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

Doctorado en Ciencias
en Ciencia de la Vida
con Orientación en Biotecnología Marina

CCMV y BMV como potenciales nanovehículos en tratamientos contra el cáncer de mama

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

Presenta:

Alfredo Nuñez Rivera

Ensenada, Baja California, México
2020

Tesis defendida por

Alfredo Nuñez Rivera

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Rubén Darío Cadena Nava
Director de tesis

Miembros del comité
Dra. Patricia Juárez Camacho

Dr. Rafael Vázquez Duhalt

Dr. José Luis Stephano Hornedo

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

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Alfredo Nuñez Rivera © 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 **Alfredo Nuñez Rivera** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnologia Marina

CCMV y BMV como potenciales nanovehículos en tratamientos contra el cáncer de mama

Resumen aprobado por:

_____

Dr. Rubén Darío Cadena Nava
Director de tesis

El uso de las nanopartículas como vehículos para las terapias contra el cáncer es un área con un tremendo potencial. Los virus de plantas son nanopartículas biocompatibles con posibles aplicaciones biomédicas, incluyendo las terapias contra el cáncer, con resultados prometedores. Este trabajo describe por primera vez que el virus del moteado clorótico de caupí (CCMV) y el virus del mosaico bromo (BMV) son capaces de internalizarse en células de mamíferos como las células tumorales de mama MDA-MB-231 y MCF7. Además, las cápsides de estos bromovirus fueron capaces de cargar fármacos hidrófobicos. Por otra parte, desarrollamos una plataforma para encapsidar y direccionar ARN de interferencia pequeños (siARN) de doble cadena utilizando las propiedades de autoensambleje de las proteína de cápside de estos virus, para formar partículas tipo virus (VLPs). Mostramos que las VLPs-siRNA tienen el potencial de liberar el siRNA en células de mamíferos para silenciar la proteína verde fluorescente (GFP) en cultivos de células que expresan este gen. Se evaluó que estos virus presentan un efecto citotóxico casi nulo en células tumorales de mama. Sin embargo, solo el CCMV es capaz de activar macrófagos, *in vitro*, pudiendo activar una respuesta inmune, mientras que el BMV no mostró activación de macrófagos. La evaluación *in vivo* de los virus nativos y VLPs-siRNA en modelos de ratón 4T1 de cáncer de mama metastásico mostró que el CCMV nativo y el BMV-VLP-siRNA-AKT1 pueden inhibir hasta el 60-70% del tumor. A su vez, se evaluó el potencial de la molécula sd-133, anti-CDH11, para reconocer específicamente a células de cáncer de mama e inducir un efecto citotóxico. En conjunto, estos resultados muestran el potencial de los virus CCMV y BMV como nanovehículos y su versatilidad de combinar diferentes tratamientos para desarrollar terapias novedosas, entre las que se incluyen la modulación del microambiente del tumor y la activación de una respuesta inmune, administración de siARN y fármacos a células cancerígenas para inducir eficientemente la muerte celular.

Palabras clave: Partículas tipo virus (VLPs); BMV; CCMV; Biocompatibilidad; entrega de siRNA; Silenciamiento de la expresión génica; Tratamiento para cancer de mama.

Abstract of the thesis presented by **Alfredo Nuñez Rivera** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology.

CCMV and BMV as potential nanovehicles in breast cancer treatments

Abstract approved by:

_____

Dr. Rubén Dario Cadena Nava
Thesis Director

The use of nanoparticles as vehicles for cancer therapies is an area with tremendous potential. Plant viruses are biocompatible nanoparticles with possible biomedical applications, including cancer therapies, with promising results. Here we report for the first time that the cowpea chlorotic mottled virus (CCMV) and the brome mosaic virus (BMV) are able to internalize in mammalian cells such as breast tumor cells MDA-MB-231 and MCF7. In addition, the capsids of these bromovirus can be loaded with hydrophobic drugs. On the other hand, we developed a platform to encapsidate and direct double-stranded small interference RNA (siRNA) using the self-assembly properties of the capsid proteins of these viruses, to form virus-like particles (VLPs). We demonstrate that VLPs-siRNA have the potential to release siRNA in mammalian cells to silence green fluorescent protein (GFP) in cell expressing this gen. It was demonstrated that these viruses do not have a cytotoxic effect on tumor cells. However, only CCMV is able to activate macrophages, *in vitro*, and so they could activate an immune response, while BMV showed no macrophage activation. *In vivo* evaluation of native viruses and VLPs-siRNA in 4T1 mouse models of metastatic breast cancer showed that native CCMV and BMV-VLP-siRNA-AKT1 can inhibit up to 60-70% of the tumor. In turn, the potential of the sd-133 molecule, anti-CDH11, to specifically recognize breast cancer cells and induce a cytotoxic effect was evaluated. Together, these results show the potential of CCMV and BMV viruses as nanocarriers and their versatility to combine different treatments to develop novel therapies, including the modulation of the tumor microenvironment and the activation of an immune response, administration of siRNA and drugs to cancer cells to efficiently induce cell death.

Keywords: Plant Virus-like particles (VLPs); BMV; CCMV; Biocompatibility; siRNA delivery; Silencing gene expression; Breast-tumor treatment.

Dedicatoria

Este trabajo como muchos más logros en mi vida se lo dedico a mi familia, principalmente a mis padres, abuela y mi pareja, que sin su ayuda y colaboración no hubiera sido posible desempeñarme de igual forma.

Les agradezco el inculcarme que siempre hay que tener objetivos en la vida y muchas veces estos implican mucho tiempo y esfuerzo pero que al final siempre llegan las recompensas. Espero poder retribuir todo esfuerzo que les pudiera haber conllevado presentarme una buena educación.

Gracias.

Agradecimientos

En esta sección tendría que incluir y mencionar a cada uno de las personas que participaron y formaron parte de este proyecto.

Principalmente al Dr. Rubén Darío Cadena Nava por darme la oportunidad de integrarme a su grupo de trabajo y siempre darme la libertad de proponer y participar en sus proyectos sin restricciones. Quisiera agradecer a todo el comité de tesis, explícitamente a Dr. Rafael por su valiosa asesoría, a la Dra. Patricia y al Dr. Stephano por toda la ayuda y consejos para culminar este proyecto.

Este es sin duda el grupo de investigación donde me han dado las mayores oportunidades para forjarme como investigador por lo que siempre estaré agradecido. También debo de agradecer a los técnicos del laboratorio Dra. Katrin Quester y Mtra. Itandehui Betanzo por las atenciones prestadas en el laboratorio tanto a nivel administrativo como técnico. De igual forma quiero agradecer a todos mis compañeros del laboratorio de Iván, Kendra, Eduardo y Daniel que durante la etapa de desarrollo del proyecto mostraron una gran colaboración y compañerismo. Específicamente me gustaría agradecer al Dr. Pierrick y a la M.C. Danna por su apoyo en los ensayos de citometría de flujo e *in vivo* en ratones, a la Dra. Ana por el análisis de activación de macrófagos, a la Dra. Kanchan por la síntesis de la molécula sd-133, a los técnicos de microscopia confocal Dra. Olga y Dr. Diego, y por ultimo a los técnicos el Sr. Francisco Ruiz Medina (CNyN-UNAM) y a Juan Cristóbal (CICESE) por haberme ayudado en el análisis de las muestras por medio de microscopia de transmisión electrónica.

Es importante también agradecer a la institución CICESE y UNAM por permitirme formar parte de su posgrado y llevar acabo mi proyecto de investigación. Agradezco a los proyectos de CONACYT CB 239878 y PN 247474 por haber financiado este trabajo de investigación.

Tabla de contenido

Resumen en español iii
Resumen en inglés iv
Dedicatorias v
Agradecimientos vi
Lista de figuras ix
Lista de tablas x

Capítulo 1. Introducción

1.1 Antecedentes 2
1.1.1 El uso de virus como vectores en terapias con el cáncer 2
1.1.2 El virus del CCMV y BMV como modelo de estudio 4
1.1.3 RNAi en cáncer..... 4
1.1.4 Evasión de la apoptosis 6
1.1.5 Insensibilidad a señales anti-proliferativas 7
1.1.6 La vía PI3K/AKT en cáncer 8
1.1.7 Estrategias para modificar y optimizar las VLP 10
1.1.8 Caderina-11 y su relación con cáncer 13
1.1.9 Transición epitelial a mesenquimal (ETM) 13
1.1.10 Inmunoterapia basada en virus 15
1.1.11 Vacunas contra el cáncer 17
1.2 Justificación 18
1.3 Hipótesis 18
1.4 Objetivos 19
1.4.1 Objetivo general 19
1.4.5 Objetivos específico 19

Capítulo 2. Metodología

2.1 Producción y purificación del virus 20
2.2 Caracterización de las cápsides virales 21

2.3 Cultivos celulares 21
2.4 Ensayos de herida en placa y proliferación celular 22
2.5 Marcado fluorescente de los virus 22
2.6 Cultivos celulares e internalización de virus 23
2.7 Ensayo de viabilidad celular 23
2.8 Funcionalización de superficie de BMV y CCMV con PEG 24
2.9 Inmunogenicidad *in vitro* de los virus CCMV y BMV 24
2.10 Síntesis de VLPs-siRNA e inhibición de la expresión génica 25
2.11 Modelo de tumor de glándula mamaria en ratones 26
2.12 Síntesis de sd-133-NH_2 27

Capítulo 3. Resultados y Discusión

3.1 Internalización de los virus CCMV y BMV 28
3.2 Biocompatibilidad de CCMV y BMV 31
3.3 Inmunogenicidad de CCMV y BMV 32
3.4 Síntesis y caracterización de VLPs-siRNA 35
3.5 BMV VLPs-siAKT1 37
3.6 Diseño de VLPs-CDH11 40

