VH humano, lo cual abre las puertas para aplicaciones terapéuticas, imagenología y diagnóstico (Chakravarty et al., 2014; De Meyer et al., 2014; Kijanka et al., 2015).



**Figura 10. Comparación del dominio VHH de un anticuerpo de cadena pesada con su contraparte VH-VL de un anticuerpo convencional.** Los tres CDRs están resaltados en rojo, la región *framework* está resaltado en azul (dominio VHH de camélido) y en amarillo (dominio VH y VL de humano). El CDR3 contribuye a la diversidad y especificidad del anticuerpo hacia el parátipo. De igual manera, la longitud del CDR3 del VHH es considerablemente más larga en comparación con su contraparte VH humana. Una característica distintiva del VHH es que se une a su blanco con un solo dominio, mientras que el VH humano se une a su blanco en conjunto con el dominio VL asociado no covalentemente entre ellos. Otra característica particular del dominio VHH es que la región de marco de referencia (*framework*, por sus siglas en inglés) es totalmente hidrofílica, mientras que el dominio VH contiene un lado hidrofóbico el cual encara al dominio VL (resaltado en negro). La interfase hidrofóbica ayuda a mantener la orientación adecuada de los seis CDRs de los dominios VH y VL hacia el parátipo. La región del *framework* 2 del dominio VHH es hidrofílica (indicada con líneas punteadas), aportando una mayor estabilidad y solubilidad en comparación con el dominio VH. Debido a que el CDR3 del dominio VHH es más largo en comparación con el dominio VH, puede alcanzar cavidades sobre antígenos blanco, los cuales son inaccesibles para anticuerpos convencionales (Bannas et al., 2017) (imagen modificada de Bannas et al., 2017).

Es por esto que, con las propiedades mencionadas anteriormente, los nanoanticuerpos son atractivos para su aplicación en investigación, diagnóstico y terapia. Las características principales estos son:

- Conservación de la especificidad original durante la construcción de la biblioteca debido a que no existe apareamiento con la cadena liviana (Muyldermans, 2013).
- Son de menor tamaño (15kDa en comparación de 30kD de los scFv).
- Comportamiento monomérico (los scFv se dimerizan en su construcción)(Muyldermans, 2001).
- Alto nivel de expresión en bacterias y levaduras (Thomassen et al., 2005).
- Fácil inclusión en proteínas recombinantes quiméricas (Harmsen y De Haard, 2007).

- Mayor estabilidad química y térmica. Los nanoanticuerpos se desnaturalizan a 2.3-3.3 de M de cloruro de guanidinio y a 60-80°C (Dumoulin et al., 2009).
- Debido a su tamaño, los nanoanticuerpos pueden penetrar en tejidos y atravesar barreras, por ejemplo, la hematoencefálica, logrando reconocer epítomos que no son alcanzados por anticuerpos no convencionales (Abulrob et al., 2005; Lafaye et al., 2009).
- Alta afinidad de reconocimiento al antígeno (de concentraciones nano a sub-nanomolar)(Muyldermans, 2013).
- “Baja inmunogenicidad en humanos debido a su homología con los genes V (Deschacht et al., 2010).
- Unión a epítomos críticos de difícil acceso para un anticuerpo convencional (Lauwereys et al., 1998).

Es por esto que la selección y caracterización un nanoanticuerpo anti-CDH11 podría ser de utilidad en la detección, así como en la disminución de su sobreexpresión que es característica en algunos cánceres y en artritis reumatoide. Por lo que esto podría mejorar la prognosis de estas patologías.

### **1.1.5 Despliegue en fagos (Phage Display).**

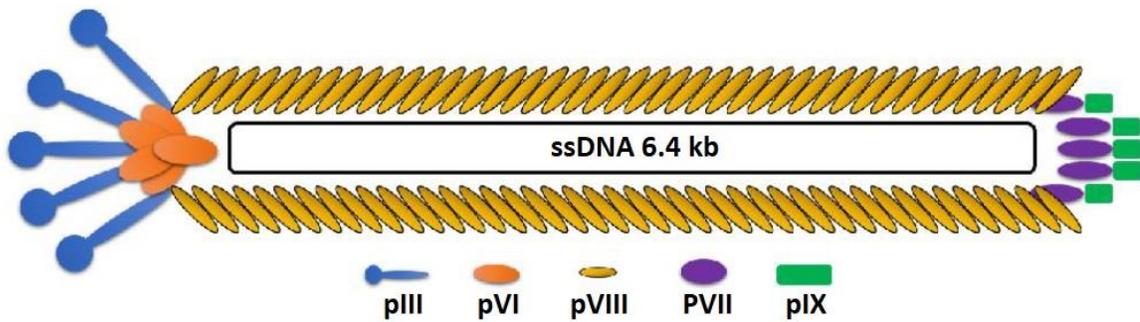
Los nanoanticuerpos recombinantes se obtienen a partir de bibliotecas de expresión de fagos (*phage display*, por sus siglas en inglés), las cuales son construidas a partir de linfocitos de camélidos inmunizados (Holliger y Hudson, 2005). Después de realizar un proceso de inmunización de 6-8 semanas es posible que el espécimen genere una respuesta de hcAbs de alta afinidad contra el antígeno. Posteriormente, a partir de la sangre periférica del espécimen inmunizado se purifica la sección donde se encuentran los linfocitos B, para amplificar los genes de la región variable de la cadena pesada del repertorio total de los anticuerpos (dominio VH y VHH). Los genes amplificados se clonan en un vector que permita la expresión del dominio VHH en fusión con una proteína de cápside del bacteriófago M13, generando de esta manera la biblioteca de nanoanticuerpos en bacteriófagos filamentosos (Arbabi Ghahroudi et al., 1997; Barbas III et al., 2001; van der Linden et al., 2000).

La posterior selección de los VHH de interés a partir de la biblioteca mencionada se realiza por medio de la interacción con el antígeno de interés inmovilizado (*panning*, por sus siglas en inglés). Debido a que es posible alcanzar una alta representatividad de la diversidad original de la biblioteca de VHH es común aislar nanoanticuerpos de alta afinidad con constantes de disociación nanomolar o subnanomolar (Pellis et al., 2012). La generación de bibliotecas VHH, en comparación con las bibliotecas derivadas de anticuerpos IgG, es mucho más eficiente. Esto se debe a que, en las bibliotecas de VHH, la especificidad se debe a un sólo dominio y una vez clonado reproduce la especificidad original. Por otra parte, en las bibliotecas derivadas de anticuerpos IgG, la especificidad depende en el apareamiento de los dominios VH y VL, y el apareamiento se pierde durante la clonación individual y, posteriormente, en el ensamble de ambos genes, los cuales resultan combinados en forma aleatoria, por lo que la especificidad original se recupera con muy baja frecuencia. Por lo que una biblioteca con una diversidad de  $10^6$  es lo suficientemente representativa del repertorio VHH, caso contrario que se necesita una biblioteca con una diversidad de  $10^9$  de clones de scFv o Fab para lograr una representatividad equivalente. La alta diversidad inherente a las bibliotecas de los VHH, hace que sea posible, en ocasiones, aislar anticuerpos contra antígenos que no fueron utilizados en la inmunización del espécimen (Tanha et al., 2001). Sin embargo, la afinidad de los nanoanticuerpos que se seleccionan de esta manera es modesta, explicando la ausencia de maduración de afinidad *in vivo*. El problema de baja afinidad puede mejorarse *in vitro* usando diversos métodos de selección (Yau et al., 2005).

La tecnología de despliegue en fagos fue desarrollada por Smith en 1985 (Smith, 1985), esta se basa en el uso de virus bacteriófagos los cuales han sido modificados para que expresen proteínas o péptidos recombinantes fusionados a alguna proteína de la cápside. Durante el proceso de ensamblaje en la membrana bacteriana, las proteínas de fusión son incorporadas a la partícula viral. Debido a que el mismo ADN que codifica para las proteínas de fusión también es empaquetado dentro de la partícula viral, se forma un nexo directo entre el ADN encapsidado (genotipo) y la proteína de fusión (fenotipo). Esta unión, en conjunto con la capacidad infectiva que es retenida por el bacteriófago, constituyen la base para la selección de clones individuales entre millones que se encuentran presentes en la biblioteca.

El bacteriófago que más se utiliza para esta técnica es el fago M13, el cual es miembro de la familia de los fagos filamentosos, los cuales reciben su nombre por su estructura alargada de aproximadamente 880 nm de largo por 6.5 nm de diámetro. Este fago puede infectar a las cepas de *E. coli* que contengan el plásmido conjugativo F, el cual, a través de su unión al pilus de la bacteria, da lugar la translocación del ADN del fago hacia el citoplasma celular. Por otra parte, en la replicación del genoma del fago participan proteínas del mismo virus, así como de la célula huésped, y su empaquetamiento da lugar a un fago que se libera al

exterior de la célula sin causar lisis alguna. EL bacteriófago M13 tiene una masa molecular de 16.3 MDa, de la cual el 87% está constituido de proteínas de cápside encargadas de encapsular al ADN de cadena sencilla ( $\approx 6.4\text{kb}$ ). El genoma del fago M13 codifica para once proteínas, las cuales cinco proteínas componen la cápside del fago y las otras seis proteínas están involucradas en la maduración del fago dentro de la *E. coli*. La cápside está formada por el ensamblaje de 2700 copias de la proteína pVIII y cinco copias de cada una de las otras cuatro proteínas de la cápside (pIII, pVI, pVII, pIX) las cuales se ubican en los extremos del fago (Figura 11). La pIII se encarga de unirse al *pilus* de la *E. coli*, iniciando el proceso de infección. Los dos dominios del extremo N-terminal de la pIII participan en el proceso de infección. Por otra parte, el extremo C-terminal ancla la proteína a la partícula viral (Barbas et al., 1991; Barbas III et al., 2001).

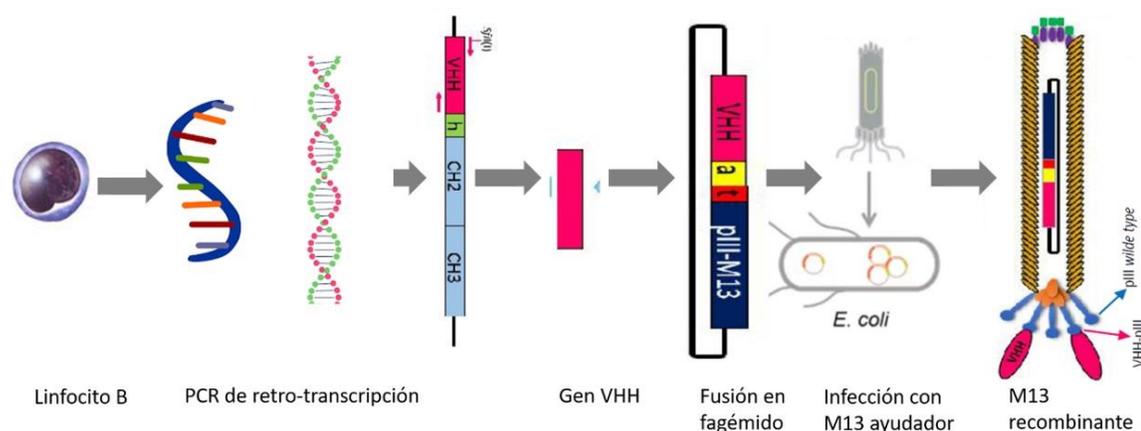


**Figura 11. Estructura del bacteriófago M13.** Esquema del bacteriófago M13 en donde se muestran las diferentes proteínas de cápside. Dentro se encuentra el ADN viral de cadena simple. El M13 presenta una estructura cilíndrica y la cápside está conformada en su mayoría por la proteína pVIII, alrededor de 2700 copias. En una de las extremidades se encuentran 5 copias de las proteínas pVII y pIX. Por otra parte, en el extremo opuesto, se ubican 5 copias de las proteínas pIII y pVI. Las proteínas pIII y pVIII son las más utilizadas para la tecnología de despliegue en fagos (Imagen modificada de Barbas III et al., 2001).

La pIII es la proteína más común para la expresión de fragmentos de anticuerpos o proteínas recombinantes grandes debido a que esta es la última proteína incorporada en el ensamblaje del fago M13, por lo que tolera la fusión de proteínas sin distorsionar la estructura de la cápside viral (Hammers y Stanley, 2014). Actualmente, las técnicas de *phage display* se basan en el uso de vectores fagémidos. Un vector fagémido, es un vector de expresión que contiene el gen de la proteína de la cápside que se usa en el despliegue con un sitio de clonación en su extremo 5' para introducir el gen de interés a expresar en una de las proteínas del fago. Además el fagémido contiene un origen de replicación "f1" que permite que la replicación del ADN y su empaquetamiento en los fagos (Arbabi Ghahroudi et al., 1997). Sin embargo; el fagémido carece de los genes responsables para realizar el empaquetamiento, y replicación de las otras

proteínas de la cápside del M13. Por lo que, una vez que el fagémido es introducido en una *E. coli*, este puede ser empacado en partículas virales si la bacteria es infectada con un fago ayudador (*helper phage*, por sus siglas en inglés) (Gupta et al., 2013). Los fagos ayudadores más utilizados son el M13K07 y el VCM13. En ambos fagos, el genoma contiene mutaciones que hacen que su propia replicación y empaquetamiento sea poco eficiente, haciendo que el fagémido sea empaquetado preferentemente, garantizando que la mayoría de las partículas virales contengan el fagémido (Vieira y Messing, 1987). Debido al tamaño menor del fagémido, estos presentan una eficiencia de transformación mayor, la cual es importante para la obtención de bibliotecas de alta complejidad. De igual manera, al obtener una partícula viral recombinante (la proteína recombinante y la nativa se incorporan a la partícula viral) se asegura que se mantenga la capacidad infectiva del fago cuando se usa la proteína pIII (Gupta et al., 2013) (Figura 12).

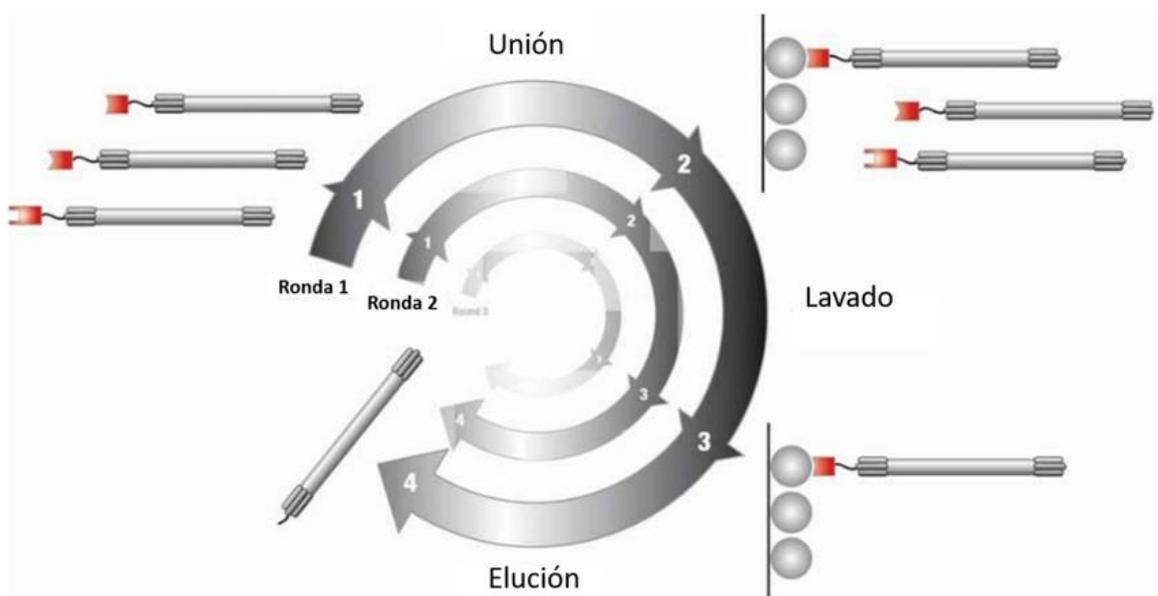
Uno de los vectores de expresión comúnmente usado es el pComb3X, el cual fue desarrollado por el laboratorio de Barbas (Barbas et al., 1991). Este vector tiene una versión truncada de la pIII, la cual carece de los dominios N-terminal vinculados al proceso de infección. Esta característica es importante debido a que la expresión de la pIII en el interior de la bacteria la hace inmune a la sobreinfección, y si la pIII se acumula debido a la presencia del fagémido pComb3X se dificulta la sobre expresión con el fago ayudador y, por ende la generación de partículas virales (Barbas III et al., 2001). De igual manera, el vector presenta una secuencia líder que dirige el VHH clonado en el extremo 5' de la pIII truncada hacia el periplasma de la bacteria, donde se encuentra un ambiente favorable para el plegamiento y formación de puentes disulfuro, los cuales son esenciales para la actividad del fragmento del anticuerpo.



**Figura 12. Obtención de bacteriófago M13 recombinante.** Una vez obtenidos los linfocitos del espécimen inmunizado, se procede a extraer el ARN para realizar un PCR de retrotranscripción y, así, amplificar el gen VHH. Posteriormente, el gen VHH se liga a un vector fagémido para transformar una cepa de *E. coli*. Después para poder amplificar bacteriófagos M13 recombinantes, se infecta con un bacteriófago ayudador. De esta manera, es posible obtener bacteriófagos que expresen el fragmento de anticuerpo VHH sobre la proteína viral pIII.

Una vez generada la biblioteca de los fragmentos de anticuerpos es importante realizar los pasos de selección, los cuales permiten aislar los clones de los fagos que expresan los fragmentos de anticuerpos con la especificidad de interés. Esto se logra incubando la biblioteca original con el antígeno de interés inmovilizado en placas, partículas magnéticas o células, para que exista la interacción antígeno/anticuerpo, seguido de exigentes etapas de lavado para remover los fagos que no hayan interactuado con el antígeno. Este proceso se conoce como *panning*. Este proceso se puede adaptar a diversas modalidades, así como el *panning in vivo* (Hammers y Stanley, 2014). Por lo general, el realizar tres rondas de selección casi el 100% de los clones evaluados son específicos para el antígeno de interés. Esto se verifica infectando a la *E. coli* con los fagos eluidos de la última ronda de selección y ensayando la reactividad de clones individuales de la bacteria. En el caso del fagémido pComb3X esto se facilita por la presencia de un codón *amber* entre el VHH y la proteína viral pIII, que la cepa de *E. coli* suprime parcialmente. Por lo que el VHH producido termina en el sobrenadante fusionado a colas peptídicas, lo cual permite seleccionarlos (Rossotti, 2015).

Es por esto, que la técnica de *phage display*, permitirá seleccionar, caracterizar y amplificar el fragmento VHH contra la Cadherina-11. El cual podría superar las dificultades que actualmente presentan los anticuerpos monoclonales.



**Figura 13. Selección del M13 recombinante contra el antígeno específico.** Clones específicos son obtenidos por medio de la interacción contra el antígeno específico, el cual está adherido a una placa o columna de alta afinidad. Los clones no específicos son eliminados por medio de una serie de lavados, seguido de la elución de los clones específicos a través del uso de una enzima con actividad proteasa. Los fagos recombinantes eluidos son amplificados para iniciar con otra ronda de selección (Imagen modificada de C. M. Y. Lee et al., 2007).

## 1.2 Justificación

La sobreexpresión de Cadherina-11 en diversas patologías (algunos tipos de cáncer y artritis reumatoide) ha hecho que se considere como un posible blanco terapéutico o de diagnóstico. Actualmente, el uso de anticuerpos monoclonales y sus fragmentos derivados (Fab) se ha utilizado para interactuar con la Cadherina mencionada anteriormente. Sin embargo, una de sus principales desventajas que presentan son el costo y las posibles reacciones anafilácticas que estos podrían ocasionar.

Debido a las características del dominio VHH, también conocido como nanoanticuerpo, su tamaño (15kDa), su quimio y termorresistencia, así como una homología de alrededor del 80% de su secuencia en comparación con los dominios VH de las Ig humanas, pueden ser considerados como excelentes candidatos para la detección y acción sobre la Cadherina-11. De igual manera, el hecho de ser una proteína recombinante pequeña de un sólo dominio, presentan la ventaja de ser producidas por la técnica de despliegue en fagos (*phage display*) usando una biblioteca con una diversidad media ( $\geq 10^6$ ), abaratando el costo de su producción. Por lo que en este proyecto se propone seleccionar y caracterizar un nanoanticuerpo contra la Cadherina-11 para el posible tratamiento y detección de las patologías mencionadas anteriormente.

## 1.3 Hipótesis

Es posible la selección y caracterización del dominio VHH que presente actividad contra la Cadherina-11 por medio de la técnica de despliegue en fagos.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo general.

Seleccionar y caracterizar dominios VHH derivados de camélidos que presenten actividad hacia la Cadherina-11.

#### 1.4.2. Objetivos específicos.

- Construcción de una biblioteca inmune de dominios VHH derivados de anticuerpos hcAb de camélidos.
- Expresar los dominios VHH sobre la proteína viral pIII mediante la técnica de *phage display*.
- Seleccionar bacteriófagos recombinantes afines a la Cadherina-11 mediante un *biopanning*.
- Corroborar la presencia del gen VHH en las cepas infectadas con los bacteriófagos recombinantes.
- Evaluar la capacidad de los fagos recombinantes de adherirse a las Cadherina-11 en línea celular MDA-MB-231.

## Capítulo 2. Metodología

### 2.1 Inmunización de espécimen.

La inmunización de la llama se realizó utilizando un péptido sintético de CDH11-EC1 (secuencia indicada en la sección de Anexos) (Syverson et al., 2011), la cual fue encapsidada en partículas virales de CCMV y BMV. El espécimen se inmunizó con 200 µg por aplicación, realizado una vez por semana. El procedimiento de inmunización se realizó por 6 semanas (Figura 14.A).

#### 2.1.1 Obtención de linfocitos.

Después de haber transcurrido 5 días de la última inmunización, se recolectaron 100 mL de la sangre periférica de la llama. Esta se recolectó en un tubo de 500 mL en los cuales contenían EDTA y se mezcló homogéneamente para evitar su coagulación (Figura 14.B). Para la obtención de los linfocitos se utilizó el kit *Lymphoprep*. Primeramente, la sangre recolectada se diluyó con solución salina en una relación 1:1. Después, se agregaron 10 mL del reactivo *Lymphoprep* en un tubo de 50 mL y, después, se agregaron 30 mL de la sangre previamente diluida. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 800 G, a temperatura ambiente, por 20 minutos. Posteriormente, con una pipeta Pasteur, se retiró la interfase formada, que es donde se encuentran los linfocitos (Figura 14.C).



**Figura 14. Extracción y obtención de linfocitos.** (A) Llama utilizada para el proceso de inmunización. (B) Proceso de obtención de la sangre periférica, en la cual se obtuvo a partir de la arteria cercana a la yugular. (C) Sangre periférica diluida en combinación con el reactivo *Lymphoprep*.

## 2.2 Obtención de la biblioteca inmune.

Para la obtención de la biblioteca inmune se tomó como base la metodología propuesta por Pardon y colaboradores en 2014 (Pardon et al., 2014a).

### 2.2.1 Extracción de ARN total.

Para la extracción de ARN se utilizaron 200  $\mu$ L de linfocitos, los cuales fueron diluidos en 2 mL de buffer PBS (0.24 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.41 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.2 g de KCl y 8 g de NaCl) y se centrifugó a 800 G, por 20 minutos, a 4°C. Posteriormente, se retiró el sobrenadante cuidadosamente con micropipeta. Los pellets formados fueron lavados con 1 mL de PBS y se centrifugó a las mismas condiciones anteriormente mencionadas. El sobrenadante se descartó con micropipeta y los tubos se dejaron secando a temperatura ambiente.

Para el aislamiento de RNA se utilizó un buffer de lisis (23.6 g de guanidina-HCl, 0.37 g de ácido cítrico y 0.25 de N-Laurylsacarosina disueltos en 50 mL de agua libre de ARNasas) el cual se le agregó 1 mL a cada pellet. Posteriormente, con una jeringa 21-G se lisaron las células y se fragmentó el ADN genómico pasando la solución por la jeringa mínimo 6 veces. Posteriormente, la solución se colocó en un tubo Falcon estéril de 15 mL. Después se agregaron 200  $\mu$ L de acetato de sodio 2M (pH 4.0) y 2 mL de la solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (50:24:1), se agitó bien manualmente y se dejó incubando en hielo por 10 minutos. La mezcla se centrifugó a 3200 G, por 10 minutos, a 4°C. Luego, se tomó la parte superior de la interfase formada en el tubo (que es la que contiene el ARN) y se pasó a un tubo estéril de 15 mL y se agregaron 2 mL de la solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (50:24:1) se dejó incubando y se centrifugó a las mismas condiciones. Posteriormente, se tomaron 2 mL de la parte superior de la interfase formada y se transfirieron a un tubo Falcon de 15 mL y la solución se dividió en 4 tubos de microcentrífuga estériles de 1.5 mL. Después, a cada tubo se agregaron 500  $\mu$ L de etanol al 100 % frío, se mezcló manualmente y los tubos se guardaron a -80°C por toda la noche. Después, los tubos se centrifugaron a 20,000 G por 20 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se descartaron con micropipeta y los pellets se dejaron secar a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, cada pellet se le agregaron 20 mL de agua libre de ARNasas y se dejaron incubando por 5 minutos a temperatura ambiente. Todas las muestras se recolectaron en un solo tubo de microcentrífuga. Finalmente, se midió la concentración por espectrofotometría a 260 nm utilizando un espectrofotómetro *Nanodrop*.

### 2.2.2 Síntesis de ADNc.

Para la síntesis del ADNc se utilizó el kit *SuperScript<sup>TM</sup> III First-Strand Synthesis SuperMix*. EL proceso consistió en agregar los siguientes componentes en el siguiente orden:

**Tabla 1. Componentes utilizados para la alineación de los nucleótidos libres sobre la cadena de ARN.** Las cantidades de los componentes fueron utilizados de acuerdo a las recomendaciones del proveedor.

Componente	Cantidad 1rxn (µL)	Cantidad 5 rxn (µL)
Agua libre de RNAsas	5	25
Buffer de alineamiento	1	5
Hexámeros aleatorios	1	5
RNA total (no más de 5 µg)	1	5

Posteriormente, la muestra se incubó a 65°C por 5 minutos en un termociclador, se incubo en hielo por al menos 1 minuto y posteriormente se agregaron los siguientes componentes sobre el tubo de microcentrífuga en el siguiente orden:

**Tabla 2. Componentes utilizados para la síntesis de ADNc y eliminación de la cadena de ARN.** Las cantidades de los componentes fueron utilizados de acuerdo con las recomendaciones del proveedor.

Componente	Cantidad 1rxn (µL)	Cantidad 5 rxn (µL)
<i>Buffer 2x First Strand reaction mix</i>	10	50
<i>SuperScript III/RNase OUT Enzyme Mix</i>	2	10

Después, la muestra se agitó y se centrifugó brevemente, y se incubó de la manera siguiente: 10 minutos a 25°C, seguido de 50 minutos a 50°C y, finalmente, 5 minutos a 85°C. Las muestras se guardaron a -20°C.

### 2.2.3 Diseño de oligonucleótidos para amplificación del fragmento VHH.

Para poder realizar la amplificación del gen VHH que contenga los sitios de restricción *SfiI* fue necesario el diseño de nuevos oligonucleótidos. Para esto se tomaron como base unos oligonucleótidos reportados previamente (Pardon et al., 2014). Posteriormente, los oligonucleótidos fueron modificados con el fin de reducir el porcentaje de GC y la temperatura de fusión ( $T_m$ , por sus siglas en inglés). Finalmente, se tomó

una secuencia de un gen VHH previamente reportado (Maffey et al., 2016) y el fagémido pComb3xSS para realizar las simulaciones de la clonación usando el programa *SnapGene*.

## 2.2.4 Amplificación del fragmento VHH mediante la técnica de PCR anidado.

### 2.2.4.1. PCR anidado con oligonucleótidos CALL001 y CAL002.

Una vez obtenido el ADNc, se procedió a realizar la técnica de PCR anidado, el primer PCR consistió en utilizar lo oligonucleótidos conocidos como CALL001 y CALL002 (secuencia mostrada en la sección de anexos). Por lo que se agregaron los siguientes componentes en el siguiente orden, como lo muestra la siguiente tabla:

**Tabla 3. Componentes utilizados para PCR con los oligonucleótidos CALL001 y CALL002.** Se utilizó el *NEB phussion polymerase kit*.

Componente	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Agua-MQ	36
Buffer-GC	12
DNTPs (10mM)	1.5
CALL001 (10 $\mu\text{M}$ )	3
CALL002 (10 $\mu\text{M}$ )	3
ADNc (100 ng/ $\mu\text{L}$ )	2
DMSO (100%)	2
<i>Polimerasa Phussion</i>	0.5

Una vez adicionados los reactivos, se ajustaron las condiciones del termociclador, como lo muestra la siguiente tabla:

**Tabla 4. Condiciones utilizadas en el termociclador para el PCR usando los oligonucleótidos CALL001 y CALL002**

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	98°C	3 min
30	98°C	30 s
	55.9°C	30 s
	72°C	35 s
1	72°C	7 min

Los productos de PCR fueron analizados por medio de un gel de agarosa al 1%. Posteriormente, se procedió a realizar la purificación del producto de PCR utilizando el *zymoresearch Gel DNA Kit*.

#### 2.2.4.2 PCR VHHBACK-*Sfi*I y VHHFOR-*Sfi*I.

El producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos CALL001 y CALL002 se utilizó como templado para poder realizar el siguiente PCR. Los componentes, que comprenden a las reacciones de PCR, se agregaron en el siguiente orden, como se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 5. Componentes utilizados para PCR con los oligonucleótidos VHHBACK-*Sfi*I y VHHFOR-*Sfi*I.** Se utilizó el *Thermo Phussion Polymerase kit*.

Componente	Volumen ( $\mu$ L)
Agua-MQ	19
Buffer-GC (5x)	6
DNTPs (10mM)	0.75
VHHBACK- <i>Sfi</i> I (10 $\mu$ M)	1
VHHFOR- <i>Sfi</i> I (10 $\mu$ M)	1
ADN CALL00 (30 ng/ $\mu$ L)	1
DMSO (100%)	1
Polimerasa <i>Phussion</i>	0.3

Posteriormente, las reacciones se pusieron en el termociclador con las condiciones mostradas en la siguiente tabla:

**Tabla 6. Condiciones utilizadas en el termociclador para el PCR usando los oligonucleótidos VHHBACK-*Sfi*I y VHHFOR-*Sfi*I.**

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	98°C	3 min
28	98°C	30 s
	65°C	30 s
	72°C	10 s
1	72°C	7 min

Posteriormente, los productos de PCR fueron analizados por un gel de agarosa al 1%, Después, se realizó la purificación del producto de PCR por medio del *zymoresearch Gel DNA Kit*.

## 2.2.5 Digestión del fagémido pComb3XSS y fragmento VHH.

### 2.2.5.1 Digestión del fagémido pComb3XSS.

La digestión del vector se realizó por medio de la enzima de restricción *Sfil*. La reacción se llevó a cabo agregando los componentes en el siguiente orden, como se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 7. Componentes utilizados para llevar a cabo la reacción de digestión del vector pComb3xSS.**

Componente	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Agua-MQ	38
Buffer-CutSmart	5
pComb3xSS (163ng/uL)	6
<i>Sfil</i> (40U/uL)	1

Posteriormente, la reacción se dejó en incubación a 50°C por 4 horas. Después, la digestión se analizó mediante un gel de agarosa al 1%. De igual manera, el vector digerido se purificó con el *GenElute Gel Extraction Kit*.

### 2.2.5.2 Digestión del gen VHH-*Sfil*.

Debido a la baja concentración del fragmento VHH obtenido de la purificación, se optó por digerir toda la muestra obtenida. Por lo que se agregaron los componentes en el siguiente orden, como se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 8. Componentes utilizados para llevar a cabo la reacción de digestión del fragmento VHH.**

Componente	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Agua-MQ	4
Buffer-CutSmart	5
VHH (30ng/ $\mu\text{L}$ )	40
<i>Sfi</i> I (40U/ $\mu\text{L}$ )	1

De igual manera, la reacción se incubó por 1 hora. Esta digestión no fue posible analizarla por medio de un gel de agarosa debido a que el cambio en el tamaño es mínimo. Finalmente, el fragmento VHH digerido fue purificado por medio del *GenJet PCR Purification Kit*. La integridad del fragmento VHH purificado se analizó por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

### 2.2.6 Ligación del fagémido pComb3XSS y fragmento VHH a pequeña escala.

Primeramente, se realizó un cálculo para poder realizar la reacción de ligación a las concentraciones molares adecuadas de cada uno de los componentes. Para esto se procedió a calcular el número de copias de ADN que se tenían tanto de pComb3xSS como de VHH. Para esto se utilizó la siguiente fórmula:

$$No. copias de ADN = \frac{(concentración de ADN)(6.023 \times 10^{23} copias ADN/mol)}{(\#pb)(660 g/mol)(1 \times 10^9 ng/g)} \quad (1)$$

En donde, #pb es el tamaño del ADN y el valor de 660 g/mol es el peso promedio de un par de bases (pb).

Una vez calculado el número de copias, tanto del vector pComb3xSS como el fragmento VHH, se procedió a realizar la reacción de ligación agregando los componentes en el siguiente orden (teniendo una relación molar de vector fragmento 1:3), como se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 9. Componentes utilizados para llevar a cabo la reacción de ligación del fragmento VHH.**

Componente	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Agua-MQ	13.5
Buffer T4 ligasa	2
pComb3xSS dig. (70 ng/ $\mu\text{L}$ )	1
VHH dig (8 ng/ $\mu\text{L}$ )	3
Ligasa T4	0.5

La reacción se dejó en incubación a 16°C por 16 horas y después se inactivó la enzima T4 incubando la reacción a 65°C por 10 minutos. El producto de la ligación se analizó por medio de un gel de agarosa al 1%.

### 2.2.7 Clonación en células competentes 5 $\alpha$ F'.

Se utilizaron las células 5-alphaF' de la compañía NEB, las cuales tienen una eficiencia reportada de  $1-3 \times 10^9$  ufc/ $\mu\text{g}$ . Para esto, la alícuota de células competentes se descongeló en hielo por 10 min. Después se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de la ligación y se resuspendió muy suavemente. Después la alícuota se incubó en hielo por 30 min. Posteriormente, a las células competentes se les aplicó un choque térmico a 42°C por 30 s y se colocaron en hielo por 5 min. Posteriormente, se les agregaron 950  $\mu\text{L}$  de medio SOC a temperatura ambiente y se dejaron incubando a 37°C, por 60 min, a 250 rpm. Después se realizaron diluciones a  $10^{-10}$ ,  $10^{-100}$  y  $10^{-1000}$  para ser sembrados 100  $\mu\text{L}$  en placas de LB sólido, suplementadas con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina y glucosa al 2%. Finalmente, las placas se incubaron a 37°C por 16 horas.