Capítulo 4. Conclusiones

4.1 Trabajo a futuro 49

Literatura citada 51

Anexos 63

Lista de figuras

Figura		Página
1	Estructura de diferentes modelos de virus utilizados como nanovehículo …….	3
2	Mecanismo de acción RNAi ……..	5
3	La vía de señalización de PI3K/AKT ……	9
4	Ilustración de las principales estrategias para la funcionalización de nanopartículas..	12
5	Participación de la EMT en cáncer ……..	15
6	Activación de la respuesta inmune por nanopartículas basadas en virus …….	17
7	Captación celular de virus CCMV y BMV……	30
8	Internalización de CCMV y BMV conjugado con FITC ……..	31
9	Biocompatibilidad y respuesta inmune de CCMV y BMV……..	34
10	Encapsidación de siRNA usando CCMV y BMV ……..	36
11	Caracterización de VLPs BMV-siAKT1 ……..	38
12	Efecto terapéutico antitumoral de las nanopartículas de virus……	39
13	Representación esquemática de la síntesis de sd-133-NH_2 ……	42
14	Citotoxicidad de sd-133 conjugada al BMV ……	43
15	Inhibición de los procesos de proliferación y migración celular por BMV-sd-133 …….	44
16	Modelos propuestos del mecanismo de acción las VLPs-sd133 ……..	48
17	Internalización de CCMV y BMV conjugado con FITC……..	63
18	(a) Histograma del diámetro de VLPs de BMV-siGFP y siAKT1……..	64
19	Distribución de volumen de diámetros y tamaños de VLP de BMV – siAKT1 (curva roja) y BMV nativo (curva azul) por DLS……	65
20	Curvas de calibración por fluorescencia para cuantificar el siRNA y la proteína de cápside de las BMV VLPs-siAKT1……	66
21	Medición de tamaño y carga para las moléculas BMV-sd-133 y BMV-PEG-sd-133……	67

Lista de tablas

Tabla 1 Página

1 Oligos sintetizados para los siRNA ……. 26

Capítulo 1. Introducción

Actualmente, no existe un tratamiento eficaz que permita la entrega eficiente y específica de fármacos contra células cancerosas, por lo cual este sigue siendo un desafío para la nanomedicina. En particular, las terapias contra el cáncer a menudo son limitadas porque solo una pequeña fracción de la dosis administrada llega a los tumores (Blanco et al., 2015; Ferrari et al., 2010; Michor et al., 2011). Esto se asocia con una serie de barreras biológicas que pueden reducir la acumulación de fármacos en tumores (Patel et al., 1998), tales como: secuestro por el sistema de fagocitos mononucleares (MPS) (Frangioni et al., 2010), una distribución no específica (Åberg et al., 2013) , limitaciones de flujo en los vasos sanguíneos (Ferrari et al., 2010), gradientes de presión, internalización celular (Farokhzad et al., 2008), escape de compartimentos endosómicos y lisosomales, y bombas de excreción de fármacos (Bates et al., 2002).

El uso de nanopartículas como nanovehículos podría ser una solución para superar estas barreras, ya que ofrecen grandes ventajas debido a su tamaño nanométrico, su autoensamblaje y su posible dirección a tejidos específicos (Kobayashi et al., 2011). Además, pueden aumentar la solubilidad y aumentar sustancialmente la vida media de circulación de los medicamentos (Evans et al., 2013; Shen et al., 2016; Chen et al., 2010). Diferentes trabajos han demostrado que es posible la acumulación de nanopartículas en tumores, ya sea de forma pasiva o dirigida (Peabody et al., 2011). Por lo tanto, existen múltiples esfuerzos para diseñar nanopartículas que funcionen como nanovehículos, principalmente se ha considerado el uso de liposomas, polímeros sintéticos, dendrímeros y partículas tipo virus (VLPs) (Langer et al., 2007; Chen et al., 2010). Recientemente, el desarrollo de VLPs ha logrado llegar a etapas clínicas, ya que se ha propuesto que presentan una alta biocompatibilidad (Singh et al., 2006; Douglas et al., 2006). Específicamente, las VLPs derivadas de virus de plantas pueden tener mucha relevancia debido a su fácil manejo y estructura simple. En especial, los bromovirus de plantas, tal como el virus del moteado clorótico de caupí (CCMV) y el virus del mosaico del bromuro (BMV) son nanopartículas virales que se han propuesto como plataforma para el desarrollo de terapias dirigidas y como agentes de diagnóstico de células cancerosas (Stuhlmann et al., 2006; Neuwelt et al., 1995; Hakumaki et al., 2006). La cápside de ambos virus esta compuesta de 180 proteínas idénticas con simetría T= 3 y de un tamaño de 28 nm de diámetro (Johnson et al., 1995). La región N-terminal de la proteína de la cápside (CP) es altamente básica y está cargada positivamente, 10 z^+ para el CCMV y 9 z^+ para el BMV, y la función principal de esta región es la unión a su genoma que es RNA de cadena sencilla (Gelbart et al., 2012). Esta región de la CP es muy importante y puede ser usada para encapsidar moléculas aniónicas como RNA heterólogos, RNA mensajeros (Gelbart et al., 2013), enzimas (Vazquez-Duhalt et al., 2014), fármacos (Yadav et al., 2016) y

nanopartículas de oro (Dragnea et al., 2007). Además, las VLPs derivadas de estos virus tienen la posibilidad de ser dirigidas a células blanco a través de la funcionalización de su superficie externa (Yadav et al., 2016; Douglas et al., 2002). Sin embargo, hasta ahora no se ha reportado el uso de virus de plantas en terapias moleculares contra el cáncer, específicamente para silenciar la expresión de genes mediante el uso de cápsides virales de plantas cargadas con un siRNA específico. Por tales motivos, en este trabajo, evaluamos la capacidad de internalización, toxicidad e inmunogenicidad de los virus del BMV y CCMV en células de cáncer de mama. Además, mostramos la capacidad de las cápsides de estos virus para cargarse con tamoxifeno, el principal fármaco utilizado en el cáncer de mama. A su vez, se presenta la capacidad de las proteínas de la cápside del virus para encapsular eficazmente el siRNA, y se evalúa su uso potencial como nanovehículos en terapias contra el cáncer de mama.

1.1 Antecedentes

1.1.1 El uso de virus como vectores en terapias con el cáncer.

Los tratamientos habituales para combatir el cáncer consisten en cirugía, radiación y quimioterapia, sin embargo no ofrecen ninguna especificidad hacia tejidos tumorales y parecen haber alcanzado un tope en su efectividad. Por otro lado, el desarrollo de nuevas modalidades terapéuticas, cuya función sea el envió dirigido a células malignas como blanco molecular, está evolucionando como una nueva tendencia en el tratamiento contra el cáncer. Dentro de este contexto, el concepto de virus atenuados como agentes anticancerígenos, que específicamente se repliquen dentro de los tejidos malignos, proporciona una oportunidad única no sólo como un agente terapéutico contra el cáncer en sí, sino también como un herramienta para administrar de una manera selectiva terapias contra el cáncer (Nemunaitis et al. 1999; Zou et al. 2001).

Existe evidencia reciente de casos específicos donde se reporta el uso de virus como tratamiento en pacientes con cáncer, en donde se utilizaron virus de baja toxicidad para tejidos normales y de alta capacidad oncolítica para células cancerígenas, dando como resultado efectos prometedores (Libnoch et al. 1978; Pack et al. 1950). Con base a estos antecedentes se han utilizado una amplia gama de virus como vectores en terapias génicas contra el cáncer, como es el caso de los adenovirus, HSV-1, virus de la influenza, virus tipo replicon, retrovirus, etc. Sin embargo, todos estos virus son de origen animal, y

no han sido del todo aceptados, ya que presentan efectos secundarios, porque no solo son citotóxicos para células malignas, sino que también presentan actividad en células normales. Debido a estas complicaciones hoy en día muchos grupos de investigación han comenzado a considerar los virus de plantas, ya que estos no presentan efectos citotóxicos en células de mamíferos. Dentro de la gran variedad de virus de planta, los virus del CCMV (Cowpea Chlorotic Mottle Virus) y BMV (Brome Mosaic Virus), son un buen modelo de estudio que consideramos para este trabajo de investigación por tener la capacidad de encapsidar una gran variedad de moléculas sin necesidad de una señal molecular de encapsidación. Además, estos virus son muy estables a diferentes condiciones de temperatura, pH y fuerza iónica, así también tienen la capacidad de ser modificados genéticamente sin comprometer su autoensamblado (Gelbart et al., 2013).

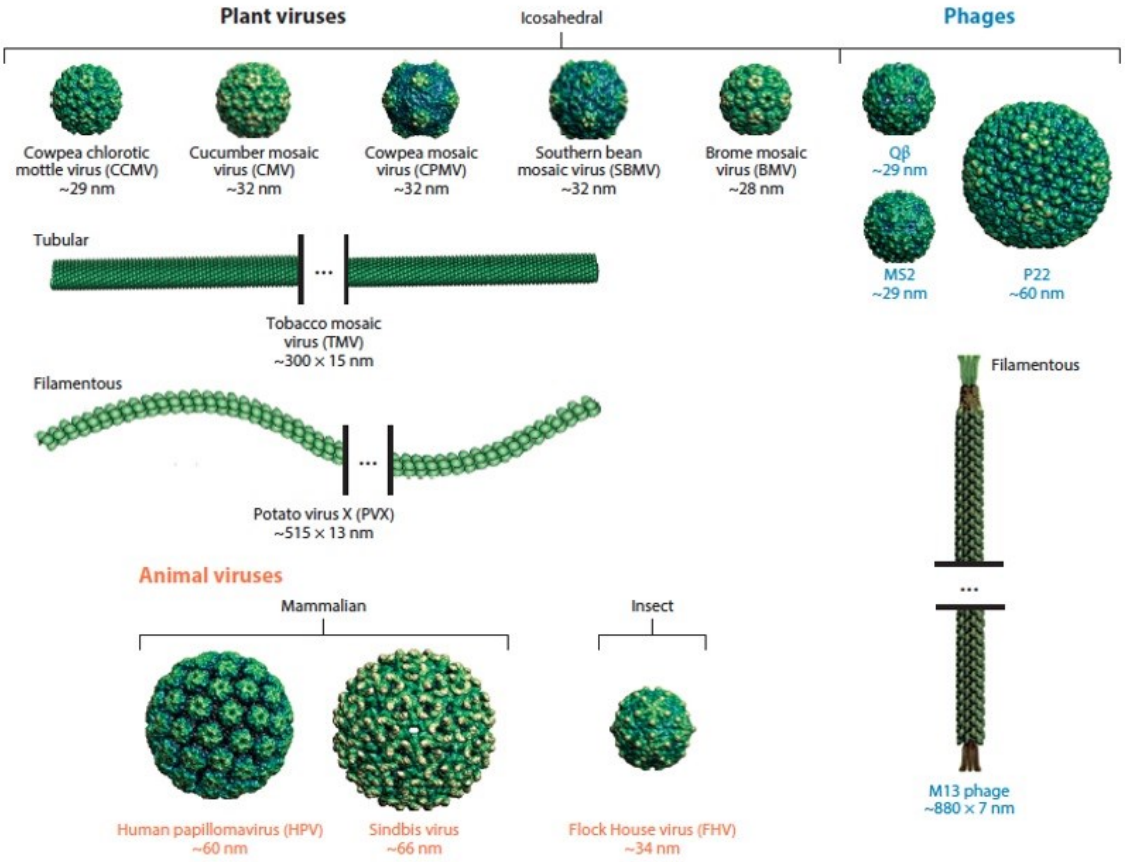


Figura 1. Estructura de diferentes modelos de virus utilizados como nanovehículos. Esta representaciones esquemáticas de los diferentes tipos de virus fueron tomadas de Steinmetz et al., 2015.

1. 1. 2 El virus del CCMV y BMV como modelo de estudio.

El CCMV y BMV son virus de planta que pertenecen al género de los bromovirus, el cual esta constituido por una cápside icosaédrica (T=3), constituida por 180 proteínas idénticas que forman 12 pentámeros y 20 hexámeros (Bancroft et al. 1968) (Figura 1). Este virus tiene un diámetro exterior de 28 nm y cuenta con un peso molecular de 4.6 x 10^6 Dalton y como se mencionó anteriormente, puede encapsular moléculas de RNA de cadena sencilla (ssRNA) de alrededor de 3000 nt (1 x 10^6 Dalton de peso molecular) (Finch et al., 1967; Bancroft et al., 1967). Sin embargo, ya se ha demostrado que el CCMV no solo es capaz de encapsular ssRNA heterólogos si no también polímeros sintéticos aniónicos (Bracker et al., 1969). La estabilidad de este virus así como su proceso de ensamble y desensamble es importante ya que permite el encapsulamiento espontaneo de las moléculas de interés, y el cual depende del pH de la solución y de la fuerza iónica (Bancroft y Hiebert, 1967). Además, la capacidad que tiene de ser modificado químicamente abre la posibilidad de ser utilizados para la administración sitio dirigida de fármacos o moléculas específicas hacia células de mamífero (Destito et al.,2007; Gonzales et al., 2009; Yildiz et al., 2011; Steinmetz et al., 2010; Wu et al., 2012). Por lo que hoy en día no es sorprendente que en el área de la nanomedicina se estén diseñando partículas tipo virus derivadas de virus de plantas para el transporte y envío de una variedad de fármacos, y toxinas que se han conjugado con algún péptido ligando para producir citotoxicidad selectiva contra células cancerosas (Ashley et al., 2011). Sin embargo, el diseño de nanopartículas para terapias moleculares, como el uso del RNAi, ha tomado mayor relevancia al permitir inhibir selectivamente genes de interés e inducir la muerte de células cancerígenas.

1. 1. 3 RNAi en cáncer.

El uso de la molécula de RNAi es hoy en día una de las grandes promesas para poder combatir ciertas enfermedades como el cáncer. Imaginemos que podemos identificar el papel de un gen en una enfermedad y apagarlo con facilidad, en el lapso de sólo un día, y en casi cualquier organismo. Por lo que el uso de esta herramienta es de gran interés para tratar ciertas enfermedades, incluyendo el cáncer, por tan solo silenciar los genes de interés (oncolíticos). Esa es la promesa que ofrece RNAi (Safia Wasi et al., 2003). El mecanismo de acción de los RNAi se basa en la degradación del RNA de cadena doble (dsRNA) en fragmentos más pequeños por la enzima llamada DICER. Esta enzima corta al dsRNA

en dos clases de pequeños RNAs: micro-RNAs (miRNAs) y pequeños RNAs de interferencia (siRNAs), que son de alrededor de 21-23 nucleótidos de longitud. Cabe mencionar que los miRNAs también interrumpen la transcripción de proteínas, sin embargo se cree que los siRNAs son los principales protagonistas del RNAi. El DICER entrega estos siRNAs a un grupo de proteínas llamado complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC, del inglés RNA-induced silencing complex), que utiliza la cadena anti-sentido del siRNA para unirse y degradar al RNAm correspondiente, resultando en el silenciamiento del gen (Figura 2) (Safia Wasi et al., 2003).

En base a estos antecedentes, utilizar los RNAi como mecanismo de regulación de pro-oncogenes, nos podría permitir modular también la expresión de algunos otros genes supresores de tumores que nos conllevaría a inducir el mecanismo de muerte celular programada (apoptosis).

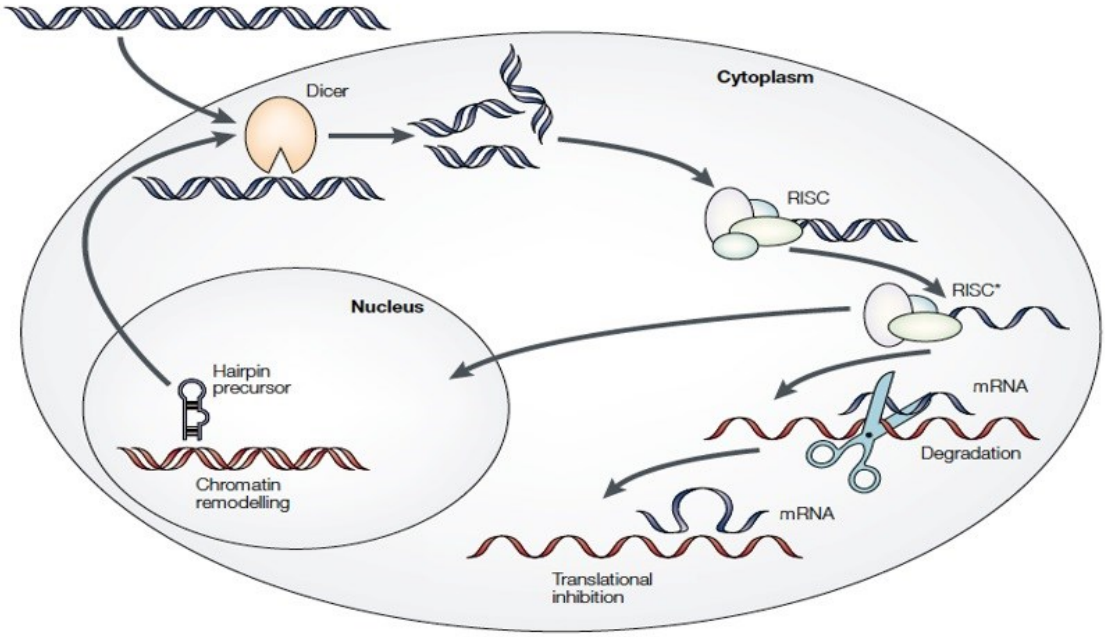


Figura 2. Mecanismo de acción. Representación esquemática de cómo son procesados los dsRNA para interrumpir la expresión de cierto gen de interés (Safia Wasi et al., 2003).

1. 1. 4 Evasión de la apoptosis.

En condiciones homeostáticas, el número total de células en organismos multicelulares es un balance entre el efecto de generar células por mitosis y la muerte celular por apoptosis. El descontrol de este delicado balance puede permitir el desarrollo de cáncer.

Existen genes supresores de tumores, que inducen la muerte en células que presentan daño en el DNA con la finalidad de impedir su proliferación. Dos vías importantes en la supresión de tumores son la vía de p53 y la proteína retinoblastoma (Rb), las cuales actúan como puntos de control del ciclo celular, siendo estas las principales barreras que evitan el desarrollo de cáncer (Whibley et al., 2009). La via p53 tiene un papel clave en la preservación de la estabilidad genómica en respuesta a estrés, por lo que p53 se activa en respuesta a una gran variedad de estímulos nocivos, de los cuales podemos mencionar: daño del DNA, hipoxia, estrés metabólico y la activación de oncogenes (Whibley et al. 2009). El mecanismo mejor documentado del papel protector de p53 es su función como factor transcripcional. Uniéndose a un elemento de respuesta específico en el DNA, p53 modula la transcripción de genes que gobiernan el arresto del ciclo celular, la apoptosis, el mantenimiento de la integridad genética, la inhibición de angiogénesis y senescencia celular, son los mecanismos que conforman la mayor defensa contra el crecimiento de tumores. p53 también interactúa con numerosas proteínas celulares, incluyendo aquellas que controlan la muerte celular programada, y estas interacciones moleculares deben contribuir a la función inhibitoria de p53 en tumorigénesis (Whibley et al., 2009). Entre los genes que regula p53 encontramos a WAF1, CIP1, p21 y ciclina G los cuales están involucrados en el arresto del ciclo celular, en la fase G1 (Golias et al. 2004), genes apoptóticos como *BAX*, *BID*, *NOXA (PMAIP1)* y *BBC3 (PUMA),*los cuales pertenecen a la familia de *Bcl-2*, y genes involucrados en la reparación del DNA como *GADD45* (Moon et al. 2008; Whibley et al. 2009). La regulación negativa de esta molécula es mediada por la unión de las proteínas MDM2 y MDM4 a p53.

La otra vía importante en la supresión de tumores es mediada por Rb, ya que participa en la regulación del ciclo celular, y por lo tanto en el desarrollo y proliferación de células. Rb funciona como modulador transcripcional al interactuar con el factor de transcripción E2F, reprimiendo la expresión de genes necesarios para la progresión del ciclo celular, por lo que RB se considera como un regulador negativo del ciclo celular *(Morris et al. 2008; Malumbres et al. 2009)*. Las proteínas Arf y FBXO31 son otros factores importantes que actúan como supresores de tumores, frenando señales de estrés generadas por la célula. En el caso de FBXO31 (F-box protein), esta induce el arresto celular al degradar directamente a ciclina D1 (Santra et al. 2009). Por otro lado, Arf actúa como un transactivador de p53,

específicamente al reprimir la actividad de la proteína encargada de degradar a p53, MDM2 (van Maerken et al. 2009). La regulación negativa de estas señales, mediante partículas tipo virus (VLPs), nos permitirá promover que las células cancerígenas entren en procesos de regulación celular como el de muerte celular programada (apoptosis).

1. 1. 5 Insensibilidad a señales anti-proliferativas.

En condiciones normales existen diferentes factores de crecimiento (EGF, HGFR, FGF, INR/IR, NGF y PDGF, entre otros), mitógenos (miembros de la familia TNFα) y lectinas, inducen el crecimiento celular. Estos actúan uniéndose a sus respectivos receptores de membrana, de los cuales la mayoría tienen actividad de cinasa de tirosina (RTKs). Estos receptores, al unirse a su ligando, son activados y generan señales que llegan al núcleo estimulando la división celular (Alberts et al., 2002). Por tanto la regulación negativa de estas señales es esencial para prevenir la aparición de cáncer.