### 2.2.8 PCR de colonia.

En esta parte se escogieron 20 colonias al azar. Estas fueron tomadas con una punta estéril y cada una de las colonias se resuspendió en 45  $\mu\text{L}$  de agua Mili-Q. Posteriormente, se realizaron 20 reacciones (1 reacción para cada colonia) utilizando el *Ready Mix taq PCR Reaction Mix*, por lo que se agregaron las siguientes cantidades en el siguiente orden, como se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 10. Componentes utilizados para realizar el PCR de colonia.** Las cantidades fueron adicionadas acorde al manual del producto.

Componente	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Agua-MQ	32
Ready Mix	150
VHHBACK-Sfil (10 $\mu\text{M}$ )	9
VHHFOR-Sfil (10 $\mu\text{M}$ )	9

Después, se realizaron 20 alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  cada una y a cada alícuota se le agregaron 5  $\mu\text{L}$  de cada colonia resuspendida previamente. Posteriormente, las reacciones se pusieron en el termociclador y se ajustaron las condiciones, como se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 11. Condiciones utilizadas en el termociclador para el PCR de colonia.**

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95°C	3 min
27	94°C	30 s
	65°C	30 s
	72°C	30 s
1	72°C	7 min

Finalmente, los productos de PCR se analizaron por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

### 2.2.9 Ligación del fagémido pComb3XSS y el fragmento VHH a gran escala.

Posteriormente, toda la muestra obtenida de la ligación (20  $\mu\text{L}$ ) fue utilizada, se dividió en 4 alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  cada una para transformar las células 5-alphaF'. El protocolo de transformación utilizado fue el mismo que se mencionó anteriormente. Sin embargo; se sembró 1 mL en placas de 150 mm de diámetro.

Posteriormente, se realizó la recuperación de las colonias. Para esto, se agregaron 2 mL de medio LB a cada placa y se recuperaron las colonias utilizando una espátula. Después, se agregó otro mL de LB y se

repitió el proceso. Posteriormente, se tomaron 100  $\mu$ L de las colonias recuperadas y se diluyó en 1 mL de medio LB para posteriormente medirlo por espectrofotometría a 600 nm la cantidad de células. A las colonias recuperadas se les agregó glicerol al 20% volumen final y se prepararon alícuotas de 150  $\mu$ L para almacenarlas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **2.3 Expresión del dominio VHH en bacteriófagos mediante la técnica de despliegue en fagos.**

### **2.3.1 Amplificación del bacteriófago ayudador VCM13.**

Para la amplificación del bacteriófago ayudador primero se crecieron células 5 $\alpha$ F' a una densidad óptica ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ) entre 0.5-0.6 a  $37^{\circ}\text{C}$  a 200 rpm. Después, se tomaron 10 mL y se infectaron con 30  $\mu$ L de VCM13 a  $3.7 \times 10^{12}$  viriones/mL (aproximadamente 10 bacteriófagos por célula), se agitó y se dejó en incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  por 90 minutos sin agitación. Después, este se centrifugó a  $2800 \times G$  a temperatura ambiente por 10 minutos y se decantó cuidadosamente. Posteriormente, el pellet se resuspendió con 50 mL de medio 2xTY suplementado con 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de kanamicina y se dejó en incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  por 16 horas.

La muestra se transfirió a un tubo falcón de 50 mL y se centrifugó a  $3200 \times G$  por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se transfirió el sobrenadante en volúmenes de 40 mL a tubos falcón de 50 mL y se le agregaron 10 mL de la solución PEG 6000 al 20%/2.5 M NaCl (relación 4:1). Estos tubos se agitaron 20 veces, moviéndolos arriba y abajo, y se dejaron en incubación a  $4^{\circ}\text{C}$  por toda una noche.

Posteriormente, la muestra se pasó a tubos de centrifuga y se centrifugaron a 12,000 G por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se realizó la decantación y los pellets se volvieron a centrifugar a 4,000 rpm y se volvió a decantar. Después, los pellets se resuspendieron en 1 mL de PBS. Después, brevemente se centrifugó y el sobrenadante se pasó a un tubo de microcentrifuga. A cada mL se agregaron 250  $\mu$ L de PEG 6000 al 20% con 2.5 M de NaCl, se agitó de la misma manera mencionada anteriormente, y se dejaron incubando en hielo por 60 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 20,000 G por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y se decantaron. Cada pellet se resuspendió con 1 mL de PBS. De igual manera, se realizó una breve centrifugación y el sobrenadante se colocó en un tubo de microcentrifuga previamente esterilizado. Finalmente, se calculó la concentración por medio de espectrofotometría, midiendo a 269 nm y 320 nm.

### 2.3.2 Amplificación a partir de la biblioteca inmune.

Primero, se inocularon 6 unidades (donde cada unidad es una alícuota recuperada de la sección 2.2.9) de la librería inmune en 50 mL de medio 2xTY suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y 2% de glucosa. Estas se crecieron hasta una densidad óptica ( $DO_{600nm}$ ) de entre 0.5 a 0.6 a 37°C y a una agitación de 200 rpm. Posteriormente, se siguió la metodología de la misma manera tal como se indica en la sección 2.3.1.

### 2.3.3. Rondas de selección.

Para este experimento, primeramente, en una placa de 96 pozos *Maxisorp Nunc* se adicionaron 50 µL del péptido sintetizado CDH11-EC1 (0.02 µg/µL) a cada pozo y se dejó a 4°C por una noche. Posteriormente, cada pozo se lavó con 200 µL de PBST (PBS + tween20 al 0.05%) y se dejó en incubación, con agitación constante, por 5 min (este proceso se realizó tres veces). Después, a cada pozo, se agregaron 300 µL de buffer BSA al 2% (PBST + BSA) y se dejó en incubación, en agitación constante, por dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron lavados con PBST de la misma manera mencionada anteriormente.

Una vez finalizados los lavados, se agregaron 50 µL de los bacteriófagos amplificados a partir de la biblioteca inmune a una concentración de  $1.5 \times 10^9$  viriones/µL (Ronda 0) y se dejó en incubación, en agitación constante, por 2 horas a temperatura ambiente. De igual manera, se realizaron los lavados con PBST a las mismas condiciones que se mencionó anteriormente, sin embargo; este proceso se realizó diez veces.

Una vez finalizados los lavados se procedió a realizar la elución de los bacteriófagos recombinantes. Para esto se agregaron 50 µL de tripsina (10mg/mL, disuelta en PBS) a cada pozo y se dejó en incubación, en agitación constante, por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, los bacteriófagos eluidos se transfirieron a un tubo de microcentrífuga que contenían inhibidor de tripsina (7mg/mL, disuelta en PBS). Después, se tomaron 50 µL de los bacteriófagos eluidos para infectar 3 mL de células 5αF' a una  $DO_{600nm}$  entre 0.5-0.6 y se dejó en incubación a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, se agregaron 7 mL de medio LB y se suplementó con 100 µg/mL de ampicilina y 2% de glucosa y se dejó en crecimiento a 37°C, a 170 rpm, por una noche. Finalmente, se agregó glicerol a 20% volumen final y se alicuotó en volúmenes de 1 mL y se guardaron a -80°C. De esta manera se obtuvo la sub-biblioteca 1.

Para las siguientes rondas, se realizó el mismo procedimiento mencionado en la sección 2.3.2 exceptuando que ahora se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de la sub-biblioteca a 50 mL de medio 2xTY suplementado con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina y glucosa al 2%. De igual manera, el procedimiento mencionado en esta sección se realizó de la misma manera, exceptuando que se aumentaron la cantidad de lavados después de adicionar e incubar los bacteriófagos (10 lavados extras por cada ronda de selección extra). Finalmente, se realizaron tres rondas de selección, por lo que se obtuvieron 3 sub-bibliotecas.

### 2.3.4 Titulación de los bacteriófagos recombinantes.

Una vez obtenidos los bacteriófagos amplificados de cada ronda de selección se procedió a realizar la titulación de cada una de estas. Para esto primero se agregaron 2  $\mu\text{L}$  de  $5\alpha F'$  en 7 mL de medio LB suplementado con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tetraciclina y se dejó en incubación a  $37^\circ\text{C}$ , a 200 rpm, por 16 horas. Después se agregó 1 mL del pre-inoculo a 10 mL de medio LB suplementado con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se dejó en incubación a las mismas condiciones mencionadas anteriormente hasta obtener una  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  entre 0.5-0.6 y el inoculo se dejó en hielo.

Los bacteriófagos recombinantes se diluyeron con PBS en una placa de 96 pozos, hasta llegar a una dilución de  $10^{-12}$ . Posteriormente, se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de cada una de las diluciones  $10^{-6}$ ,  $10^{-9}$  y  $10^{-12}$  de los bacteriófagos recombinantes para infectar 90  $\mu\text{L}$  de las células  $5\alpha F'$  y se dejó en incubación a  $37^\circ\text{C}$ , sin agitación, por 30 minutos. Después, se realizó la siembra de cada una de las células infectadas sobre medio LB solido suplementado con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina y se dejaron en incubación a  $37^\circ\text{C}$  por 16 horas. Finalmente, se realizó el conteo de las colonias lisogénicas formadas mediante la siguiente fórmula:

$$ufp/\mu\text{L} = \frac{\# \text{placas contadas}}{(\text{volumen de infección}) * (\text{dilución})} \quad (2)$$

### 2.3.5 Cuantificación de los bacteriófagos recombinantes.

La cuantificación de los bacteriófagos recombinantes fue realizada por medio de espectrofotometría. Para esto, se utilizó NanoDrop y se midió en dos absorbancias diferentes: en 269 nm y 320 nm. Después se

utilizó la siguiente ecuación (Sambrook, J. Rissell, 2001) para calcular la concentración de los bacteriófagos en ng/μL:

$$\frac{ng}{\mu L} = \frac{A_{269} - A_{320}}{3.84} (1000) \quad (3)$$

De igual manera se utilizó la siguiente ecuación (Sambrook, J. Rissell, 2001) para la cuantificación del bacteriófago M13 en viriones/mL:

$$\frac{A_{269} - A_{320}}{\text{No.de bases por virion}} (6 \times 10^{16}) \quad (4)$$

### 2.3.6 Ensayo ELISA de los bacteriófagos recombinantes.

Para este ensayo, primeramente, se preparó una placa *Maxisorp Nunc* como se menciona en la sección 2.3.3. Posteriormente, cada pozo se lavó con 200 μL de PBST y se dejó en incubación, en agitación constante, por 5 minutos a temperatura ambiente (este proceso se repitió tres veces). Después a cada pozo se agregaron 300 de BSA al 2% y se dejó en incubación, en agitación constante, por dos horas. Posteriormente, se realizaron los lavados de cada pozo a las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Después se adicionaron 50 μL de los bacteriófagos recombinantes y el VCM13 como control negativo (todos se ajustaron a una concentración de  $1.5 \times 10^9$  viriones/μL) y se dejaron en incubación, en agitación constante por una hora. De igual manera, se realizaron los lavados a cada pozo a las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Posteriormente, se adicionaron 50 μL del anticuerpo *anti-M13-pVIII-HRP* (1:1000, diluidos en BSA al 2%) a cada uno de los pozos y se dejó en incubación por 1 hora, en agitación constante, a temperatura ambiente. De igual manera, los lavados se realizaron a las mismas condiciones mencionadas anteriormente, exceptuando que este proceso se repitió 6 veces. Posteriormente, a cada pozo se adicionaron 50 μL de *TMB-One-Step-Turbo* y se dejó en incubación a temperatura ambiente por 20 minutos. Finalmente, a cada pozo se adicionaron 50 μL de ácido sulfúrico 2M para detener la reacción colorimétrica y cada pozo se midió en el espectrofotómetro a 465 nm.

## 2.4 Evaluación del bacteriófago recombinante contra las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7.

### 2.4.1 Ensayo de inmunofluorescencia de los bacteriófagos recombinantes.

Una vez amplificados los bacteriófagos recombinantes se procedió a realizar un marcaje con isotiocianato de fluoresceína (*FITC*, por sus siglas en inglés). Para esto, primero se realizó el cálculo para adicionar 200 moléculas de *FITC* por bacteriófago recombinante. Por lo que se utilizó la siguiente fórmula:

$$m_{FITC} = 200 \frac{Concen_{M13} * Vol_{M13}}{PM_{M13}} PM_{FITC} \quad (3)$$

Después, se realizó un stock de *FITC* a 1mg/mL diluido en DMSO al 100%. Una vez adicionado el *FITC*, los bacteriófagos recombinantes se dejaron en incubación por dos horas en rotación constante en tubos cubiertos con aluminio para evitar que el fluoróforo se dañara. Posteriormente, para eliminar el *FITC* no unido al bacteriófago la muestra fue ultrafiltrada utilizando los filtros *Amicon-Ultra* de 100 KDa (Millipore), La muestra se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos y se adicionó 400  $\mu$ L de PBS y se volvió a centrifugar a las mismas condiciones, este proceso se repitió 3 veces para eliminar cualquier resto de *FITC* no unido al bacteriófago. Después, los fagos recombinantes se aforaron con PBS a un volumen final de 100  $\mu$ L y se cuantificaron utilizando las expresiones de las ecuaciones 3 y 4 después de ser medidas por *NanoDrop*.

Posteriormente, se prepararon cubreobjetos con poli-L-lisina, en los cuales se adicionaron 500  $\mu$ L a cada uno y se dejaron en incubación hasta que la poli-L-lisina se seque completamente. Después se adicionaron 6000 células de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7, a cada uno de los cubreobjetos previamente tratados, y se dejaron en incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con 1 mL PBS y se adicionaron los bacteriófagos recombinantes previamente tratados con *FITC*, dejándolos en incubación por 2 horas a temperatura ambiente. Después, se volvieron a realizar tres lavados con 1 mL PBS y procedió a fijar las células adicionando 500  $\mu$ L de para-formaldehído al 4% a cada uno de los cubreobjetos y se dejaron a 4°C por una noche. Posteriormente, se realizaron tres lavados con 1 mL de PBS. Después se adicionó 500  $\mu$ L del fluoróforo *HOECHST* para marcar el núcleo y se dejó en incubación por 15 minutos a temperatura ambiente. De igual manera, se realizaron tres lavados con PBS, como se menciona anteriormente. A su vez, se adicionaron 500  $\mu$ L del anticuerpo anti-CDH11 (1:1000), derivado de ratón, a cada uno de los cubreobjetos y se dejó en incubación por 1 hora. Posteriormente, se adicionaron 500  $\mu$ L del anticuerpo secundario *Alexafluor 594 anti-mouse* (1:500) y se dejó en incubación

por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las células fueron visualizadas por medio de microscopía confocal.

#### **2.4.2 Ensayo de viabilidad celular de los bacteriófagos recombinantes en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7.**

Para este experimento, primeramente, se sembraron 6000 células por pozo de la línea celular MDA-MB-231, así como de la línea celular MCF-7 con medio de cultivo (DMEM, bicarbonato de sodio 2%, suplementado con antibiótico y antimicótico) en una placa de 96 pozos y se dejaron en incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Posteriormente, los bacteriófagos recombinantes y el VCM13 se concentraron con los concentradores *Amicon-Ultra* siguiendo la metodología mencionada en la sección 2.4.1 Después se aplicaron los siguientes tratamientos en cada una de las líneas celulares previamente mencionadas (PBS, VCM13, molécula sintética CDH11-10µM y los bacteriófagos recombinantes de cada ronda de selección), los cuales fueron diluidos con medio de cultivo y se dejaron en incubación a las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

Al día siguiente, las células fueron lavadas 2 veces con 1 mL de PBS y se agregaron 10 µL de reactivo MTT por pozo y 90 µL de medio de cultivo y se dejaron en incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por tres horas. Posteriormente, se adicionaron 100 µL de isopropanol al 100% por pozo y se resuspendió hasta disolver los cristales de formazán. Finalmente, la placa se mantuvo en total oscuridad por 25 minutos y se midió por espectrofotometría a 570 nm (absorbancia de reactivo MTT) y 690 nm (absorbancia del medio de cultivo).

## Capítulo 3. Resultados

---

### 3.1 Extracción de ARN total a partir de los linfocitos purificados.

Una vez que los linfocitos fueron purificados a través del kit *Lymphoprep* se extrajo el ARN total de estos, obteniendo una concentración de 2.26  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , con una relación  $A_{260}/A_{280} = 1.93$  y una relación  $A_{260}/A_{230} = 2.3$ . A partir de estos resultados se procedió a realizar la síntesis del ADNc.

### 3.2 Síntesis del ADNc.

Posteriormente, para la síntesis del ADNc se utilizó el kit *SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix*. Se utilizaron hexámeros aleatorios como oligonucleótidos debido a que se buscó realizar la síntesis en ADNc del ARN total de los linfocitos. Obteniendo una concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y una relación  $A_{260}/A_{280} = 1.61$ .