Las señales generadas por los receptores RTKs inducen una cascada de señalización que involucran a proteínas de la familia de la cinasa de tirosina Scr, serina/treonina- cinasas como AKT, cinasas de lípidos como PI3K, moléculas adaptadoras como Grb2, Drk, Sem-5 y Nck entre otros, GEFs (del inglés Guanine nucleotide Exchange Factors) como SOS y Vav, GTPasa como Ras y MAP-cinasas como Raf-1, MEK y ERK1/2. Esta última cinasa de la vía de las MAP-cinasas es capaz de translocarse al núcleo y activar factores de transcripción los cuales regulan positivamente la expresión de proteínas involucradas en la regulación de proliferación celular. Todas las moléculas que participan en la inducción de la proliferación celular se consideran proto-oncogenes, en virtud de que mutaciones en estos proto-oncogenes generan moléculas constitutivamente activas (oncogenes) que resultan en un estímulo constante de proliferación (Whitfield et al., 2006).

Los oncogenes pueden ser divididos en factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, transductores de señales y factores de transcripción. Entre los factores de transcripción podemos encontrar a Elk, el cual es responsable de la expresión de genes inmediatos como *c-Fos, NF-κB y c-Myc*, los cuales a su vez regulan positivamente la expresión de genes requeridos para la proliferación celular como *Ciclina-D1*, o negativamente la expresión de genes antiproliferatorios como *p21, p27, p16,* e inductores de muerte como *GAD54, BCL-Xs,* entre otros (Barna et al., 2008).

Recientemente se ha demostrado que la vía de PI3K/AKT, la cual regula la fosforilación de las proteínas BCL, es una de las principales vías que modulan las señales anti- apoptóticas.

1. 1. 6 La vía PI3K/AKT en cáncer.

AKT es una cinasa serina/treonina (también llamada proteína cinasa B, PKB), que hoy en día se ha demostrado que es una molécula de señalización crucial dentro de las células eucariotas. Las células de mamíferos expresan tres isoformas de AKT: AKT1 (PKBα), AKT2 (PKBβ) y AKT3 (PKBγ), cada una de las cuales es codificadas por diferentes genes (Franke et al., 2008b). Las isoformas de AKT presentan diferencias funcionales , AKT1 está involucrada principalmente en el metabolismo de la glucosa, mientras que AKT2 y AKT3 se encuentran patológicamente incrementadas en cáncer (Cheng et al., 1996). Además, también se han demostrado que al aumentar la actividad de AKT2 se incrementa la motilidad celular, invasión y el potencial metastásico (Arboleda et al., 2003).

Para entender la regulación celular de AKT fue crítico el descubrimiento de que la actividad de la cinasa AKT se induce después de la activación de PI3K en respuesta a la activación de diferentes receptores para factores de crecimiento específicos (Figura 3) (Burgering et al., 1995). Existen otras evidencias de la importancia de esta vía en células tumorales, como por ejemplo, el gen supresor de tumores PTEN, una fosfatasa que inactiva los productos de PI3K e inhibe la actividad de AKT, y que se encuentra frecuentemente mutado en cáncer (Franke et al., 2008a). Sin embargo, estas no son los únicos cambios oncogénicos que permiten incrementar la actividad de AKT. La alteración de receptores de factores de crecimiento así como alteraciones en Ras también resultan en la hiperactivación de AKT (Franke et al., 2008b).

Uno de los primeros blancos identificados de AKT que tiene implicaciones anti-apoptoticas es *BAD*, el cual al dimerizar con BCL-X cancela las funciones anti-apoptóticas de esta última. La regulación de *BAD* por AKT ejemplifica una de las posibles vía moleculares que suprimen el mecanismo de apoptosis (Franke et al., 2008b). Cuando *BAD* no está fosforilado, inhibe a *Bcl-XL* y a otros miembros anti-apoptóticos de la familia de *Bcl-2*. Una vez fosforilado *BAD* es retenido en el citoplasma en donde su actividad pro-apoptótica es neutralizada (Zha et al., 1996). Por lo que la activación de AKT protege a las células tumorales de entrar en apoptosis.

El ciclo celular es otro proceso donde AKT juega un papel importante, ya que esta molécula afecta al menos a dos reguladores negativos del ciclo celular: p21 y p27. Específicamente p21 es estabilizado después de la activación de la vía de AKT, ya sea por su fosforilación directa o por la inactivación de GSK3. AKT también fosforila a p27, induciendo su inhibición mediante su retención en el citoplasma (Rossig et al., 2001).

Se han encontrado evidencias adicionales de la participación de AKT en la regulación de la proliferación celular, como la capacidad de inhibir la actividad de un supresor de tumores como es p53. Específicamente, al estar activa AKT fosforila a la E3 ubiquitin ligasa HDM2 (o su homólogo en ratón Mdm2), promoviendo de esta manera la degradación de p53 (Fig.1). Aunado a esto, también se ha demostrado que los niveles de p53 son regulados positivamente al interactuar directamente con PTEN, aumentando la actividad transcripcional de p53 (Freeman et al., 2003). En base a este antecedente la cinasa AKT podría ser un candidato idóneo para ser regulado o bloqueado por medio de VLPs que contengan un siRNA-AKT1.

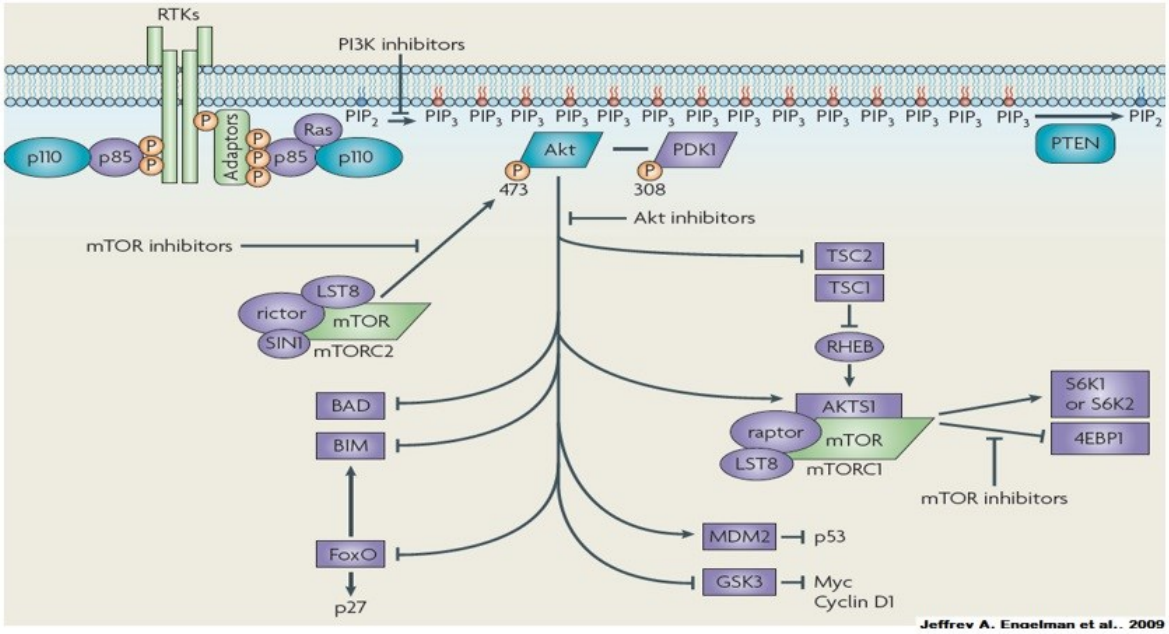


Figura 3. La vía de señalización de PI3K/AKT. El esquema ejemplifica la participación que tiene la vía de PI3K/AKT en inhibir moléculas clave en apoptosis, *BAD*, *BIM*, p53, y estimular reguladores del ciclo celular, como Myc y ciclina D1.Todo esto al recibir un estímulo de la membrana, en este caso al receptor con actividad de cinasa de tirosina (Burgering and Coffer et al., 1995).

1. 1. 7 Estrategias para modificar y optimizar las VLPs.

Se pueden usar diversas técnicas para adaptar y modificar VLPs, incluyendo ingeniería genética, encapsulación, biomineralización, infusión y bioconjugación (Figura 4) (Steinmetz et al., 2015). La ingeniería genética permite cambiar la estructura básica de la proteína de la superficie insertando, eliminando o sustituyendo residuos de aminoácidos (Finn et al., 2002; Peabody et al., 2003; Francis et al., 2007; Douglas et al., 2003). Dichos cambios incluyen la edición de la sección terminal (agregando secuencias al término de cada proteína de la superficie), la inserción de secuencias que forman estructuras secundarias (bucles) en la superficie o la inserción o intercambio de aminoácidos individuales para introducir cadenas que permiten la funcionalización (Finn et al., 2008; Lin et al., 2005) o para alterar las propiedades fisicoquímicas generales de las VLPs (Willits et al., 2002). Ejemplos prominentes de tales modificaciones incluyen la introducción de etiquetas de purificación / inmunodetección, la introducción de secuencias de epítropes para que el VLP funcione como una vacuna (Manchester et al., 2010), y la introducción de secuencias de direccionamiento que permiten que el VLP se dirija a receptores celulares específicos (Steinmetz et al., 2011).

Las proteínas de cápside de los virus han evolucionado para autoensamblarse alrededor de ácidos nucleicos en condiciones fisiológicas, y esta propiedad puede explotarse para desensamblar las VLPs o ensamblarlas en estructuras deseables alrededor de moléculas de interés terapéutico. Se pueden usar dos principios básicos para inducir la encapsidación de moléculas de interés (cargo): (a) La carga superficial e interacciones electrostáticas o (b) interacciones de unión únicas que ocurren durante el autoensamblamiento (De et al., 2010; Bronsti et al., 2006; Tsvetkova et al. 200; Chen et al. 2007). Por ejemplo, el bacteriófago MS2 contiene una proteína reguladora de represión traduccional (TR) que se une a un bucle troncal de RNA TR. Las proteínas de regulación TR se pueden diseñar químicamente para transportar fármacos pequeños. Moléculas terapéuticas como la cadena de la ricina 5-fluorouridina se han incorporado con éxito a las partículas de MS2 utilizando estos criterios de diseño. Los estudios de células *in vitro* que utilizan este enfoque han confirmado la entrega de carga y la destrucción exitosa de las células blanco (Adams et al. 2002; Stockley et al. 1995).