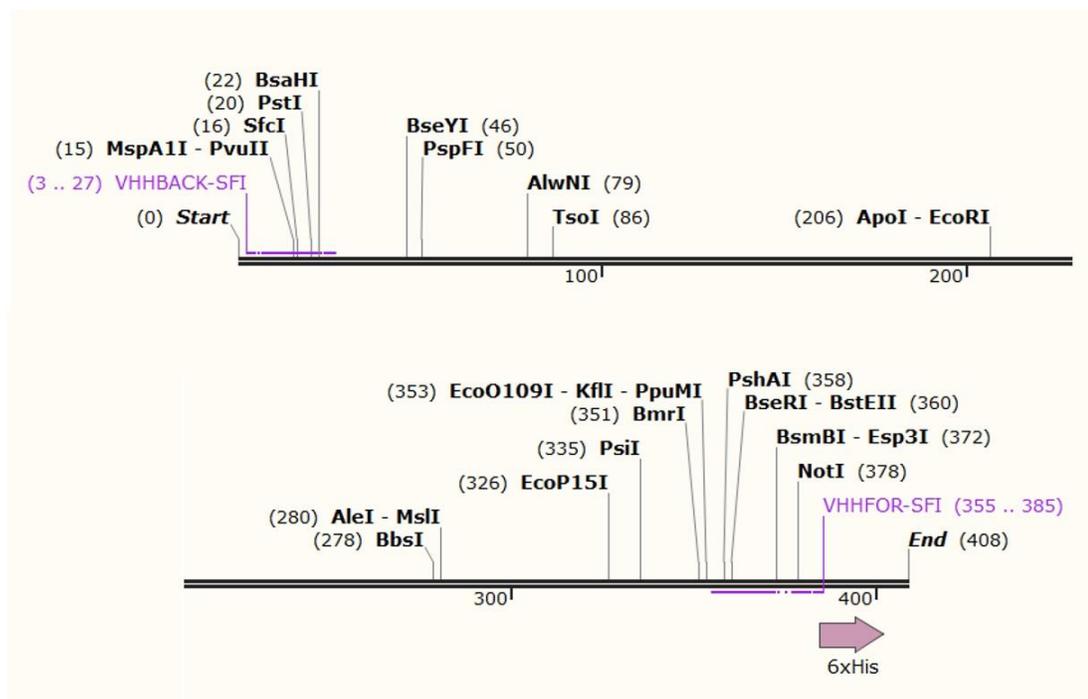
### 3.3 Diseño de oligonucleótidos para amplificación del fragmento VHH.

Utilizando los oligonucleótidos previamente reportados en la literatura (Pardon et al., 2014), mediante el programa *SnapGene* se diseñaron los siguientes oligonucleótidos que se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 12. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del fragmento VHH.** El diseño de los oligonucleótidos se realizó por medio del programa *SnapGene*.

Oligonucleótido.	Secuencia.
VHHBACK- <i>Sfi</i> I	5'-TAAGTAGGCCAGGCGGCCGATGTGCAGCTGCAGGAGTCT-3'
VHHFOR- <i>Sfi</i> I	5'-TAAGTAGGCCGGCCTGGCCGCTGGAGACGGTGACCT-3'

Acorde al programa *SnapGene*, el porcentaje de GC% para los oligonucleótidos VHHBACK-*SfiI* y VHHFOR-*SfiI* fue de 64% y 67%, respectivamente. De igual manera, la longitud de los oligonucleótidos VHHBACK-*SfiI* y VHHFOR-*SfiI* fue de 40 y 36 bases, respectivamente. Y en ambos oligonucleótidos, de acuerdo con la simulación con el fragmento VHH utilizado, se obtuvo que 23 bases se unen en el extremo del fragmento VHH (Figura 15). Además, las bases resaltadas en color rojo indican la zona de corte por la enzima de restricción *SfiI*, necesarias para la clonación del fragmento VHH en el fagémido pComb3XSS. Finalmente, el producto de PCR fue amplificado por medio del *SnapGene* obteniendo un tamaño aproximado de 400 bp.



**Figura 15. Fragmento VHH anti-Vp6.** La secuencia del fragmento VHH se utilizó para simular el alineamiento de los oligonucleótidos diseñados por medio del programa *SnapGene*, notando que cada uno se alinea en las zonas conservadas de la secuencia VHH (resaltado en color morado). El número de bases alineadas al fragmento VHH fue de 23 para ambos oligonucleótidos.

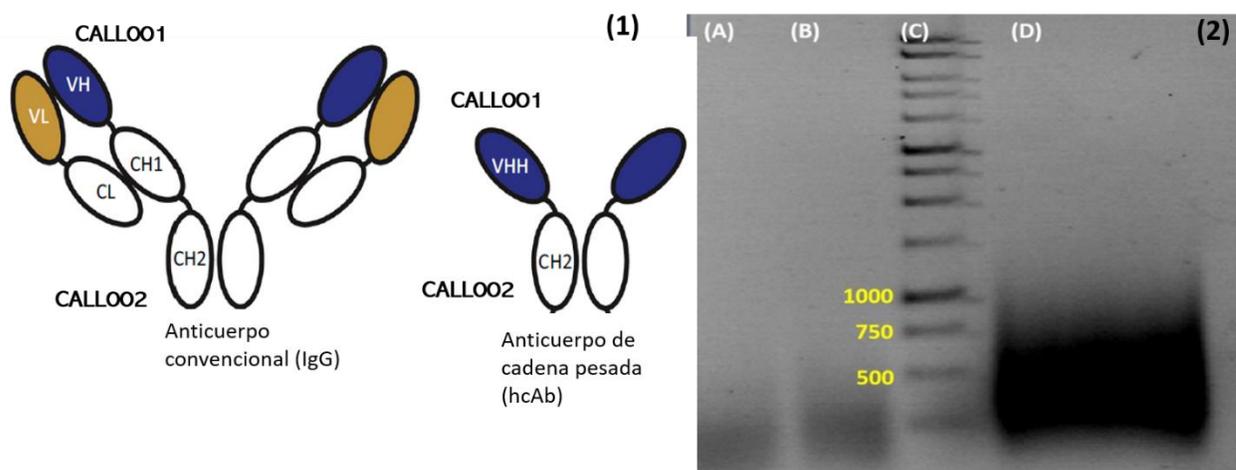
### 3.4 Amplificación del fragmento VHH mediante la técnica de PCR anidado.

La amplificación del fragmento VHH se realizó por medio de la técnica de PCR anidado. Esto consistió en realizar dos PCR con dos pares de oligonucleótidos diferentes.

### 3.4.1 Amplificación del fragmento hcAb.

De acuerdo con la literatura, los oligonucleótidos CALL001 y CALL002 permiten la amplificación de los genes de los IgG como los hcAb. Esto ocurre debido a que el oligonucleótido CALL001 se une al templado de los genes VH y VHH que son homólogos a los genes VH humanos. Por otra parte, el oligonucleótido se une a la parte conservada de la secuencia CH2 de los IgG de cadenas pesadas (Figura 16.1) (Pardon et al., 2014).

Para la primera PCR, se utilizó como templado el ADNc y los oligonucleótidos CALL001 y CALL002. El tamaño del producto de PCR obtenido fue de múltiples regiones inespecíficas, obteniendo amplificación desde los 200 pb hasta los 1000 pb, aproximadamente (Figura 16.2.D).



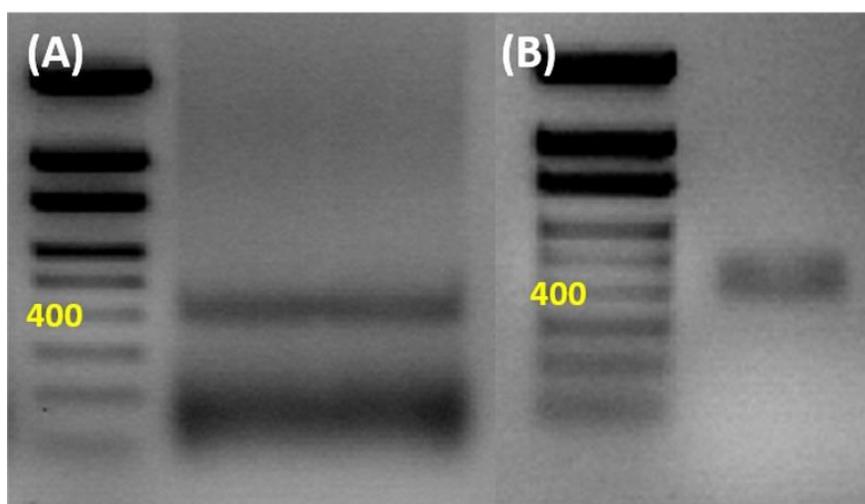
**Figura 16. Producto de PCR utilizando los oligonucleótidos CALL001 y CALL002.** (1) Representación esquemática de las regiones que los oligonucleótidos CALL001 y CALL002 amplifican. Estos amplifican las regiones tanto del dominio VH como el dominio VHH y el dominio CH2 (2). (A) En este carril se utilizó H<sub>2</sub>O-MQ como control en lugar del DNAc sin obtener ninguna amplificación. (B) En este carril se utilizó el ADN genómico de *Neurospora Crassa*. (C) Marcador de peso molecular de rango de 250-10,000 pb. (D) Producto de PCR amplificado con los oligonucleótidos CALL001 y CALL002. Las muestras fueron visualizadas en un gel de agarosa al 1%.

Para verificar la veracidad de la amplificación del producto de PCR se utilizaron dos controles diferentes: H<sub>2</sub>O Milli-Q (Figura 16.A) y el ADN genómico del hongo *Neurospora Crassa* (Figura 16.B), indicando que los componentes de PCR no estaban contaminados y los oligonucleótidos CALL001 y CALL002 no amplifican ADN irrelevante, respectivamente.

Debido a que la amplificación del gen hcAb es, aproximadamente, 700 pb (Pardon et al., 2014) se realizó la purificación de dicha zona, por lo que la concentración obtenida fue de 30 ng/ $\mu$ L y la relación  $A_{260}/A_{280}$  de 1.75.

### 3.4.2 Amplificación del fragmento VHH.

Una vez obtenido el producto de PCR del gen hcAb, se realizó el segundo PCR con los oligonucleótidos VHHBACK-*Sfi*I y VHHFOR-*Sfi*I con el fin de obtener el fragmento VHH. Para esto, se utilizó como templado el producto de PCR del gen hcAb.



**Figura 17. Producto de PCR del fragmento VHH.** (A) Amplificación del fragmento VHH, obteniendo una amplificación en 400 pb. (B) Fragmento VHH purificado, mostrando integridad del mismo. Las muestras fueron visualizadas en un gel de agarosa al 1%.

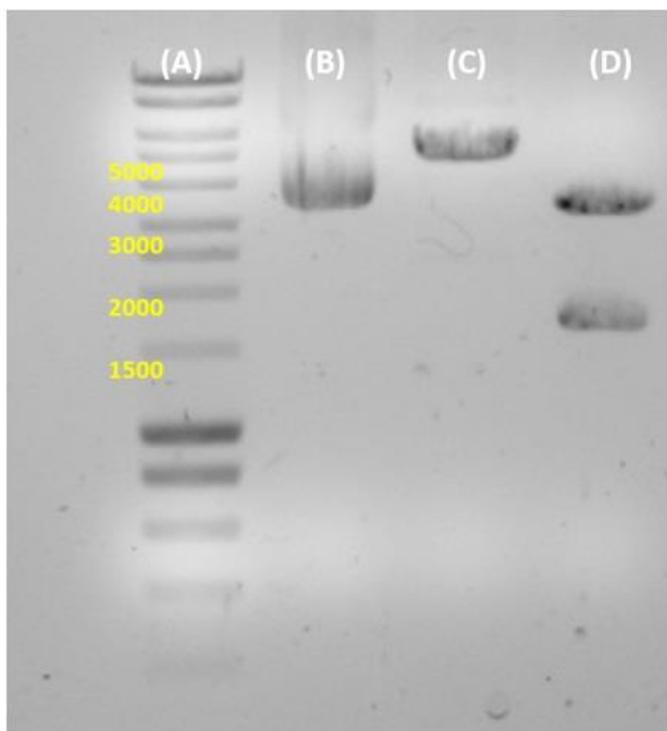
El tamaño del producto de PCR obtenido fue de, aproximadamente, 400 pb (Figura 17.A), concordando con lo simulado por el *SnapGene* (Sección 3.3). Posteriormente, se purificó el fragmento VHH (Figura 17.B), obteniendo una concentración de 10 ng/ $\mu$ L y una relación  $A_{260}/A_{280}$  de 2.00.

### 3.5 Digestión del fagémido pComb3XSS y fragmento VHH.

Para poder realizar la ligación del vector pComb3XSS con el fragmento VHH, primero fue necesario realizar la digestión de ambos, utilizando la enzima de restricción *SfiI*.

#### 3.5.1. Digestión del fagémido pComb3XSS.

El fagémido pComb3XSS, antes y después de la digestión, fue analizado por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Para verificar el tamaño real del fagémido se realizó una “linealización” de este, usando la enzima de restricción *XbaI*. El tamaño aproximado obtenido fue de 500 pb (Figura 18.C). De igual manera, se realizó la digestión del fagémido utilizando la enzima *SfiI*, mostrando la presencia de dos fragmentos: uno de 3200 pb y otro de 1800 pb, aproximadamente (Figura 18.D).



**Figura 18. Electroforesis de la digestión del fagémido pComb3XSS.** (A) Marcador molecular *Hyperladder I*. (B) Fagémido pComb3XSS. (C) Fagémido pComb3XSS digerido con la enzima de restricción *XbaI*. (D) Fagémido pComb3XSS digerido con la enzima de restricción *SfiI*. Las muestras fueron analizadas por medio de un gel de agarosa al 1%.

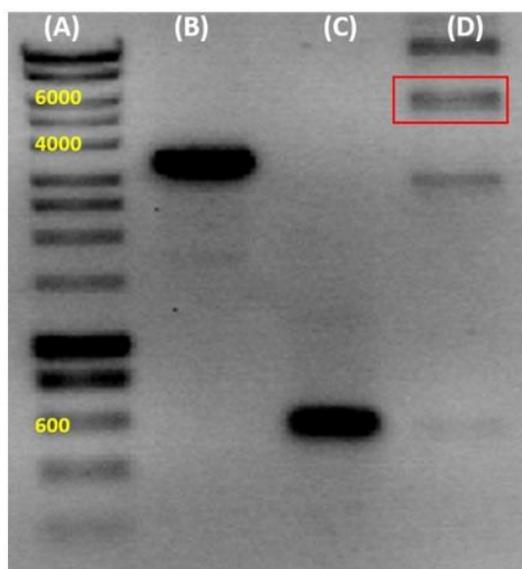
De acuerdo con la Figura 18.D, se purificó la banda superior (3200 pb) debido a que fue el usado para realizar la clonación. La concentración obtenida del fagémido, después de la purificación, fue de 70 ng/ $\mu$ L.

### **3.5.2. Digestión del fragmento VHH.**

Posteriormente, se realizó la digestión del fragmento VHH con la enzima de restricción *Sfi*I. La concentración obtenida del fragmento VHH, después de haber realizado la purificación, fue de 8.3 ng/ $\mu$ L. El cambio de tamaño del fragmento VHH, después de la digestión y purificación, no fue visualizada por un gel de agarosa, debido a que este cambio en el tamaño de la muestra es mínimo.

### **3.6 Ligación del fagémido pComb3XSS y el fragmento VHH a pequeña escala.**

Para poder optimizar la ligación del fagémido pComb3XSS con el fragmento VHH, primeramente, se realizó el cálculo de número de copias del fagémido, así como el número de copias del fragmento VHH, por medio de la ecuación 1, para realizar la ligación con una relación molar 1:3 del fagémido pComb3XSS, con respecto al fragmento VHH. Para esto, se utilizaron los datos obtenidos de la concentración, así como su tamaño en pares de base. Por lo que el número de copias para el vector pComb3xSS fue de  $1.98 \times 10^{10}$  copias/ $\mu$ L. Por otra parte, para el fragmento VHH, el número de copias fue de  $1.88 \times 10^{10}$  copias/ $\mu$ L. De esta manera, prácticamente, por cada microlitro de vector se utilizaron 3 microlitros de fragmento.



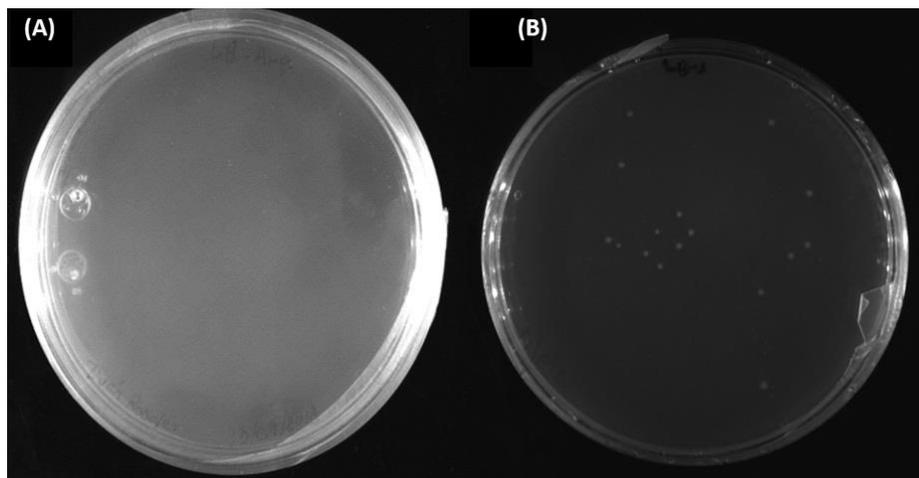
**Figura 19. Electroforesis de ligación del fagémido pComb3XSS y el fragmento VHH.** (A) Marcador de peso molecular *Hyperladder I*. (B) Fagémido pComb3XSS digerido con la enzima de restricción *SfiI* y purificado, el cual presenta un tamaño de 3,200 pb. (C) Fragmento VHH digerido con la enzima de restricción *SfiI* y purificado, el cual presenta un tamaño aproximado de 600 pb. (D) Ligación del fagémido pComb3XSS y el fragmento VHH, en cual presenta un tamaño aproximado de 5000 pb. Las muestras se analizaron en un gel de agarosa al 1%.