La biomineralización es la acumulación de minerales alrededor de las células y los tejidos de los organismos vivos, pero en el contexto de las VLPs se refiere a la capacidad de las proteínas de la cubierta del virus para ensamblarse alrededor de un núcleo mineral. Existen muchas aplicaciones de biomineralización de VLPs en el campo de la medicina, particularmente donde se utilizan cargas minerales como agentes de contraste. Mientras que algunos cargos pueden encapsularse fomentando

la formación de cápsides alrededor del cargo, otros pueden difundirse a través de la cápside hacia la cavidad interior, donde pueden permanecer en el interior por interacciones no covalentes con ácidos nucleicos o covalentemente mediante bioconjugación.

Uno de las técnicas más populares para la modificación de VLPs es la funcionalización química clásica por cadenas laterales de aminoácidos particulares, tales como los grupos carboxilo en residuos de ácido glutámico y aspártico, aminas reactivas en residuos de lisina, grupos sulfhidrilo en residuos de cisteína y grupos fenol en residuos de tirosina (Figura 4). Estos grupos pueden conjugarse directamente con moléculas particulares o modificarse para mostrar grupos funcionales necesarios para estrategias de conjugación más sofisticadas. Por ejemplo, los agentes de acoplamiento de carbodiimida pueden usarse para unir cualquier molécula que contenga una amina primaria a los grupos carboxilo de glutámico y ácido aspártico, la adición de Michael puede usarse para unir maleimidas a los grupos sulfhidrilo de residuos de cisteína, y pueden agregarse ésteres activados con N-hidroxisuccinimida (NHS) a las cadenas laterales de lisina para unir cualquier molécula compatible con la química del NHS (Steinmetz et al., 2010; Douglas et al., 2008). Existen muchos ejemplos de estas estrategias para funcionalizar las VLPs, sin embargo cabe mencionar que tomando en cuenta el enfoque terapéutico la molécula a funcionalizar es la que toma relevancia. En el cáncer se busca que los tratamientos vayan dirigidos hacia receptores específicos o sobre expresados en células cancerígenas. Por lo tanto, múltiples trabajos de investigación utilizan las estrategias anteriormente mencionadas para funcionalizar a las VLPs o nanopartículas con algún ligando especifico con reconozca a las células de interés. Un potencial candidato para reconocer a células cancerígenas podría ser la molécula de adhesión celular caderina-11 (CDH11).

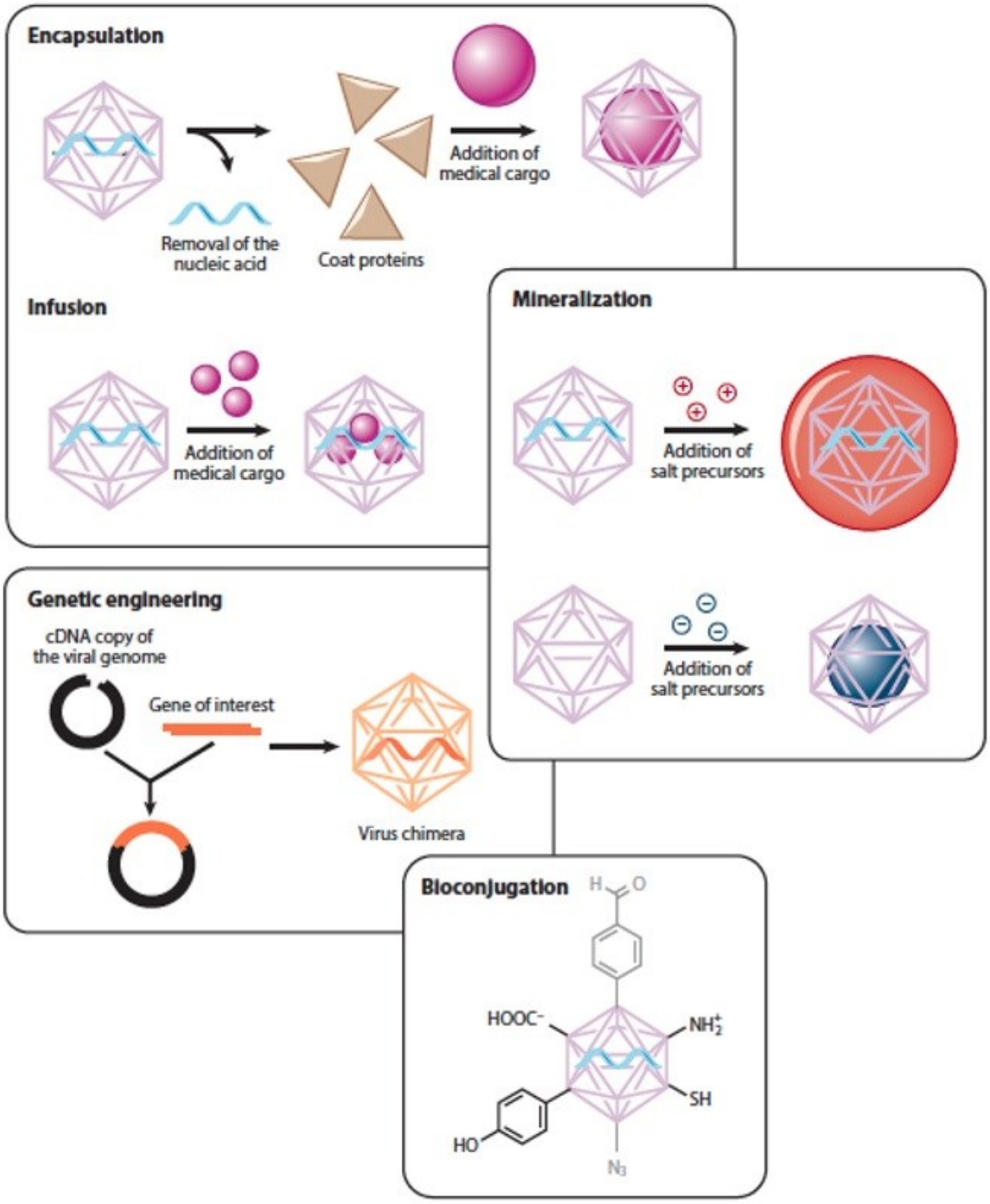


Figura 4. Ilustración de las principales estrategias para la funcionalización de nanopartículas. Las VLPs pueden funcionalizarse siguiendo las siguientes técnicas: ingeniería genética, encapsulación, biomineralización, mineralización, infusión y bioconjugación (Steinmetz et al., 2015).

1. 1. 8 Caderina-11 y su relación con cáncer.

Diferentes tipos de caderinas han mostrado capacidad de promover la migración celular (Becker et al., 2012). En particular, la caderina-11 (CDH11) promueve la migración celular en diferentes tipos celulares. En humanos, por ejemplo, la activación de la caderina-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 tumorogénesis, se ha demostrado que la CDH11 es sobre expresada 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 perdida de la E-caderina para convertirse en un carcinoma poco diferenciado, es decir, las células pasan por la transición epitelial a mesenquimal (EMT) (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. Estás células tumorales poco diferenciadas se asemejan a las células de tipo mesenquimal y logran expresar caderinas de este mismo tipo celular; como la N-caderina y, de igual manera, la CDH11. Por lo tanto, ambas caderinas están involucradas íntimamente en el proceso metastásico (Gravdal et al., 2007; Pishvaian et al., 1999). Otro caso común en donde existe una sobreexpresión de CDH11 es en los tejidos metastásicos de cáncer de mama. Por lo anteriormente descrito la caderina-11 podría ser un candidato idóneo para reconocer específicamente o preferencialmente a células cancerígenas y modular su proliferación y apoptosis.

1. 1. 9 Transición epitelial a mesenquimal (ETM).

La metástasis en cáncer es responsable de la mayoría de los casos de mortalidad. Durante este proceso las células adquieren propiedades migratorias e invasivas, las cuales se logran a través de la transición celular de epitelial a mesenquimal (EMT)(Nieto et al., 2009; Thiery et al., 2016). Durante esta transformación, las células epiteliales pierden su forma poligonal y su capacidad de crecer en colonias, pero adquieren una morfología en forma de fusiformes y exhiben un comportamiento más móvil e invasivo (Figura 5A). Estos cambios fenotípicos están asociados con modificaciones en proteínas y

genes de diferentes familias interconectadas, como factores de transcripción, caderinas, cateninas, metaloproteasas de matriz (MMP), o receptores de crecimiento (Figura 5B) (Christofori et al., 2004; Gumbiner et al., 2005).

Una de las características de EMT es la pérdida funcional de E-caderina (codificada por CDH1), la cual actúa como un supresor de tumores inhibiendo la invasión durante la progresión del carcinoma. En particular, la represión transcripcional se ha considerado recientemente como un mecanismo fundamental para el silenciamiento de CDH1 durante la progresión tumoral. Por lo que existen reportes donde varios factores de transcripción que reprimen eficientemente a CDH1, tales como miembros de Snail, ZEB y basic helix-loop-helix (bHLH), están involucrados en la progresión tumoral, , de tal manera que ha tenido un gran interés clínico (Peinado y Cano et al., 2006). La expresión de diversos marcadores moleculares como la Vimentina, fibronectina y la caderina-N se ha asociado al fenotipo mesenquimal (Figura 5B) (Weinberg et al., 2017; Derynck et al., 2014). La EMT está orquestado por factores de transcripción que actúan pleiotrópicamente y en varias combinaciones para inducir la expresión de genes que promueven el estado celular mesenquimal y reprime la expresión de genes que mantienen el estado epitelial (Nieto et al., 2009; Thiery et al., 2016; Weinberg et al., 2009). Se ha propuesto que, actuando recíprocamente las células de carcinoma que expresan marcadores asociados a EMT pueden modular las actividades de varios componentes celulares del estroma que juntos forman el microambiente tumoral (Terry et al 2017).

Estudios recientes han indicado que las células sometidas a EMT también pueden regular la inmunidad antitumoral. Específicamente, las células de carcinoma mesenquimal exhiben una mayor resistencia a la eliminación por parte de las células del sistema inmune adaptativo, muchas de las cuales están presentes en el estroma asociado al tumor (Figura 5C). (Terry et al 2017; Dongre et al. 2017). Al estar las células tumorales en estado mesenquimal, estas tiene implicaciones importantes para la oncología clínica, ya que confieren una resistencia elevada tanto a la quimioterapia como a la inmunoterapia.

Uno de estos componentes que podría participar en la regulación de la ETM en células de cáncer de mama es la caderina-11. Tomando en cuanta esto, las VLPs diseñadas para reconocer específicamente a la caderina-11 podrían modular la ETM e inhibir el proceso de metástasis celular o promover la transición de células mesenquimales a epiteliales (MET). Inclusive también al promover la MET se induciría un cambio en el microambiente tumoral y podría potenciar un efecto inmunológico citotóxico.

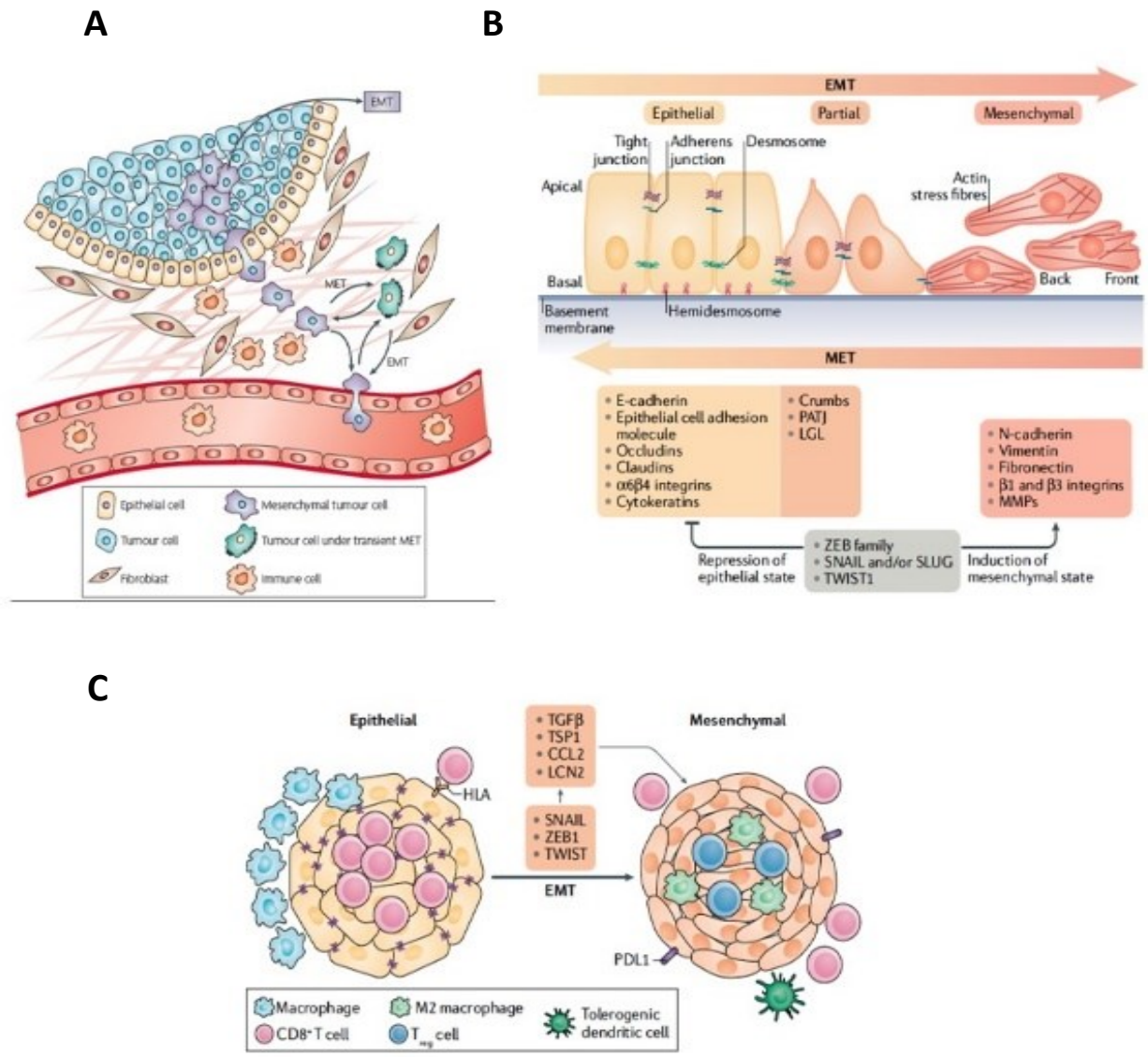


Figura 5. Participación de la EMT en cáncer. (A) Proceso de migración celular (Metástasis), y como participan la EMT. (B) Intermediarios (receptores, cinasas, factores de transcripción) que promueven la EMT o MET. (C) Modulación de las células del sistema inmune en células epiteliales y mesenquimales (Weinberg et al., 2010).

1. 1. 10 Inmunoterapia basada en virus.

El desarrollo de vacunas para prevenir enfermedades infecciosas es uno de los avances médicos más importantes en los últimos 300 años (Hill et al., 2011) Sin embargo, varias vacunas clave siguen desarrollándose, incluidas las del VIH, el virus de la hepatitis C, Ebola y los virus de la fiebre hemorrágica. Por lo que es necesario desarrollar una plataforma rápida y segura para generar vacunas. La vacunación y otras formas de inmunoterapia son muy prometedoras como intervenciones

profilácticas y terapéuticas para el tratamiento del cáncer y enfermedades crónicas (Peabody et al., 2006; Yusibov et al., 2012; Wall et al., 2008). Actualmente se utilizan para la inmunoterapia clínica varios anticuerpos monoclonales, proteínas de fusión basadas en anticuerpos y conjugados anticuerpo-fármaco, y muchos otros están en desarrollo clínico y preclínico (Mario et al., 2014; Shih et al., 2014; Buonaguro et al., 2014). Por otro lado, las terapias basadas en virus, los cuales están constituidos por una coraza simétrica de proteínas idénticas y, por lo tanto, pueden provocar respuestas inmunes que los hacen útiles para la generación y desarrollo de vacunas e inmunomoduladoras (Figura 6). Las vacunas a base de nanopartículas se dividen en varias clases, que incluyen (a) vacunas de virus químicamente inactivadas, (b) vacunas de virus atenuados con virulencia mínima, (c) VLPs libres de genoma (no infecciosas), y (d) vacunas quiméricas y de nanopartículas, en las cuales los epítopos derivados de patógenos se envían utilizando un portador no infeccioso, y que puede ser un virus de planta, un bacteriófago o una nanopartículas sintética (Gissmann et al., 2004; Anderson et al., 2006; Wagner et al., 2007). Las vacunas a base de VLPs y otro tipo de nanopartículas, ofrecen varias ventajas en comparación con las vacunas de ADN (Dodoo et al., 2004; Kelso et al., 2012) y las de subunidades virales (Mutwiri et al., 2013; Rodriguez et al., 2007). Los nanovehículos basados en virus pueden ofrecer estabilidad a los antígenos, y la posibilidad de presentar múltiples de estos a la vez. La terapia a base de este tipo de nanovehículos promueve la absorción pasiva o activa por células presentadoras del antígeno (Roy et al., 2013; De Smedt et al., 2011), seguida de la activación y respuesta de las células T y B (Bakke et al., 2011; Ploegh et al., 2008) (Figura 6). Basándonos en estas estrategias, la utilización de virus que infectan plantas podría resultar en una plataforma idónea para el desarrollo de vacunas contra el cáncer.

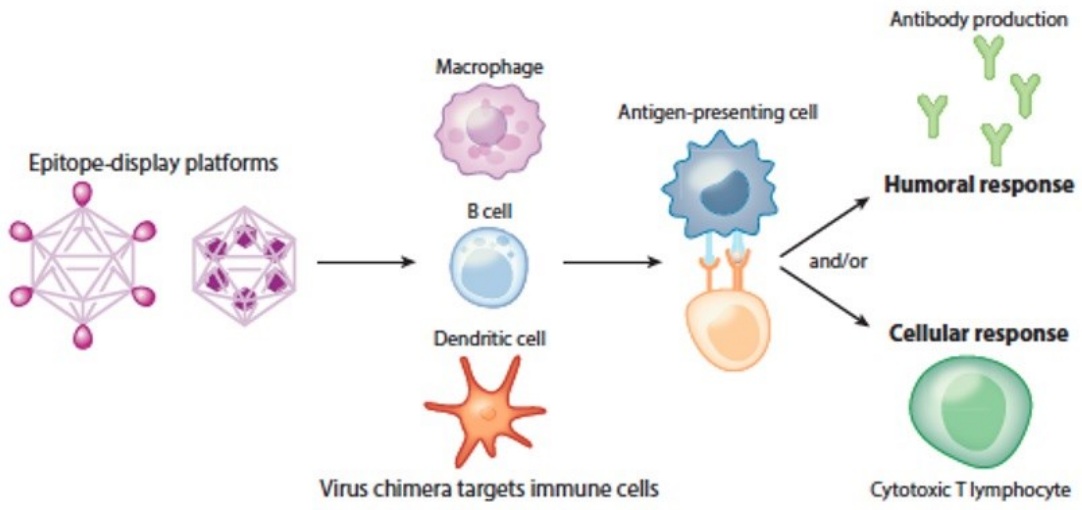


Figura 6. Activación de la respuesta inmune por nanopartículas basadas en virus. Las VLPs son capaces de presentar los antígenos, en su superficie o interior, y presentárselos a las células de sistema inmune para activar una respuesta adaptativa o innata (Steinmetz et al., 2015).

1. 1. 11 Vacunas contra el cáncer.

Las vacunas contra el cáncer se basan en nuestro creciente conocimiento de los antígenos asociados a tumores (Eaton et al., 2013; Finn et al., 2010; Rosenberg et al., 2000), combinado con la capacidad de provocar respuestas inmunes eficientes contra estos autoantígenos a pesar de la inmunosupresión activa por el tumor. La vacunación antitumoral tiene varias ventajas sobre la quimioterapia, incluido un procedimiento ambulatorio, menos efectos secundarios, evita la resistencia a los medicamentos, activación del sistema inmune para eliminar las células residuales resistentes a los medicamentos, y la inducción de memoria inmunológica a largo plazo para proteger contra metástasis.

Debido a que los antígenos tumorales se derivan del huésped, es necesario romper la tolerancia inmunológica para inducir una respuestas inmune contra objetivos no inmunogénicos o débilmente inmunogénicos. Se han evaluado a nivel laboratorio algunas vacunas contra el cáncer basadas en VLPs que implican la presentación modulada de antígenos o péptidos asociados a tumores. Por ejemplo, el virus del mosaico del caupí (CPMV), por medio de conjugación químicamente se le ha unido al exterior de la cápside el antígeno Tn, el cual es una glucoproteína que se sobre expresa en numerosas células cancerosas, incluidas las células de cáncer de mama, colon y próstata. El CPMV conjugado

químicamente con Tn resultó en una alta producción de anticuerpos específicos contra Tn, en ratones (Wall et al., 2008).