Posteriormente, se realizó la ligación del fagémido pComb3XSS (Figura 19.B) con el fragmento VHH (Figura 19.C), ambos digeridos con la enzima de restricción *SfiI*. De acuerdo con la Figura 19.D, en la ligación se apreciaron la presencia de 3 bandas. Acorde por el tamaño obtenido ( $\approx 5,000$  pb), la banda remarcada en rojo, indica la ligación entre el fagémido pComb3XSS con el fragmento VHH. De igual manera, se aprecian bandas que concuerdan con el tamaño del fagémido pComb3XSS y el fragmento VHH. Por otra parte, se puede observar una banda de aproximadamente 10,000 pb. Posteriormente, se realizó la clonación en células 5 $\alpha$ F'.

### 3.7 Clonación en células competentes 5 $\alpha$ F'.

Una vez que el fragmento VHH se ligó con el fagémido pComb3XSS se realizó la transformación en las células competentes 5 $\alpha$ F' (Figura 20). Como control negativo se utilizó el fagémido pComb3XSS digerido que se reintentó ligar con la ligasa *T4*. Acorde a la Figura 20.A, no hubo ninguna presencia de colonias,

indicando vector pComb3xSS no fue ligado consigo mismo ni con ningún otro vector, por lo que la resistencia a ampicilina, la cual es otorgada por el fagémido, no fue obtenida por las células competentes.

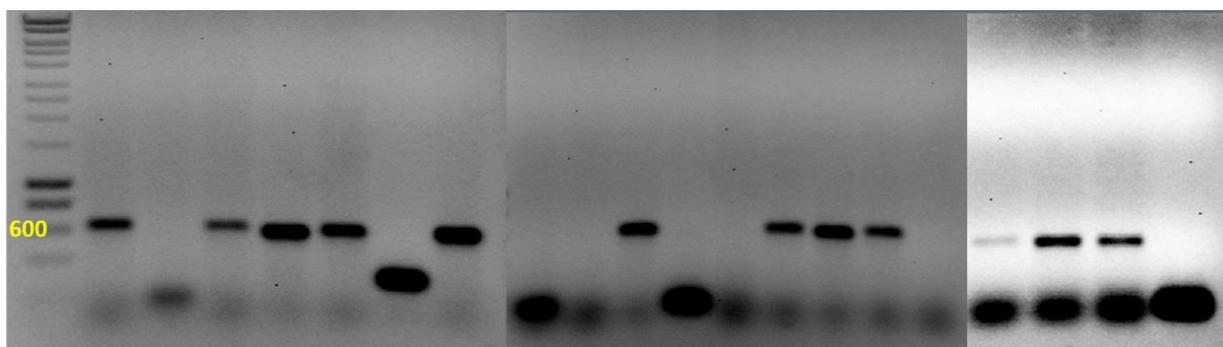


**Figura 20. Transformación de células 5αF'.** (A). Células transformadas con el fagémido pComb3XSS digerido. Este fagémido se agregó en la reacción de ligación, corroborando que el vector no puede ligarse. (B) células transformadas con el fagémido pComb3XSS y el fragmento VHH ligados, obteniendo 18 colonias en promedio de la dilución  $10^{-100}$ . La presencia de colonias indica la eficiencia de transformación del fagémido con el fragmento ligado. Las placas fueron de medio LB sólido, suplementadas con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina.

Por otra parte, De acuerdo con la Figura 20.B se observaron la presencia de 18 colonias Con este resultado se calculó la eficiencia de transformación, la cual fue de  $5.8 \times 10^5$  ufc utilizando 32 ng del fagémido. De acuerdo con la literatura (Pardon et al., 2014), el valor mínimo, para realizar la amplificación de la biblioteca inmune, es de  $5 \times 10^5$  ufc por 100 ng del fagémido utilizado. Por lo que se realizó la amplificación y recuperación de la biblioteca inmune.

### 3.8 PCR de colonia.

Una vez obtenidas las colonias transformadas con el fagémido pComb3XSS ligado con el fragmento VHH, se realizó un PCR de colonia, para confirmar la presencia del gen del fragmento VHH en estas. Por lo que se tomaron 20 colonias al azar. De acuerdo con la Figura 21, de las 20 colonias a las que se le realizó el PCR de colonia 13 fueron positivas. Por lo que el 65% de las colonias presentaron el fragmento VHH.

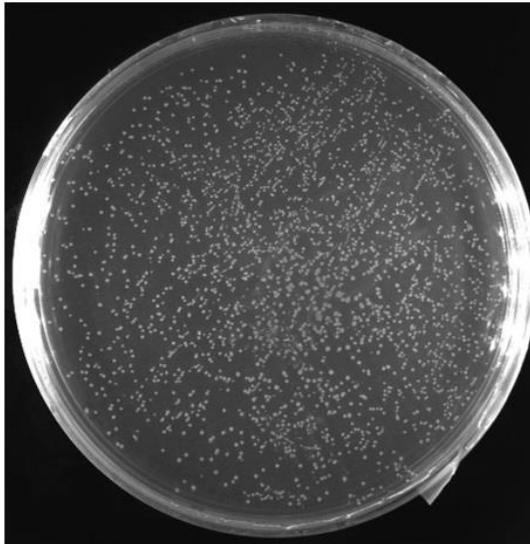


**Figura 21. Electroforesis del PCR de colonia de las células 5αF'.** 13 de las 20 colonias seleccionadas fueron positivas, presentando amplificación, por lo que el 65% de las colonias transformadas presentaron el gen del fragmento VHH. Las muestras se analizaron por medio de un gel de agarosa al 1%.

### 3.9 Rescate y amplificación del bacteriófago recombinante usando la biblioteca inmune.

Una vez que a ligación y transformación a pequeña escala fue exitosa, se realizó la ligación de fragmento VHH con el fagémido pComb3XSS a gran escala. De las cuales se obtuvieron cuatro placas con eficiencia de  $10^7$  de transformantes (Figura 22). Posteriormente, al recuperar la biblioteca se obtuvo una concentración de  $4.25 \times 10^9$  células/ml.

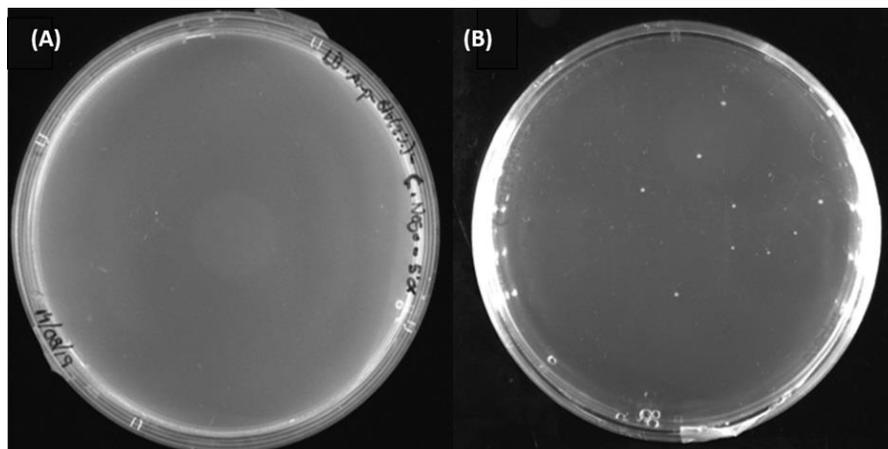
Posteriormente, se realizó la amplificación de los bacteriófagos recombinantes a partir de la biblioteca inmune (bacteriófagos  $R_0$ ). Para la cuantificación de los bacteriófagos, se utilizaron las ecuaciones 3 y 4. Obteniendo  $52.6 \text{ ng}/\mu\text{L}$  y  $1.89 \times 10^9$  viriones/mL.



**Figura 22. Transformación de las células 5αF' a gran escala.** Se obtuvieron cuatro placas de las transformantes de la biblioteca inmune con una eficiencia de  $10^7$ . Después de su recuperación se obtuvo una concentración de  $4.25 \times 10^9$  células/mL. Las transformantes se sembraron en placas de LB sólido, suplementadas con 100  $\mu\text{g/mL}$  de ampicilina.

### 3.10 Titulación de los bacteriófagos recombinantes ( $R_0$ ).

De igual manera, se tituló el bacteriófago recombinante mediante el conteo de las unidades formadoras de colonia. De acuerdo con la figura 23.B, se contaron 18 colonias lisogénicas en promedio. Por lo que, al utilizar la ecuación 2, se obtuvo una eficiencia de  $1.8 \times 10^9$  ufp/ $\mu\text{L}$ .



**Figura 23. Titulación de bacteriófago recombinante  $R_0$ .** (A) control negativo en el cual se sembraron células 5αF'. (B) células 5αF' infectadas con el bacteriófago  $R_0$  diluido en  $10^{-6}$ . Se obtuvieron 18 colonias lisogénicas en promedio. Las células se sembraron en placas LB sólido, suplementadas con 100  $\mu\text{g/mL}$ .

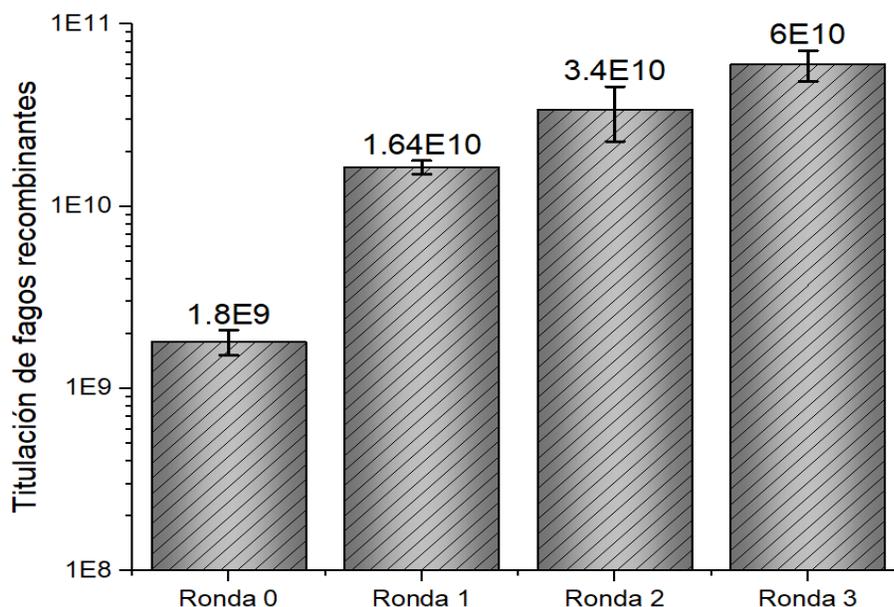
De acuerdo con estos resultados, se notó que la eficiencia obtenida fue la misma que la concentración de viriones.

### 3.11 Amplificación del bacteriófago ayudador VCM13.

Para poder seguir con las amplificaciones de los bacteriófagos recombinantes de las próximas tres rondas de selección fue necesario amplificar bacteriófago ayudador VCM13. Por lo que, de acuerdo con las ecuaciones 3 y 4, se obtuvo un valor de 41.15 ng/ $\mu$ L y  $1.48 \times 10^9$  viriones/ $\mu$ L, respectivamente.

### 3.12 Rondas de selección.

Se realizaron tres rondas de selección para aumentar la afinidad hacia el antígeno CDH11-EC1. Primero se cuantificó la eficiencia de infección de los bacteriófagos recombinantes de cada ronda de selección realizada (Figura 24). Después de cada ronda de selección, los bacteriófagos eluidos fueron amplificados y se realizó la titulación acorde a la sección 2.3.4.

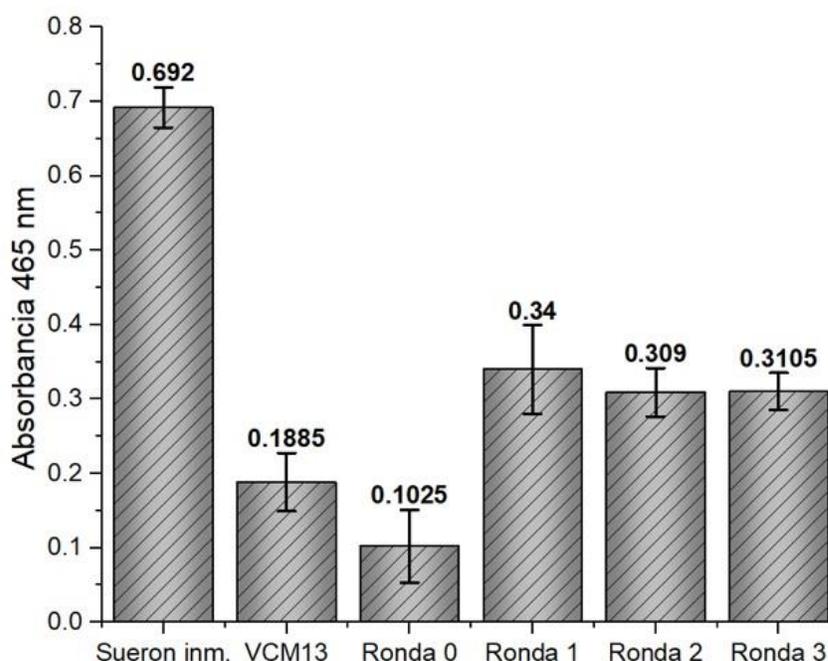


**Figura 24. Bacteriófagos recombinantes amplificados de las rondas de selección.** Bacteriófagos recombinantes amplificados de cada ronda de selección realizada contra la CDH11-EC1, en los cuales se realizó su respectiva titulación. La ronda 0 representa los bacteriófagos recombinantes amplificados a partir de la biblioteca inmune, mientras que las rondas 1 a 3 representan los bacteriófagos recombinantes en cada ronda de selección realizada en el biopanning.

La titulación de los bacteriófagos recombinantes aumentó conforme avanzaron las rondas de selección. De acuerdo con la figura 24, la titulación de los bacteriófagos recombinantes de la ronda 1 aumentó un orden de magnitud más en comparación con los bacteriófagos recuperados de la biblioteca inmune. Por otra parte, la titulación e los bacteriófagos recombinantes de las rondas 2 y 3, no aumentaron de manera significativa en comparación con la ronda 1.

### 3.12.1 Ensayo ELISA de los bacteriófagos recombinantes.

Posteriormente, se realizó un ensayo ELISA para medir la capacidad de reconocimiento de los bacteriófagos recombinantes de cada ronda de selección hacia el péptido CDH11-EC1. En el cual se utilizaron la misma cantidad de bacteriófagos por pozo. De igual manera, se utilizó al fago ayudador VCM13 como control negativo, así como el suero inmune de la llama como control positivo.



**Figura 25. Ensayo ELISA de los bacteriófagos recombinantes de cada ronda de selección hacia la CDH11-EC1.** Se realizó ensayo ELISA para corroborar la capacidad de los bacteriófagos recombinantes de las rondas de selección hacia la CDH11-EC1. Los bacteriófagos que presentaron afinidad se detectaron por medio del anticuerpo *anti-M13-pVIII* con actividad peroxidasa. Por otra parte, se utilizó el suero inmune como control positivo, el cual contiene los anticuerpos IgG así como los hcAbs, para su detección se utilizó un anticuerpo antillama con acoplado a una peroxidasa. Los ensayos se realizaron por triplicado.

El reconocimiento de los bacteriófagos recombinantes de las rondas 1, 2 y 3 hacia la CDH11-EC1 aumentó considerablemente, en comparación con los bacteriófagos recombinantes de la ronda 0 (obtenidos a partir de la biblioteca inmune). Sin embargo, entre las rondas 1, 2 y 3 no hubo un aumento considerable en el reconocimiento hacia el antígeno de interés. De igual manera, la capacidad de reconocimiento de los bacteriófagos recombinantes no fue tan alta en comparación con el suero inmune (Figura 25).

### **3.13 Evaluación del bacteriófago recombinante contra las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7.**

Una vez que se corroboró que los bacteriófagos recombinantes de la ronda 1, 2 y 3 presentaron reconocimiento hacia la CDH11-EC1. Para esto se realizaron dos experimentos: El primero, fue realizar un ensayo de inmunofluorescencia hacia las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, esta última se caracteriza porque sobreexpresa la Cadherina-11.

#### **3.13.1 Ensayo de inmunofluorescencia de los bacteriófagos recombinantes.**

Para verificar el reconocimiento específico de los bacteriófagos recombinantes hacia la cadherina-11 se realizó un ensayo de inmunofluorescencia. En este ensayo se utilizaron a las líneas celulares MCF-7 (Figura 26) y MDA-MB-231 (Figura 27), esta última se caracteriza por sobreexpresar la cadherina-11. En este ensayo se marcó con el fluoróforo FITC, el cual emite en verde, a los bacteriófagos recombinantes. De igual manera, se utilizó un anticuerpo primario *anti-OB cadherin*, el cual reconoce la Cadherina 11, este último se marcó con un anticuerpo secundario *AlexaFluor 594*, el cual emite en rojo. Para ambos ensayos se utilizó una concentración de los bacteriófagos recombinantes de  $3.8 \times 10^8$  viriones/ $\mu\text{L}$ .

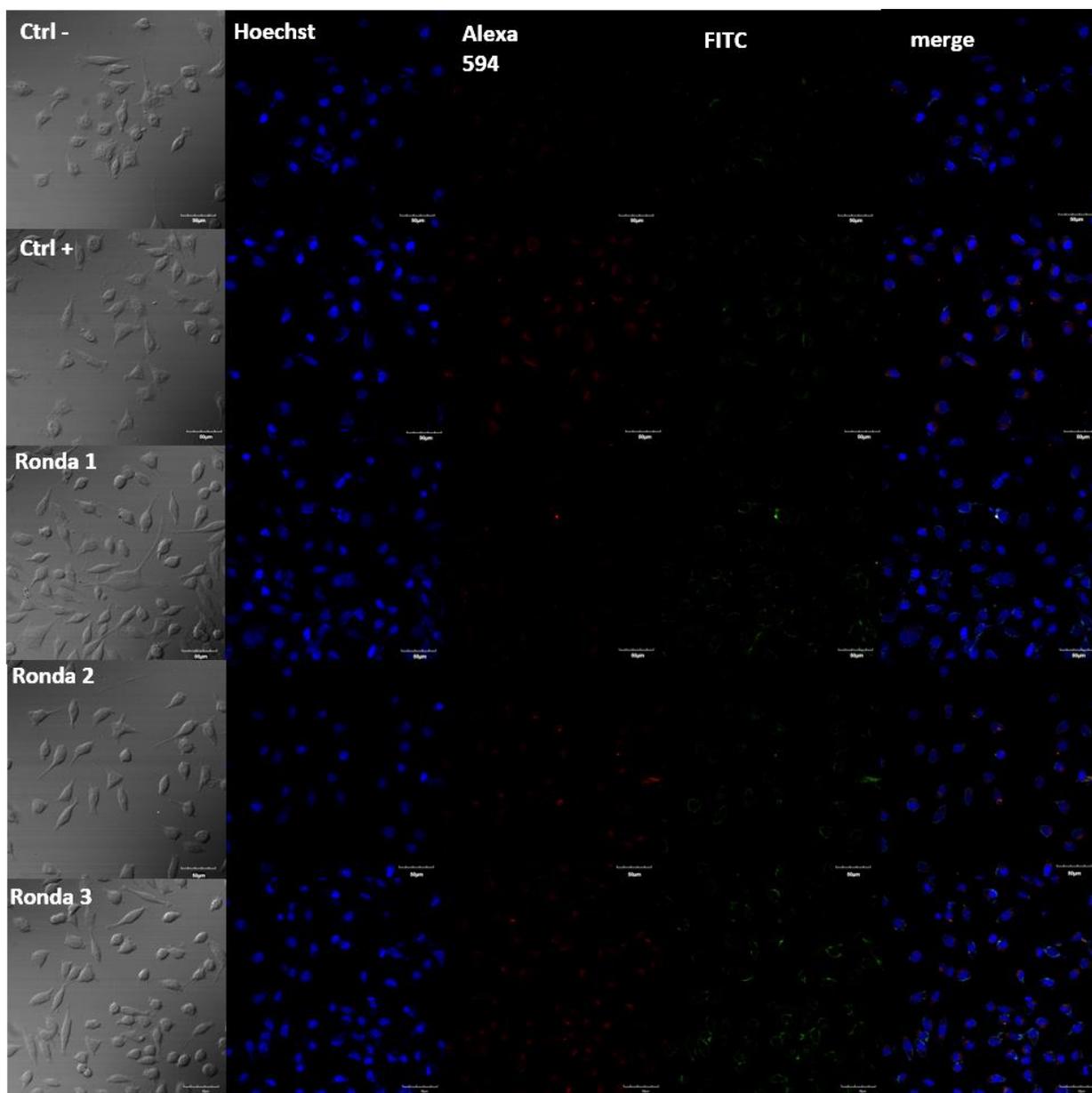
De acuerdo con la Figura 26, se observó presencia de cadherina-11 sobre la membrana celular (indicado por la emisión en rojo), lo que correlaciona con el reconocimiento de los bacteriófagos recombinantes de la ronda 1, 2 y 3. Esto se corrobora por algunos puntos de co-localización en la

ronda 2 y ronda 3. Esto puede indicar que el dominio VHH de los bacteriófagos recombinantes de las rondas 2 y 3 presente reconocimiento para alguna otra cadherina similar a la de interés.

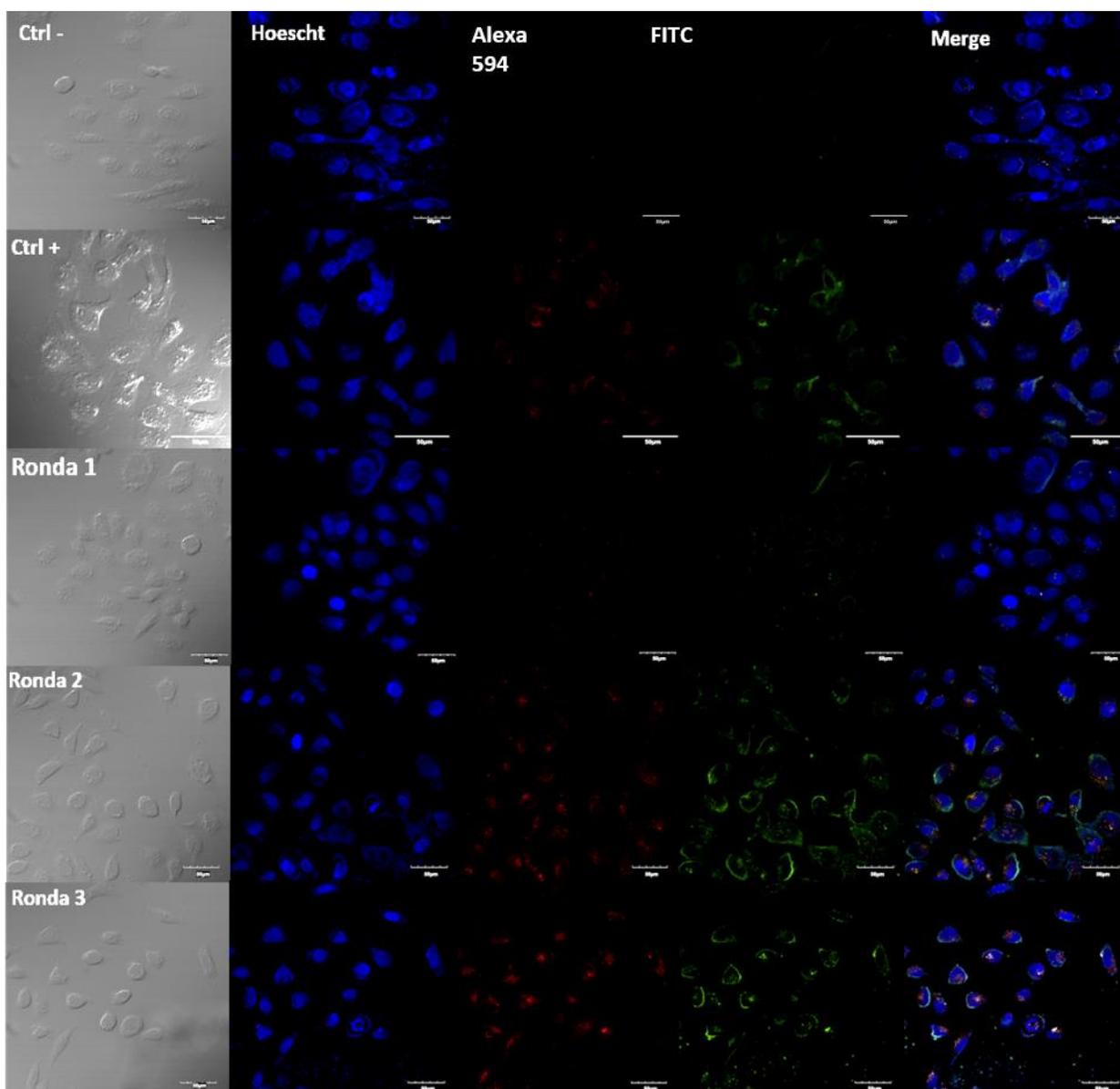
Por otra parte, en la Figura 27, hubo mayor reconocimiento por los bacteriófagos de la ronda 2 y 3 hacia las células MDA-MB-231, debido a que la emisión en verde es mayor. De igual manera, se observó un mayor número de puntos de co-localización por la cadherina-11 en comparación con las células MCF-7. Esto indica que ambos anticuerpos, el anticuerpo anti-*OB-cadherin* como el dominio VHH expresado en los bacteriófagos recombinantes, reconocen a la Cadherina-11. Sin embargo, existen zonas de estas células que sólo emiten en verde, pudiendo indicar que el dominio VHH no es implícitamente específico contra la Cadherina-11, si no, hacia alguna otra cadherina similar.

Estos resultados indican que los bacteriófagos recombinantes de la ronda 2 y 3, en especial la ronda 3, son capaces de reconocer la Cadherina-11 en las células MDA-MB-231.

Finalmente, en ambas imágenes (Figuras 26 y 27), existe un aumento en la emisión debido al aumento en las rondas de selección.



**Figura 26. Ensayo de inmunofluorescencia en células MCF-7.** En este ensayo se utilizaron las células MCF-7. Todas las células se marcaron con el fluoróforo *Hoechst*, el cual emite en azul, marca los núcleos celulares. De igual manera, todas las células, exceptuando la fila “Ctrl-“, se marcaron con el anticuerpo secundario Alexa 594, el cual emite en rojo (este anticuerpo reconoce al anticuerpo primario *anti-OB cadherin*, el cual reconoce a la cadherina 11). Por otra parte, los bacteriófagos recombinantes de la ronda 1, 2 y 3 se marcaron con el fluoróforo FITC, el cual emite en verde, los cuales expresan un dominio VHH anti-CDH11. Las células MCF-7, no expresan CDH11 (Feltes et al., 2002), por lo que este ensayo es considerado el control negativo para el dominio VHH expresado en los bacteriófagos. Es posible notar algunos puntos de fluorescencia emitida en verde en la ronda 2 y 3 indicando la posible presencia de los bacteriófagos recombinantes.

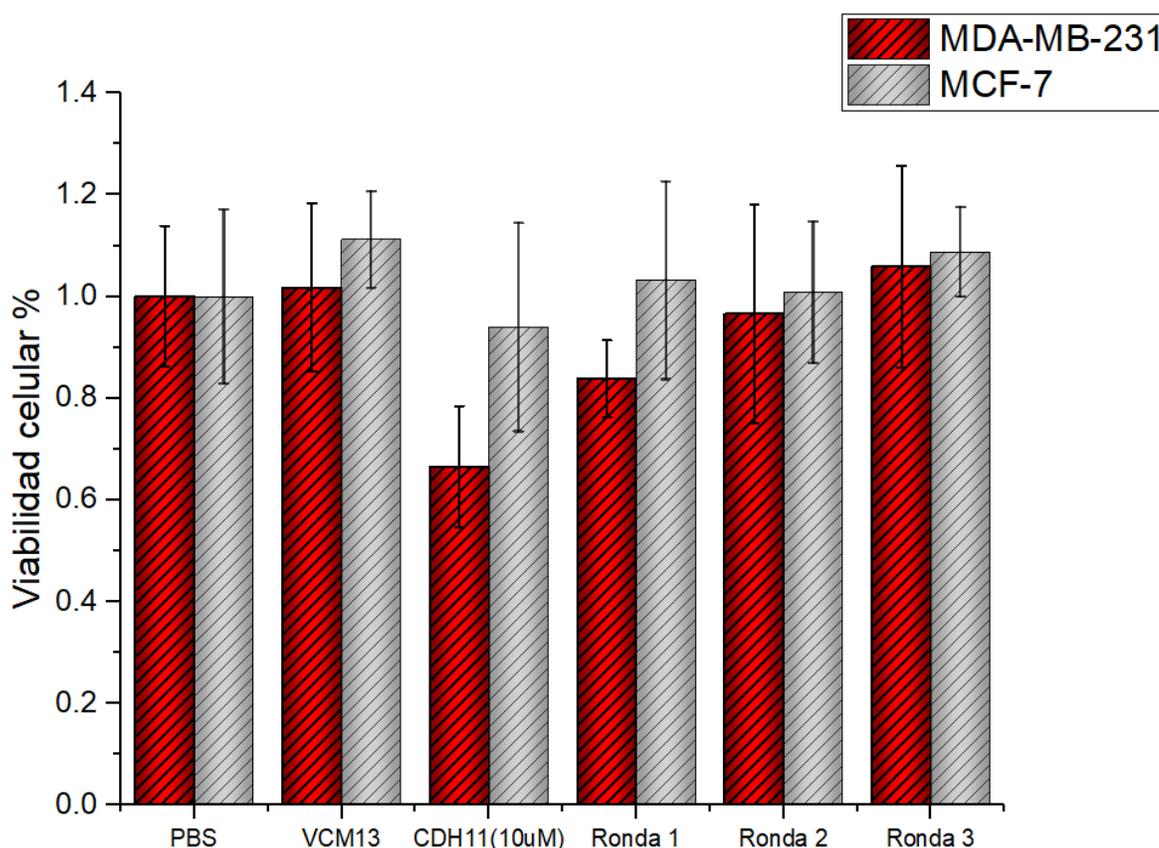


**Figura 27. Ensayo de inmunofluorescencia en células MDA-MB-231.** En este ensayo se utilizaron las células MDA-MB-231. Todas las células se marcaron con el fluoróforo *Hoechst*, el cual emite en azul y marca los núcleos celulares. De igual manera, todas las células, exceptuando la fila “Ctrl-”, se marcaron con el anticuerpo secundario Alexa 594, el cual emite en rojo (este anticuerpo reconoce al anticuerpo primario *anti-OB cadherin*, el cual reconoce a la cadherina 11). Por otra parte, los bacteriófagos recombinantes de la ronda 1, 2 y 3 se marcaron con el fluoróforo FITC, los cuales expresan un dominio VHH anti-CDH11. Las células MDA-MB-231 sobre expresan la CDH11 (Hatano et al., 2015). Existen varios puntos de co-localización por parte de la emisión en rojo, así como en verde, indicando que el anticuerpo *anti-OB cadherin*, así como los bacteriófagos recombinantes de dichas rondas, reconocen a la Cadherina-11.

Posteriormente, para verificar que los bacteriófagos recombinantes presentaran alguna actividad hacia las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, además del reconocimiento, se realizó un ensayo de viabilidad celular.

### 3.13.2 Ensayo de viabilidad celular de los bacteriófagos recombinantes en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7.

Este ensayo se realizó con el fin de verificar la efectividad de los bacteriófagos recombinantes de las rondas 1, 2 y 3. Como controles se utilizaron el bacteriófago ayudador VCM13, así como una molécula química conformada del péptido CDH11-EC1. Se utilizó una concentración de  $1.3 \times 10^{10}$  viriones/ $\mu\text{L}$  de los bacteriófagos recombinantes de las tres rondas, así como el VCM13. Para verificar la efectividad en la viabilidad celular se realizó un ensayo MTT.



**Figura 28. Ensayo MTT en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7.** Se realizó ensayo MTT para verificar el efecto de los bacteriófagos recombinantes en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7. Se utilizaron como controles negativos los tratamientos con PBS y el bacteriófago ayudador VCM13. Como control positivo se utilizó la molécula de CDH11 a una concentración de  $10 \mu\text{M}$ . Los bacteriófagos recombinantes no presentaron una afección significativa en ambas líneas celulares.

De acuerdo con la Figura 28, los bacteriófagos recombinantes de las rondas 1, 2 y 3 no presentaron un cambio significativo en la viabilidad celular de ambas líneas celulares. Estos resultados pueden deberse a la baja concentración de los bacteriófagos recombinantes utilizada.

## Capítulo 4. Discusión

---

La CDH11 se expresa en diversas patologías como algunos tipos de cánceres frecuentes, como lo es el cáncer de mama y próstata. Así como en cánceres no tan frecuentes, como lo es el glioblastoma y el Sarcoma de Ewing, por mencionar algunos. De igual manera, la expresión de la CDH11 está presente en el avance de la enfermedad crónico-degenerativa, artritis reumatoide. Por lo que, la CDH11 es un objetivo potencial para la detección y posible tratamiento en el cual podrían mejorar la prognosis y diagnóstico de las patologías mencionadas anteriormente. Uno de los tratamientos actuales para las patologías mencionadas es el uso de anticuerpos monoclonales. Estos han mostrado resultados positivos en diagnóstico y tratamiento, sin embargo; pueden ocasionar reacciones alérgicas y son caros de realizar.

Es por esto, que en este trabajo se realizó la selección y caracterización de un nanoanticuerpo derivado de camélido que fuera capaz de detectar a la CDH11, específicamente en el ecto-dominio 1 (CDH11-EC1). Esto porque las ventajas de un nanoanticuerpo a diferencia de un anticuerpo monoclonal son: menor tamaño (15 kDa), presentan un dominio único VH, mayor estabilidad térmica y química, alta afinidad de reconocimiento al antígeno y baja inmunogenicidad debido a su homología en comparación con el dominio VH.

Para realizar la selección de los nanoanticuerpos específicos contra la CDH11-EC1 se utilizó la técnica conocida como *phage display*. Para esto primero se realizó la construcción de la biblioteca inmune a partir de los linfocitos obtenidos después de seis semanas de inmunización (Figura 14). Para esto se extrajo el ARN total de los linfocitos, los cuales presentan la información genética del fragmento VHH capaz de reconocer al antígeno de interés. La concentración fue de 2.26  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , con una relación  $A_{260}/A_{280} = 1.93$  y una relación  $A_{260}/A_{230} = 2.3$ . La primera relación indica la calidad y pureza del material genético, en este caso para el ARN, el valor obtenido indica que fue de calidad buena. Por otra parte, la segunda relación indica posibles contaminaciones durante el proceso de purificación. Los valores aceptados son dentro de un rango de 2.0-2.2, sin embargo; la presencia de uracilo en ARN ocasiona que este valor sea un poco más alto, por lo que el valor de 2.3 obtenido indica que es un ARN bueno para su manipulación, indicando que no existió contaminación durante su purificación (Leninger, 1975). Posteriormente, se realizó la síntesis de ADNc, obteniendo una concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y una relación  $A_{260}/A_{280} = 1.61$ .