De manera similar, otros grupos de investigación han demostrado que el virus del mosaico del tabaco (TMV) conjugado con el antígeno Tn puede provocar respuestas de antígeno especificas contra IgG e IgM (Bruckman et al., 2012). La presentación de epítopos de cáncer conjugados en la superficie de la cápside de los virus permite la presentación de estas moléculas en un entorno molecular no nativo, siendo esta una estrategia prometedora para superar la auto-tolerancia, como se muestra para el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmal humano (HER2) en pacientes con cáncer de mama (Steinmetz et al., 2014).

1.2 Justificación

El diseño de partículas tipo virus (VLPs), derivadas de virus de plantas, con RNAi que bloquee específicamente la expresión de la vía de señalización PI3K/AKT, nos permitirá regular de forma negativamente el proceso de proliferación celular. Esta estrategia abriría una ventana de opciones terapéuticas, que nos permitiría diseñar VLPs que reconozcan y combatan preferencialmente a células tumorales, esto al inhibir específicamente a AKT, uno de los principales blancos moleculares del cáncer.

1.3 Hipótesis

En células de cáncer de mama la principal vía de señalización involucrada en proliferación es la de PI3K/AKT y uno de los receptores que la regulan esta vía es la caderina 11. En estas líneas celulares las partículas tipo virus derivadas del CCMV y BMV que contienen como cargo RNAi-AKT1 será capaz de introducirse en las células e inhibir la vía de señalización de PI3K/AKT, lo que nos conlleva a la inactivación de diferentes proto-oncogenes involucrados en proliferación celular. Antecedentes recientes han reportado la sobre expresión de la caderina 11 en células tumorales, participan directamente en la modulación positivamente del proceso de proliferación celular, por lo que el inhibir la expresión de caderina 11 mediante el diseño de VLPs anti-CDH11 nos permitirá regular transcripcionalmente el proceso de muerte celular programada.

1.4. Objetivo general

Demostrar el uso potencial de los virus CCMV y BMV para desarrollar terapias de los virus contra el cáncer. Específicamente diseñando VLPs-RNAi y VLPs anti-CDH11 para regular negativamente el proceso de proliferación celular.

1.4.1. Objetivos específicos

1. Diseñar y sintetizar VLPs derivadas del CCMV y BMV que contengan como cargo siRNAs anti-GFP y contra AKT1.

2. Demostrar que las VLPs del CCMV y BMV son capaces de internalizarse eficientemente en células tumorales, y a su vez evaluar si existe una diferencia en la capacidad de internalización entre el estos virus.

3. Evaluar en cultivos celulares si las VLPS-siRNA son capaces de liberar su cargo una vez dentro de la célula y modular la expresión de su gen blanco.

4. Analizar si el CCMV o BMV generan un efecto citotóxico en células de cáncer MDA-MB-231.

5. Valorar in-vitro la respuesta inmunológica de las cápsides del CCMV y BMV

6. Diseñar y sintetizar VLPs-antiCDH11, mediante la funcionalización química del exterior de las cápsides con un ligando anti cadherina-11.

7. Evaluar la actividad de las VLPs anti-CDH11 en células tumorales MDA-231. Específicamente en los procesos de migración, proliferación y citotoxicidad celular.

8. Evaluar in-vivo la capacidad de VLPs-siRNA(anti-AKT1).

Capítulo 2. Metodología

2.1 Producción y purificación del virus.

Los virus CCMV y BMV se produjeron en plantas de caupí y cebada, respectivamente. A continuación, se describe brevemente el proceso de producción y purificación de CCMV y BMV. La siembra se llevó a cabo en invernadero, utilizando tierra enriquecida con fertilizante, se colocaron 4 semillas por maceta para el caso del caupí y 10 semillas en el caso de la cebada. Después de la germinación (aproximadamente una semana), la parte superior de las hojas de la planta se dañaron ligeramente en su superficie mediante abrasión mecánica para realizar la infección con el virus , usando el buffer de inoculación (fosfato de sodio 0.01 M, pH 6 y 0.01 M cloruro de magnesio) conteniendo 0.1 µg/µL de suspensión de virus nativo. Después de que las plantas mostraron síntomas de infección (clorosis), las hojas se colectaron, y se molieron en una licuadora en buffer de extracción de virus (acetato de sodio 0.5 M y acetato de magnesio 0.08 M, pH 4.5). La mezcla se filtró a través de una gasa y luego se añadió 1 volumen de cloroformo y se mantuvo en agitación a 4°C durante 4 horas. Para recuperar la fase acuosa, la mezcla se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa se mantuvo bajo agitación durante 2 horas y se colocó en un colchón de sacarosa al 10%, para separar la fracción de proteína. El colchón se ultracentrifugó a 30,000 rpm durante 120 min. utilizando un rotor Beckman SW 32 Ti en una ultracentrífuga Optima XPN-100. El sedimento formado se resuspendió en buffer de suspensión de virus y el virus se ultrapurificó usando un gradiente de 5-40% de sacarosa, y se ultracentrifugó a 30,000 rpm a 4°C durante 120 min.

La concentración del virus se calculó midiendo la absorbancia UV usando un espectrofotómetro Nanodrop 2000c (ThermoFisher Scientific). Finalmente, los virus purificados se almacenaron a -80°C en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL.

Para obtener la concentración de los virus en mg/mL, se utilizó la siguiente expresión: $C = A_{260} / 5.8$. La pureza del virus CCMV, está relacionada con la proporción de ácidos nucleicos y de proteína en la muestra, la razón A_{260}/A_{280} debe estar en un rango de 1.5 a 1.7, para ser considerada como pura y apta para realizar experimentos.

2.2 Caracterización de las cápsides virales.

La morfología de las cápsides se evaluó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se utilizaron rejillas de cobre (Formvar/Carbon de malla 400, Ted Pella), en las que se colocaron 6 µL de muestra a una concentración de 0.1 µg/µL y después de dos minutos se eliminó el exceso de líquido utilizando papel de filtro Whatman No. 2. El contraste negativo se obtuvo mediante la adición de 6 µL de acetato de uranilo al 1% durante 1 minuto. Las muestras fueron almacenadas en un desecador y posteriormente analizadas en el microscopio electrónico de transmisión marca Jeol, modelo JEM-2010, usando un voltaje de 200 kV y equipado con una cámara digital Gatan, las imágenes fueron tomadas y grabadas usando el software DigitalMicrography. Finalmente, las imágenes fueron analizadas usando el software ImageJ del NIH.

El tamaño y el potencial zeta de las nanopartículas virales y las VLP se determinaron mediante dispersión de luz dinámica (DLS) utilizando un Malvern NanoSizer.

2.3 Cultivos celulares.

Las líneas celulares de cáncer de mama 4T1, MDA-MB-231 y MCF7 se obtuvieron del ATCC. La línea celular MDA-MB-231/GFP que expresa constitutivamente la proteína verde fluorescente (GFP) se obtuvo de Cell Biolabs. RAW-Blue (InvivoGen) son derivadas de la línea celular de macrófagos de ratón RAW 264.7, a las cuales se les agrego la secuencia de la fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) bajo el control de un promotor inducible por NF-κB / AP-1. Las células RAW-Blue se pueden usar como células informadoras del receptor de reconocimiento de patrones para evaluar la activación de macrófagos. Las células RAW-Blue, MDA-MB-231 y MCF7 se cultivaron con medios DMEM con alto contenido de glucosa (Biowest). La línea celular de cáncer de mama 4T1 se cultivaron en medio RPMI (Corning). Los medios basales DMEM y RPMI se complementaron con suero fetal bovino al 10% (FBS, Biowest) y antibiótico / antimicótico (ThermoFisher Scientific). El medio para las células MCF7 también se complementó con insulina humana recombinante (0.01 mg / mL; Sigma-Aldrich) y el medio de las células RAW-Blue con 100 µg/mL de Normocina y 200 µg/mL de antibióticos Zeocin (InvivoGen). Las células se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO_2.

2.4 Ensayos de herida en placa y proliferación celular.

Se realizaron ensayos de cicatrización (migración) celular para evaluar la actividad de las capsides BMV-sd-133 y BMV-PEG-sd-133 en la línea celular MDA-MB-231. Las células se cultivaron bajo las condiciones anteriormente mencionadas, en placas de 12 pozos hasta alcanzar el 100% de confluencia. Las células se sincronizaron en la fase del ciclo celular G0/G1 lavando las células en dos ocasiones con 1 mL de PBS para posteriormente agregar medio libre de suero, e incubándolas durante 12 horas. Posteriormente se realizó una herida transversal apoyándote de una pinta e micropipeta de 100 μL, una vez realizada la herida de manera homogénea en todos los pozos se cambió el medio a suplementado. Se inocularon los pozos con los tratamientos (BMV-sd-133 y BMV-PEG-sd-133) a concentraciones de 10 μM. Las placas fueron monitoreadas de 0-20 horas. Cuantificando la amplitud de la herida en todos los tiempos con el apoyo de software ImageJ.

En los ensayos de proliferación las células se cultivaron hasta alcanzar una confluencia del 70% en placas de 12 pozos, administrando los tratamientos BMV-sd-133 y BMV-PEG-sd-133 a las concentraciones previamente utilizadas (10 μM). Se utilizó el microscopio etaluma LS720 para monitorear a las células *in vivo,* sin la necesidad de fijarlas, durante un periodo de 24 horas. Las imágenes se analizaron y procesaron utilizando el software Lumaquant_v8.5, evaluando el porcentaje en área que las células no fueron capaces de poblar.

2.5 Marcado fluorescente de los virus.

Para visualizar la internalización celular, la cápside de los virus se cargaron con tamoxifeno o NanoOrange, que son moléculas hidrofóbicas que se unen a los dominios hidrofóbicos de las cápsides de CCMV y BMV. Se incubaron tamoxifeno (1 µg, Sigma-Aldrich) o NanoOrange (kit de cuantificación de proteínas NanoOrange ™; ThermoFisher Scientific) con 1 µg de cápsides BMV o CCMV durante 20 minutos. Las cápsides del virus también se volvieron fluorescentes mediante la conjugación covalente de los grupos amino libres de proteínas con fluoresceína-5-isotiocianato (FITC). La conjugación de FITC se realizó de acuerdo con el procedimiento reportado por Douglas et al., (2008) de la siguiente manera: se marcaron 400 µg de cápside viral en una solución de FITC (10 µg/mL) en PBS, bajo agitación

constante, durante 2 horas, a temperatura ambiente. El exceso de fluoróforo se eliminó mediante ultrafiltración con filtros Amicon ultra-0.5 de 100 kDa (Millipore).