Posteriormente se realizó la amplificación del fragmento VHH por la técnica de un PCR anidado. Esta técnica consistió en realizar dos PCR. El primer PCR, con los oligonucleótidos CALL001 y CALL002 permite

la amplificación de las regiones correspondientes a los IgG (1000 pb), como los hcAbs (700 pb) (Pardon et al., 2014), este segundo producto de PCR se purificó obteniendo una concentración de 30 ng/ $\mu$ L con una relación  $A_{260}/A_{280}$  de 1.75. Posteriormente este producto de PCR se utilizó como templado para el segundo PCR. En este PCR, con los oligonucleótidos VHHBACK-*Sfi*I y VHHFOR-*Sfi*I, se amplificó el producto de PCR VHH, el cual presentó un tamaño de 400 pb, acorde a lo reportado con la literatura (Pardon et al., 2014).

Una vez realizada la ligación a pequeña escala del fragmento VHH con el fagémido pComb3XSS, se obtuvo una eficiencia de  $5.8 \times 10^5$  ufc con 32 ng del fagémido utilizado. De acuerdo con la literatura (Pardon et al., 2014), el valor idóneo para realizar la amplificación de la biblioteca inmune, es de  $5 \times 10^5$  ufc por 100 ng del fagémido utilizado. Por lo que en la transformación a gran escala se obtuvo una eficiencia de  $10^7$ . En la construcción de la biblioteca inmune, una eficiencia considerada buena para la selección de anticuerpos es de  $\approx 10^6$ , en comparación con las bibliotecas para la generación de fragmentos derivados de IgG. Esto porque los hcAbs y, por ende, los nanoanticuerpos carecen de un dominio  $V_L$ , por lo que no necesitan realizar una dimerización para generar un nanoanticuerpo funcional (Muyldermans, 2013). De igual manera, se realizó un PCR de colonia, en el cual 65% de las transformantes presentaron el gen VHH. Sin embargo, es necesario realizar la secuenciación de estas para corroborar un grado de diversidad aceptable.

Posteriormente, se realizó la titulación de los bacteriófagos recombinantes después de cada ronda de selección. En comparación con la ronda 0, la titulación de bacteriófagos recombinantes de las rondas 1, 2 y 3 aumentaron alrededor de una orden de magnitud. Este aumento se debe a, que después de la primer ronda de selección, se eluyó y amplificó los bacteriófagos recombinantes capaces de reconocer a la CDH11-EC1. De igual manera, hubo un pequeño aumento entre las rondas subsecuentes, sin embargo, el aumento no fue tan significativo en comparación con los bacteriófagos recombinantes de la ronda cero (Figura 24).

Después de haber realizado tres rondas de selección, se realizó un ensayo ELISA para verificar la capacidad de reconocimiento hacia el antígeno CDH11-EC1 (Figura 25). En comparación con los bacteriófagos recombinantes de la ronda 0, los bacteriófagos de las rondas 1, 2 y 3 mostraron una capacidad de reconocimiento mayor hacia el antígeno CDH11-EC1, indicando su enriquecimiento. Sin embargo, no mostraron una capacidad de reconocimiento equiparable al suero inmunizado de la llama. Esto puede deberse a que el suero inmunizado presenta tanto hcAbs como IgG capaces de reconocer al antígeno CDH11-EC1. De igual manera que, con las transformantes de la biblioteca inmune, es necesario realizar la secuenciación del gen VHH que se encuentra en los bacteriófagos recombinantes de las rondas de selección.

Debido a que los bacteriófagos recombinantes expresan el dominio VHH anti CDH11-EC1, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia con el fin de verificar que podrían ser candidatos para la detección de diversas patologías en la cual su característica es la sobreexpresión de cadherina-11. Para esto se realizó el ensayo con dos líneas celulares de cáncer de mama: MCF-7 (Figura 26) y MDA-MB-231 (Figura 27). Esta última es característica por sobreexpresar cadherina-11. Por lo que, se marcaron a los bacteriófagos recombinantes de las rondas 1, 2 y 3 con FITC (verde). Este fluoróforo permite el marcaje debido a que se une a las proteínas del bacteriófago por medio de interacciones con los grupos amino (SIGMA, 1990). De igual manera, se utilizó un anticuerpo primario *anti-OB cadherin* marcado con un anticuerpo secundario *Alexa Fluor 594* (rojo) como control positivo. De acuerdo con la Figura 26, las células MCF-7 presentan núcleos definidos indicando el marcaje correcto por el fluoróforo *Hoechst* (azul). Por otra parte, es posible notar fluorescencia en rojo, tanto en verde en estas células. La fluorescencia en rojo, puede deberse a diversas razones: La primera, podría indicar la expresión de cadherina-11, sin embargo; está reportado que la cadherina que comúnmente expresa las células MCF-7 es la E-cadherina (Blaschuk y Devemy, 2009). Sin embargo; la fluorescencia de debida por los bacteriófagos recombinantes de las rondas dos y tres es poca, lo cual es posible que los bacteriófagos recombinantes presenten especificidad hacia alguna cadherina similar.

De igual manera, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia en la línea celular MDA-MB-231 (Figura 27). En este experimento la fluorescencia emitida en verde es mayor en comparación con las células MCF-7. La presencia de emisión en verde es notoria, en mayor manera, en las células tratadas con el bacteriófagos recombinantes de las rondas 2 y 3. Esto puede indicar que los bacteriófagos recombinantes de estas dos últimas rondas, son capaces de reconocer a la CDH11-EC1 en esta línea celular. De igual manera, esto se puede corroborar debido a que se notan diversos puntos de colocalización con el anticuerpo secundario *Alexa Fluor 594*. Esta colocalización puede deberse a que, el anticuerpo primario (*anti-OB cadherin*) podría reconocer otro ectodominio diferente al EC1, que el bacteriófago recombinante reconoce. Sin embargo, la emisión por FITC no se presenta de la misma manera que la obtenida por el *Alexa Fluor 594*. Esto se puede deber a que la concentración de los bacteriófagos recombinantes utilizados es baja, por lo que lo más adecuado sería utilizar una cepa de expresión para aumentar la concentración de bacteriófagos recombinantes, y por ende, de nanoanticuerpos específicos. De igual manera, es necesario purificar el dominio VHH para evitar que la estructura de bacteriófago interfiera en el reconocimiento de la CDH11-EC1. Por otra parte, los bacteriófagos recombinantes parecen estar presentes en algunas zonas de la membrana celular, sin colocalizar con el anticuerpo primario. Esto igual, puede deberse a que los bacteriófagos recombinantes, si bien reconocen al CDH11-EC1, reconocen a alguna otra cadherina similar

en estas células. Por lo que encontrar y aislar el fago recombinante que presente un fragmento VHH con alta especificidad por la CDH11-EC1 eliminaría esta posible inespecificidad

Acorde a la literatura (Pardon et al., 2014a), es necesario seleccionar bacteriófagos recombinantes con mayor reconocimiento al antígeno de interés y, además, que presenten una titulación, como mínimo, dos órdenes de magnitud por encima de los bacteriófagos obtenidos directamente de la biblioteca inmune (Ronda 0). Para obtener estos resultados, puede realizarse por diversos métodos: como aumentar el número de rondas de selección, aumentar el porcentaje de BSA o tween-20, o aumentar la cantidad de lavados, anterior a la elución de los bacteriófagos recombinantes.

Finalmente, se realizó un ensayo MTT para verificar si los bacteriófagos recombinantes afectaban en la viabilidad celular de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231. De acuerdo con la Figura 28, no hubo una disminución significativa en la viabilidad celular de ambas líneas celulares. En la línea celular MCF-7, no expresa la cadherina-11, por lo que los bacteriófagos recombinantes no presentan afinidad alguna y, por ende, ningún efecto en esta línea celular. Esto corrobora que las células no se ven afectadas con la molécula CDH11. Por otra parte, en la línea celular MDA-MB-231, el poco efecto puede deberse a que la vía de señalización Wnt no es inhibida en su totalidad. Esta vía de señalización es encargada de promover el crecimiento tumoral, la migración e invasión celular de los cánceres de mama (Satriyo et al., 2019). Esto también puede deberse a que la concentración utilizada es muy baja para que se presente algún efecto en esta vía de señalización.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

### 5.1 Conclusiones.

De acuerdo con el trabajo realizado se puede concluir que:

Durante la obtención de la biblioteca inmune, se amplificó el fragmento VHH, mediante la técnica de PCR anidado, obteniendo un tamaño aproximado de 400 pb acorde a lo reportado en la literatura. Una vez que se amplificó exitosamente el fragmento VHH se generó la biblioteca inmune contra el antígeno CDH11-EC1, obteniendo una eficiencia de  $\approx 10^7$  transformantes. Posteriormente, mediante la técnica de despliegue en fagos, se expresó la biblioteca recombinante del nanoanticuerpo VHH en el bacteriófago recombinante M13. Posteriormente, mediante tres rondas de selección, se seleccionaron bacteriófagos recombinantes capaces de reconocer al antígeno CDH11-EC1.

Una vez obtenidos los bacteriófagos recombinantes se analizó su capacidad de reconocer la CDH11-EC1 en la línea celular MDA-MB-231 (las cuales sobreexpresan Cadherina-11) así como en células MCF-7 (las cuales presentan una sobreexpresión baja de Cadherina-11). Acorde a los resultados obtenidos, los bacteriófagos recombinantes, tanto de las rondas dos y tres, reconocieron a la Cadherina-11 de las células MDA-MB-231. Finalmente, los bacteriófagos recombinantes no mostraron inhibición en la viabilidad celular tanto de las células MDA-MB-231, como en las células MCF-7, debido a que la cantidad de bacteriófagos recombinantes utilizada fue muy baja.

### 5.2 Trabajo a futuro.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se proponen el siguiente trabajo a futuro:

- Realizar la secuenciación de las transformantes de la biblioteca inmune.
- Seleccionar un bacteriófago recombinante con un mayor reconocimiento hacía el antígeno de interés y realizar la selección y secuenciación de dicha clona.
- Realizar la expresión y purificación del dominio VHH específico a partir de una cepa de expresión.
- Realizar ensayos de viabilidad y migración celular en la línea celular MDA-MB-231.

## Literatura citada

---

- Abdullah, L. N., Chow, E. K.-H. 2013. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clinical and Translational Medicine*, 2(1), 3. doi:10.1186/2001-1326-2-3
- Abulrob, A., Sprong, H., Van Bergen En Henegouwen, P., Stanimirovic, D. 2005. The blood-brain barrier transmigration single domain antibody: Mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells. *Journal of Neurochemistry*, 95(4), 1201–1214. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03463.x
- Adams, C. L., Chen, Y. T., Smith, S. J., Nelson, W. J. 1998. Mechanisms of epithelial cell-cell adhesion and cell compaction revealed by high-resolution tracking of E-cadherin-green fluorescent protein. *Journal of Cell Biology*, 142(4), 1105–1119. doi:10.1083/jcb.142.4.1105
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., Clarke, M. F. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 3983–3988. doi:10.1073/pnas.0530291100
- Anderson, J. M., Van Itallie, C. M. 2009. Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, Vol. 1. doi:10.1101/cshperspect.a002584
- Arbabi Ghahroudi, M., Desmyter, A., Wyns, L., Hamers, R., Muyldermans, S. 1997. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Letters*, 414(3), 521–526. doi:10.1016/S0014-5793(97)01062-4
- Bannas, P., Hambach, J., Koch-Nolte, F. 2017. Nanobodies and nanobody-based human heavy chain antibodies as antitumor therapeutics. *Frontiers in Immunology*, 8(NOV), 1–13. doi:10.3389/fimmu.2017.01603
- Barbas, C. F., Kang, A. S., Lerner, R. A., Benkovic, S. J. 1991. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: The gene III site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(18), 7978–7982. doi:10.1073/pnas.88.18.7978
- Barbas III, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K., Silverman, G. J. 2001. Section 1: Phage Display. En R. Webster (Ed.), *Phage Display: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Becker, S. F., Langhe, R., Huang, C., Wedlich, D., Kashef, J. 2012, agosto 1. Giving the right tug for migration: Cadherins in tissue movements. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 524. doi:10.1016/j.abb.2012.02.013
- Beutler, B. 2004. Innate immunity: An overview. *Molecular Immunology*, 40(12), 845–859. doi:10.1016/j.molimm.2003.10.005
- Blaschuk, O. W., Devemy, E. 2009. Cadherins as novel targets for anti-cancer therapy. *European Journal of Pharmacology*, 625(1–3), 195–198. doi:10.1016/j.ejphar.2009.05.033
- Brasch, J., Harrison, O. J., Honig, B., Shapiro, L. 2012, junio. Thinking outside the cell: How cadherins drive adhesion. *Trends in Cell Biology*, Vol. 22. doi:10.1016/j.tcb.2012.03.004
- Bussemakers, M. J. G. B., Okhoven, A. V. A. N. B., Omita, K. T., Ansen, C. F. J. J., Chalken, J. A. S. 2000. Complex cadherin expression in human prostate cancer cells. *Cancer*, 450(June 1999), 446–450.
- Chakravarty, R., Goel, S., Cai, W. 2014. Nanobody: The “magic bullet” for molecular imaging? *Theranostics*, 4(4), 386–398. doi:10.7150/thno.8006

- Chang, S. K., Noss, E. H., Chen, M., Gu, Z., Townsend, K., Grenha, R., Leon, L., Lee, S. Y., Lee, D. M., Brenner, M. B. 2011. Cadherin-11 regulates fibroblast inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(20), 8402–8407. doi:10.1073/pnas.1019437108
- Chen, J.-H., Huang, W.-C., Bamodu, O. A., Chang, P. M.-H., Chao, T.-Y., Huang, T.-H. 2019. Monospecific antibody targeting of CDH11 inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and represses cancer stem cell-like phenotype by up-regulating miR-335 in metastatic breast cancer, *in vitro* and *in vivo*. *BMC Cancer*, 19(1), 634. doi:10.1186/s12885-019-5811-1
- Chothia, C., Novotný, J., Brucoleri, R., Karplus, M. 1985. Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. *Journal of Molecular Biology*, 186(3), 651–663. doi:10.1016/0022-2836(85)90137-8
- Cohen, S., Milstein, C. 1967. Structure and biological properties of immunoglobulins. *Advances in Immunology*, 7(C), 1–89. doi:10.1016/S0065-2776(08)60126-1
- David, M. P. C., Asprer, J. J. T., Ibane, J. S. A., Concepcion, G. P., Padlan, E. A. 2007. A study of the structural correlates of affinity maturation: Antibody affinity as a function of chemical interactions, structural plasticity and stability. *Molecular Immunology*, 44(6), 1342–1351. doi:10.1016/j.molimm.2006.05.006
- De Meyer, T., Muyldermans, S., Depicker, A. 2014. Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends in Biotechnology*, 32(5), 263–270. doi:10.1016/j.tibtech.2014.03.001
- Delves, P. J., Roitt, I. M. 2000, julio 13. *Advances in immunology: The immune system (Second of two parts)*. *New England Journal of Medicine*, Vol. 343. doi:10.1056/NEJM200007133430207
- Deschacht, N., De Groeve, K., Vincke, C., Raes, G., De Baetselier, P., Muyldermans, S. 2010. A Novel Promiscuous Class of Camelid Single-Domain Antibody Contributes to the Antigen-Binding Repertoire. *The Journal of Immunology*, 184(10), 5696–5704. doi:10.4049/jimmunol.0903722
- Ding, X., Zhang, Y., Huang, Y., Liu, S., Lu, H., Sun, T. 2015. Cadherin-11 involves in synovitis and increases the migratory and invasive capacity of fibroblast-like synoviocytes of osteoarthritis. *International Immunopharmacology*, 26(1), 153–161. doi:10.1016/j.intimp.2015.03.024
- Dumoulin, M., Conrath, K., Van Meirhaeghe, A., Meersman, F., Heremans, K., Frenken, L. G. J., Muyldermans, S., Wyns, L., Matagne, A. 2009. Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Science*, 11(3), 500–515. doi:10.1110/ps.34602
- Ecker, D. M., Jones, S. D., Levine, H. L. 2015, enero 1. The therapeutic monoclonal antibody market. *mAbs*, Vol. 7. doi:10.4161/19420862.2015.989042
- Elvin A. Kabat, Tai Te Wu, Harold M. Perry, Carl Foeller, K. S. G. 1991. *Sequences of Proteins of Immunological Interest (fifth edit)*. de [https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=3jMvZYW2ZtwC&oi=fnd&pg=PA1&dq=W.+T.+T.+Kabat+Elvin+A.,+Perry+Harold+M.,+Gottesman+Kay+S.,+and+Carl+Foeller.,+Sequences+of+Protein+s+of+Immunological+Interest.++\(DIANE+Publishing,+1991\).&ots=PfOFOSzn3x&sig=QYMRe](https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=3jMvZYW2ZtwC&oi=fnd&pg=PA1&dq=W.+T.+T.+Kabat+Elvin+A.,+Perry+Harold+M.,+Gottesman+Kay+S.,+and+Carl+Foeller.,+Sequences+of+Protein+s+of+Immunological+Interest.++(DIANE+Publishing,+1991).&ots=PfOFOSzn3x&sig=QYMRe)
- Feltes, C. M., Kudo, A., Blaschuk, O., Byers, S. W. 2002. An alternatively spliced cadherin-11 enhances human breast cancer cell invasion. *Cancer Research*, 62(22), 6688–6697.
- Finkelman, F. D., van Boxel, J. A., Asofsky, R., Paul, W. E. 1976. Cell membrane IgD: demonstration of IgD on human lymphocytes by enzyme-catalyzed iodination and comparison with cell surface Ig of mouse, guinea pig, and rabbit. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 116(4), 1173–1181. de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1254967>

- Glentis, A., Gurchenkov, V., Vignjevic, D. M. 2014. Assembly, heterogeneity, and breaching of the basement membranes. *Cell Adhesion & Migration*, 8(3), 236–245. doi:10.4161/cam.28733
- Gravdal, K., Halvorsen, O. J., Haukaas, S. A., Akslen, L. A. 2007. A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 13(23), 7003–7011. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1263
- Greenberg, A. S., Avila, D., Hughes, M., Hughes, A., McKinney, E. C., Flajnik, M. F. 1995. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature*, 374(6518), 168–173. doi:10.1038/374168a0
- Gupta, A., Shrivastava, N., Grover, P., Singh, A., Mathur, K., Verma, V., Kaur, C., Chaudhary, V. K. 2013. A Novel Helper Phage Enabling Construction of Genome-Scale ORF-Enriched Phage Display Libraries. *PLoS ONE*, 8(9). doi:10.1371/journal.pone.0075212
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hammers, C., Songa, E. B., Bendahman, N., Hammers, R. 1993. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 363(6428), 446–448. doi:10.1038/363446a0
- Hammers, C. M., Stanley, J. R. 2014. Antibody phage display: Technique and applications. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(2), 1–5. doi:10.1038/jid.2013.521
- Harmsen, M. M., De Haard, H. J. 2007, noviembre. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 77. doi:10.1007/s00253-007-1142-2
- Hatano, M., Matsumoto, Y., Fukushi, J. ichi, Matsunobu, T., Endo, M., Okada, S., Iura, K., Kamura, S., Fujiwara, T., Iida, K., Fujiwara, Y., Nabeshima, A., Yokoyama, N., Fukushima, S., Oda, Y., Iwamoto, Y. 2015. Cadherin-11 regulates the metastasis of Ewing sarcoma cells to bone. *Clinical and Experimental Metastasis*, 32(6), 579–591. doi:10.1007/s10585-015-9729-y
- Hendriksen, J., Jansen, M., Brown, C. M., van der Velde, H., van Ham, M., Galjart, N., Offerhaus, G. J., Fagotto, F., Fornerod, M. 2008. Plasma membrane recruitment of dephosphorylated  $\beta$ -catenin upon activation of the Wnt pathway. *Journal of Cell Science*, 121(11), 1793–1802. doi:10.1242/jcs.025536
- Holliger, P., Hudson, P. J. 2005, septiembre. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology*, Vol. 23. doi:10.1038/nbt1142
- Howard, S., Deroo, T., Fujita, Y., Itasaki, N. 2011. A positive role of cadherin in wnt/ $\beta$ -catenin signalling during epithelial-mesenchymal transition. *PLoS ONE*, 6(8). doi:10.1371/journal.pone.0023899
- Huang, C. F., Lira, C., Chu, K., Bilen, M. A., Lee, Y. C., Ye, X., Kim, S. M., Ortiz, A., Wu, F. L. L., Logothetis, C. J., Yu-Lee, L. Y., Lin, S. H. 2010. Cadherin-11 increases migration and invasion of prostate cancer cells and enhances their interaction with osteoblasts. *Cancer Research*, 70(11), 4580–4589. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3016
- Hudson, P. J. 1998. Recombinant antibody fragments. *Current Opinion in Biotechnology*, 9(4), 395–402. doi:10.1016/S0958-1669(98)80014-1
- Humphrey, J. D., Dufresne, E. R., Schwartz, M. A. 2014, diciembre 11. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 15. doi:10.1038/nrm3896

- Jansen, K. A., Donato, D. M., Balcioglu, H. E., Schmidt, T., Danen, E. H. J., Koenderink, G. H. 2015, noviembre 1. A guide to mechanobiology: Where biology and physics meet. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, Vol. 1853. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.05.007
- Kabat, E. A., Wu, T. T. 1991. Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 147(5), 1709–1719. de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1908882>
- Kawaguchi, J., Kii, I., Sugiyama, Y., Takeshita, S., Kudo, A. 2001. The Transition of Cadherin Expression in Osteoblast Differentiation from Mesenchymal Cells: Consistent Expression of Cadherin-11 in Osteoblast Lineage. *Journal of Bone and Mineral Research*, 16(2), 260–269. doi:10.1359/jbmr.2001.16.2.260
- Kijanka, M., Dorresteijn, B., Oliveira, S., van Bergen en Henegouwen, P. M. P. 2015. Nanobody-based cancer therapy of solid tumors. *Nanomedicine*, 10(1), 161–174. doi:10.2217/nnm.14.178
- Kimura, Y., Matsunami, H., Inoue, T., Shimamura, K., Uchida, N., Ueno, T., Miyazaki, T., Takeichi, M. 1995. Cadherin-11 Expressed in Association with Mesenchymal Morphogenesis in the Head, Somite, and Limb Bud of Early Mouse Embryos. *Developmental Biology*, 169(1), 347–358. doi:10.1006/dbio.1995.1149
- Kimura, Y., Matsunami, H., Takeichi, M. 1996. Expression of cadherin-11 delineates boundaries, neuromeres, and nuclei in the developing mouse brain. *Developmental Dynamics*, 206(4), 455–462. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199608)206:4<455::AID-AJA11>3.0.CO;2-W
- Köhler, G., Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), 495–497. doi:10.1038/256495a0
- Koury, J., Zhong, L., Hao, J. 2017. Targeting Signaling Pathways in Cancer Stem Cells for Cancer Treatment. *Stem Cells International*, Vol. 2017. doi:10.1155/2017/2925869
- Lafaye, P., Achour, I., England, P., Duyckaerts, C., Rougeon, F. 2009. Single-domain antibodies recognize selectively small oligomeric forms of amyloid  $\beta$ , prevent A $\beta$ -induced neurotoxicity and inhibit fibril formation. *Molecular Immunology*, 46(4), 695–704. doi:10.1016/j.molimm.2008.09.008
- Lauwereys, M., Ghahroudi, M. A., Desmyter, A., Kinne, J., Hölzer, W., De Genst, E., Wyns, L., Muyldermans, S. 1998. Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *EMBO Journal*, 17(13), 3512–3520. doi:10.1093/emboj/17.13.3512
- Lee, C. M. Y., Iorno, N., Sierro, F., Christ, D. 2007. Selection of human antibody fragments by phage display. *Nature Protocols*, 2(11), 3001–3008. doi:10.1038/nprot.2007.448
- Lee, D. M., Kiener, H. P., Agarwal, S. K., Noss, E. H., Watts, G. F. M., Chisaka, O., Takeichi, M., Brenner, M. B. 2007. Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science*, 315(5814), 1006–1010. doi:10.1126/science.1137306
- Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R., Thompson, E. W. 2006, marzo. The epithelial-mesenchymal transition: New insights in signaling, development, and disease. *Journal of Cell Biology*, Vol. 172. doi:10.1083/jcb.200601018
- Leninger, A. L. 1975. *Biochemistry* (second; W. Publishers, Ed.). New York.

- Li, Y., Chao, F., Huang, B., Liu, D., Kim, J., Huang, S. 2014. HOXC8 promotes breast tumorigenesis by transcriptionally facilitating cadherin-11 expression. *Oncotarget*, 5(9), 2596–2607. doi:10.18632/oncotarget.1841
- Ling, L., Nurcombe, V., Cool, S. M. 2009, marzo 15. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. *Gene*, Vol. 433. doi:10.1016/j.gene.2008.12.008
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., Martin, K. 2016. *Molecular Cell Biology* (Octava; W. H. Freeman, Ed.). Freeman W.H.: Estados Unidos de América.
- Maffey, L., Vega, C. G., Miño, S., Garaicoechea, L., Parreño, V. 2016. Anti-VP6 VHH: An experimental treatment for rotavirus a-associated disease. *PLoS ONE*, 11(9). doi:10.1371/journal.pone.0162351
- McMillen, P., Holley, S. A. 2015, octubre 1. Integration of cell-cell and cell-ECM adhesion in vertebrate morphogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 36. doi:10.1016/j.ceb.2015.07.002
- Muyldermans, S. 2001. Single domain camel antibodies: Current status. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 74(4), 277–302. doi:10.1016/S1389-0352(01)00021-6
- Muyldermans, S. 2013. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annual Review of Biochemistry*, 82(1), 775–797. doi:10.1146/annurev-biochem-063011-092449
- Niessen, C. M. 2007. Tight junctions/adherens junctions: Basic structure and function. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(11), 2525–2532. doi:10.1038/sj.jid.5700865
- Nieto, M. A. 2013. Epithelial plasticity: A common theme in embryonic and cancer cells. *Science*, Vol. 342. doi:10.1126/science.1234850
- Oda, H., Takeichi, M. 2011, junio 27. Structural and functional diversity of Cadherin at the adherens junction. *Journal of Cell Biology*, Vol. 193. doi:10.1083/jcb.201008173
- Okazakis, M., Takeshita, S., Kawai, S., Kikuno, R., Tsujimura, A., Kudo, A., Amann, E. 1994. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Molecular Cloning and Characterization of OB-cadherin, a New Member of Cadherin Family Expressed in Osteoblasts\* (Vol. 269).
- Orsulic, S., Huber, O., Aberle, H., Arnold, S., Kemler, R. 1999. E-cadherin binding prevents  $\beta$ -catenin nuclear localization and  $\beta$ -catenin/LEF-1-mediated transactivation. *Journal of Cell Science*, 112(8), 1237–1245.
- Padlan, E. A. 1994. Anatomy of the antibody molecule. *Molecular Immunology*, Vol. 31. doi:10.1016/0161-5890(94)90001-9
- Pardon, E., Laeremans, T., Triest, S., Rasmussen, S. G. F., Wohlkönig, A., Ruf, A., Muyldermans, S., Hol, W. G. J., Kobilka, B. K., Steyaert, J. 2014a. A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nature Protocols*, 9(3), 674–693. doi:10.1038/nprot.2014.039
- Pardon, E., Laeremans, T., Triest, S., Rasmussen, S. G. F., Wohlkönig, A., Ruf, A., Muyldermans, S., Hol, W. G. J., Kobilka, B. K., Steyaert, J. 2014b. A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. doi:10.1038/nprot.2014.039
- Pellis, M., Pardon, E., Zolghadr, K., Rothbauer, U., Vincke, C., Kinne, J., Dierynck, I., Hertogs, K., Leonhardt, H., Messens, J., Muyldermans, S., Conrath, K. 2012. A bacterial-two-hybrid selection system for one-step isolation of intracellularly functional Nanobodies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 526(2), 114–123. doi:10.1016/j.abb.2012.04.023

- Pishvaian, M. J., Feltes, C. M., Thompson, P., Bussemakers, M. J., Schalken, J. A., Byers, S. W. 1999. Cadherin-11 Is Expressed in Invasive Breast Cancer Cell Lines Cadherin-11 Is Expressed in Invasive Breast Cancer Cell Lines 1. (17), 947–952.
- Pohl, S. G., Brook, N., Agostino, M., Arfuso, F., Kumar, A. P., Dharmarajan, A. 2017, abril 3. Wnt signaling in triple-negative breast cancer. *Oncogenesis*, Vol. 6. doi:10.1038/oncsis.2017.14
- Porter, R. R. 1963. CHEMICAL STRUCTURE OF  $\gamma$ -GLOBULIN AND ANTIBODIES. *British Medical Bulletin*, 19(3), 197–201. doi:10.1093/oxfordjournals.bmb.a070056
- Rossotti, M. A. 2015. Plataforma para acelerar el descubrimiento de nanobodies contra blancos de interés biomédico y sus aplicaciones. 1–116. de <http://riquim.fq.edu.uy/archive/files/4ad5a6da4c490acf41c3c074e68b5045.pdf>
- Ruddick, J. H., Leslie, G. A. 1977. Structure and biologic functions of human IgD. XI. Identification and ontogeny of a rat lymphocyte immunoglobulin having antigenic cross-reactivity with human IgD. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 118(3), 1025–1031. de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/66267>
- Sambrook, J. Rissell, D. W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manua*. CSHL Press: New York.
- Sanz, L., Cuesta, Á. M., Compte, M., Álvarez-Vallina, L. 2005, junio. Antibody engineering: Facing new challenges in cancer therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, Vol. 26. doi:10.1111/j.1745-7254.2005.00135.x
- Sarrió, D., Rodriguez-Pinilla, S. M., Hardisson, D., Cano, A., Moreno-Bueno, G., Palacios, J. 2008. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Research*, 68(4), 989–997. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2017
- Satriyo, P., Bamodu, O., Chen, J.-H., Aryandono, T., Haryana, S., Yeh, C.-T., Chao, T.-Y. 2019. Cadherin 11 Inhibition Downregulates  $\beta$ -catenin, Deactivates the Canonical WNT Signalling Pathway and Suppresses the Cancer Stem Cell-Like Phenotype of Triple Negative Breast Cancer. *Journal of Clinical Medicine*, 8(2), 148. doi:10.3390/jcm8020148
- Scott, A. M., Wolchok, J. D., Old, L. J. 2012. Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 278–287. doi:10.1038/nrc3236
- SIGMA. 1990. *Fluorescein Isothiocyanate*. Saint Louis.
- Simonneau, L., Kitagawa, M., Suzuki, S., Thiery, J. 1995. Cadherin 11 expression marks the mesenchymal phenotype: towards new functions for cadherins? *Cell Adhes Commun*, 3(2), 115–130.
- Skerra, A., Plückthun, A. 1988. Assembly of a functional immunoglobulin Fvfragment in *Escherichia coli*. *Science*, 240(4855), 1038–1041. doi:10.1126/science.3285470
- Smith, G. P. 1985. Filamentous phage fusion: novel expression vectors that display cloned antigens on the surface of the virion. *Science*, 228(1984), 1315–1317.
- Steinmeyer, D. E., McCormick, E. L. 2008, julio. The art of antibody process development. *Drug Discovery Today*, Vol. 13. doi:10.1016/j.drudis.2008.04.005
- Syverson, C. D., Mankato, N., Us, M. N., Mcginnis, P. 2011. ( 12 ) Umed States Patent ( 10 ) Patent NO .: 2(12).
- Tanha, J., Xu, P., Chen, Z., Ni, F., Kaplan, H., Narang, S. A., MacKenzie, C. R. 2001. Optimal Design Features of Camelized Human Single-domain Antibody Libraries. *Journal of Biological Chemistry*, 276(27), 24774–24780. doi:10.1074/jbc.M100770200

- Thomassen, Y. E., Verkleij, A. J., Boonstra, J., Verrips, C. T. 2005. Specific production rate of VHH antibody fragments by *Saccharomyces cerevisiae* is correlated with growth rate, independent of nutrient limitation. *Journal of Biotechnology*, 118(3), 270–277. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.05.010
- Tomita, K., van Bokhoven, a, van Leenders, G. J., Ruijter, E. T., Jansen, C. F., Bussemakers, M. J., Schalken, J. a. 2000. Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer research*, 60(13), 3650–3654. doi:10.1158/0008-5472.can-05-3401
- van der Linden, R., de Geus, B., Stok, W., Bos, W., van Wassenaar, D., Verrips, T., Frenken, L. 2000. Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of *Lama glama*. *Journal of immunological methods*, 240(1–2), 185–195. doi:10.1016/s0022-1759(00)00188-5
- Vieira, J., Messing, J. 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods in Enzymology*, 153, 3–11. doi:10.1016/b978-0-12-765560-4.50017-4
- Wu, T. Te, Johnson, G., Kabat, E. A. 1993. Length distribution of CDRH3 in antibodies. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Vol. 16. doi:10.1002/prot.340160102
- Wu, Y., Kanchanawong, P., Zaidel-Bar, R. 2015. Actin-Delimited Adhesion-Independent Clustering of E-Cadherin Forms the Nanoscale Building Blocks of Adherens Junctions. *Developmental Cell*, 32(2), 139–154. doi:10.1016/j.devcel.2014.12.003
- Xu, J., Prosperi, J. R., Choudhury, N., Olopade, O. I., Goss, K. H. 2015.  $\beta$ -Catenin Is Required for the Tumorigenic Behavior of Triple-Negative Breast Cancer Cells. *PLOS ONE*, 10(2), e0117097. doi:10.1371/journal.pone.0117097
- Yang, C. C., Graves, H. K., Moya, I. M., Tao, C., Hamaratoglu, F., Gladden, A. B., Halder, G. 2015. Differential regulation of the Hippo pathway by adherens junctions and apical- Basal cell polarity modules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(6), 1785–1790. doi:10.1073/pnas.1420850112
- Yang, J., Weinberg, R. A. 2008. Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Developmental Cell*, 14(6), 818–829. doi:10.1016/j.devcel.2008.05.009
- Yau, K. Y. F., Dubuc, G., Li, S., Hiramata, T., MacKenzie, C. R., Jermutus, L., Hall, J. C., Tanha, J. 2005. Affinity maturation of a VHH by mutational hotspot randomization. *Journal of Immunological Methods*, 297(1–2), 213–224. doi:10.1016/j.jim.2004.12.005
- Zhan, T., Rindtorff, N., Boutros, M. 2017, marzo 1. Wnt signaling in cancer. *Oncogene*, Vol. 36. doi:10.1038/onc.2016.304

## Anexos

---

### Secuencias de oligonucleótidos.

- Secuencia del oligonucleótido CALL001: 5'-GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG-3'.
- Secuencia del oligonucleótido CALL002: 5'-GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC-3'.

*MKENYCLQAALVCLGMLCHSHAFAPERRGHLRPSFHGHHEKKGEGQVLQRSKR  
GWWWNQFFVIEEYTGDPVLVGRLHSDIDSGDGNIKYILSGEGAGTIFVIDDKSGNI  
HATKTLDREERAQYTLMAQAVDRDTNRPLEPPSEFIVKVQ*

**Figura 29. Secuencia del péptido CDH11-EC1.** Secuencia aminoacídica del péptido sintético de la Cadherina-11 Ectodominio 1 utilizado en la inmunización, rondas de selección y ensayo ELISA (Syverson et al., 2011).