2.6 Internalización de virus.

Se sembró una suspensión de 10^5 células MDA-MB-231 o MCF7 en placas de cultivo con fondo de vidrio de 35 mm (MatTek Co.) o en placas de 12 pozos. Después de 12 h, el medio se eliminó por completo y las células se incubaron durante otras 12 horas en medio basal. Las cápsides virales de BMV o CCMV marcadas con Tamoxifeno, NanoOrange o FITC se agregaron al cultivo (1.3 x 10^6 virus fluorescentes por célula) y se incubaron durante 4 horas. La internalización del virus se analizó en células vivas o en células fijadas con *p*-formaldehído al 4%, , tiñendo la membrana con FM4-64 (Thermo Fisher Scientific) y el núcleo con DAPI (Sigma), usando un microscopio confocal FV1000 FluoView (Olympus). Además, las células se tripsinizaron, se centrifugaron (800 g, 5 min) y se resuspendieron en PBS. Posteriormente, se analizó la internalización del virus usando el citómetría de flujo, por medio de un clitómetro Attune (Thermo Fisher Scientific). Los dobletes se excluyeron al graficar la altura versus el área para el forward scatter y para el side scatter. Luego se excluyeron los lisados celulares al graficar el área del forward scatter versus el área del side scatter Para cada muestra, se colectaron al menos 7.500 eventos correspondientes a células individuales y se utilizó el software de Attune Cytometric (v2.1) para analizar los resultados.

2.7 Ensayo de viabilidad celular.

Las células MDA-MB-231 se cultivaron en placas de 12 pozos, como se describió anteriormente. Cuando las células alcanzaron aproximadamente el 70% de confluencia, el medio se eliminó por completo y las células se sincronizaron en medios basales durante 12 horas. Las células se incubaron en presencia de BMV o CCMV (20 µg / ml, 2.62 x 10^7 virus por célula) o DMSO (20% v / v) como control de la muerte celular en medio completo (suplementado con suero fetal bovino al 10%), durante 24 horas. El kit de ensayo de viabilidad/citotoxicidad (Biotum) se utilizó para evaluar la cantidad de células vivas y muertas. Brevemente, las células se tripsinizaron y se marcaron con calceína y el homodímero

de etidio III (EthD-III) para identificar células vivas y muertas, respectivamente. Las células se analizaron por citometría de flujo. Para cada muestra, se recolectaron al menos 7,500 eventos correspondientes a células individuales como se describió anteriormente, y se utilizó el software de Attune Cytometric (v2.1) para analizar los resultados.

2.8 Funcionalización de superficie de BMV y CCMV con PEG.

La superficie externa de la cápside fue pegilada utilizando polietilenglicol funcionalizado con N-hidroxilsuccinimida (NHS) (NHS-PEG, Sigma Aldrich). El uso de NHS-PEG permitió la conjugación selectiva de nanopartículas con PEG a través del enlace amida. Para realizar la pegilación de la cápside se mezcló una solución de NHS-PEG (9.12 nmol) con la suspensión de cápsides (1 mg/mL) en PBS y se agitó suavemente durante 2 hrs a temperatura ambiente. El exceso de PEG se eliminó por ultrafiltración usando filtros Amicon (Millipore) de 100 kDa de corte.

2.9 Inmunogenicidad *in vitro* de los virus CCMV y BMV.

La línea celular de macrófagos RAW-Blue se usó para evaluar la inmunogenicidad *in vitro*. Los experimentos se realizaron de acuerdo con lo especificado por la compañía. Las células al 80% de confluencia se lavaron dos veces con PBS estéril, se separaron manualmente por raspado y se resuspendieron en medio fresco. Se sembraron células vivas en placas de 96 pozos (10^5 células por pozo) y se incubaron durante la noche en presencia o ausencia de CCMV o BMV (20 a 100 µg/mL, 2.62 x 10^7 a 1.31 x 10^8 virus por célula), además se ensayaron virus pegilados y lipopolisacáridos, como control positivo (2.5 o 75 ng/mL). Luego, se transfirieron 50 µL de sobrenadante a una nueva placa de 96 pocillos y se agregaron 150 µL de reactivo Count-blue (InvivoGen) y se incubaron a 37°C durante 1 hora. La absorbancia a 655 nm se midió utilizando un lector de placas Multiskan GO (ThermoFisher Scientific).

2.10 Síntesis de VLPs-siRNA e inhibición de la expresión génica.

siRNA contra GFP y Akt1 de ratón se sintetizaron en Dharmacon. Las secuencias del siRNA contra GFP (siGFP) fue 5'-GGCAAGCUGACCCUGAAGUUCAUU-3' y contra Akt1 (siAkt1) fue 5'-GACAAGGACGGGCACAUUAUU-3'. La proteína de la cápside fue purificada a partir del desensamble de los virus (CCMV y BMV), a una concentración elevada de sales y un pH mayor a 7. El buffer de desensamble (0.5 M $CaCl_2$, 0.05 M Tris–HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1mM DTT, 0.5mM PMSF) permite el desensamble del virus. Al contener iones de calcio el buffer, permite que el RNA se una al Ca^{2+}, permitiendo su precipitación, y facilitando su remoción mediante ultracentrifugación. La solución de virus purificado se colocó en una membrana de diálisis de celulosa previamente esterilizada, con un tamaño de poro de 8,000 a 12,000 Da, en buffer de desensamble en un lapso de 24 h a 4°C, con agitación lenta. Una vez transcurrido este tiempo se retiró la solución de la membrana de diálisis y se colocó dentro de un tubo ultra claro de ultracentrífuga. El volumen final de la solución en el tubo fue de 1.2 mL. Se centrifugó a 29,0420 x *g* por un periodo de 126 min a 4°C en un rotor 90 Ti en la ultracentrífuga Beckman XPN100. Inmediatamente finalizada la ultracentrifugación se extrajo la solución en fracciones de 300 µL, de arriba hacia abajo, cuidando de no perturbar la solución, y se mantuvo a 4°C. Después se midió la pureza y la concentración de cada fracción en un espectrofotómetro UV-Vis (modelo Nanodrop marca Thermo Scientific), manteniéndolo a 4°C, y desechando aquellas fracciones que no tenían la pureza mínima de 99.5%, es decir, la relación obtenida de las absorbancias en los puntos característicos de la proteína y los ácidos nucleicos (A_{280}/A_{260}) debe ser igual o mayor a 1.5. Las fracciones con una pureza igual o mayor a 1.5 y con A_{280} mayor a 0.08 se mezclaron para posteriormente dializarse 12 h en buffer de proteína (1 M NaCl, 0.02M Tris–HCl pH 7.2, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF). Finalmente se midió la concentración y pureza de la proteína, y se almacenó a 4°C. La concentración de las proteínas de la cápside del CCMV y BMV en mg/mL se obtuvo por medio de la relación: (1197.7 A_{280} - 24.032)/1000).

Las VLPs del BMV y CCMV se sintetizaron utilizando una relación de masa de 1:6 (siARN:CP). La proteína de la cápside desensambladas y el siARN se mezclaron y se dializaron durante la noche en un buffer de ensamble (NaCl 50 mM, KCl 10 mM, MgCl2 5 mM, DTT 1 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,2), seguido de diálisis en el buffer de acidificación (50 mM acetato de sodio, 8 mM acetato de magnesio, pH 4,5) durante 8 h y finalmente la muestra se dializó en buffer de ensamble. Todas las diálisis se realizaron a una temperatura de 4°C, utilizando una membrana de diálisis con un poro máximo de 14 kDa

(Spectrumlabs). Las VLPs con siRNA fueron analizadas por medio de microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Las células MDA-MB-231 / GFP se sembraron en una placa de 12 pozos cuando las células alcanzaron el 70% de confluencia; fueron sincronizados en medios basales durante 12 horas. Las células se cultivaron luego en medio suplementado que contenía 40 µL de BMV VLPs-siGFP que corresponden a 50 nM de siGFP durante 6 horas. La cantidad de GFP se evaluó cualitativamente usando un microscopio de fluorescencia LS720 (Etaluma).

Tabla 1. Oligos sintetizados para los siRNA

Descripción del oligonucleótido	Secuencia
siAKT1	5'-GACAAGGACGGGCACAUUAUU-3'
siGFP	5'-GGCAAGCUGACCCUGAAGUUCAUU-3'

2.11 Modelo de tumor de glándula mamaria en ratones.

Todos los experimentos con animales se realizaron de conformidad con el Comité de Etica del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE). Se obtuvieron ratones hembra BALB/cAnNHsd de Envigo. Los ratones se mantuvieron en un sistema de jaula Optimice (Animal Care System), en una habitación de ambiente controlado (temperatura 24°C y ciclo de luz / oscuridad de 12 h) donde recibieron agua y alimentos (Teklad Global 18% proteína de roedor, Envigo). Los ratones se aclimataron durante al menos una semana antes de comenzar los experimentos.

Para el desarrollo de tumores, se preparó una suspensión de células de cáncer de mama de ratón 4T1 a una concentración de 2 x 10^6 células/mL en PBS. Las células 4T1 se inocularon en la mama superior izquierda (o segunda) (10^5 células en 50 µL) de ratones hembra Balb/C de 8 semanas de edad. Una semana después de la inoculación, se detectaron tumores palpables en todos los ratones que se dividieron en 4 grupos (n = 4) para inocular *in situ* los virus CCMV, BMV o VLPS-BMV cargadas con siAkt1 (100 µg de proteína de recubrimiento) por ratón, o 1 nmol de siAkt1 libre (12.97 µg por ratón), o PBS como vehículo. Se inocularon intratumoralmente 3 veces por semana. Los tumores se midieron con un vernier por triplicado y su tamaño se calculó utilizando la fórmula (L • w2) / 2 donde L y w representan la longitud y el ancho del tumor, respectivamente. Los ratones fueron sacrificados usando

inhalación de CO_2 seguido de dislocación cervical; los tumores se extirparon y su tamaño y peso se midieron *ex-vivo.*

2.12 Síntesis de sd-133-NH_2.

Para generar análogos de Sd-133, primero se sintetizó una estructura intermedia como base para todos los demás activos farmacóforos y más tarde diferentes grupos químicos son adicionados. La regioquímica del compuesto intermedio fue determinado por lo descrito por et al Karig 2001. SD-133 se sintetizará en dos pasos usando el acoplamiento de Suzuki del aryl halide y los derivados de ácido borónico correspondientes. La funcionalidad de la amina se introdujo en SD-133 mediante la reacción nucleofílica con bromoetilamina. El conjugado de amina sintetizado se funcionalizó en la superficie de VLP mediante acoplamiento directo de amida y usando PEG como conector.

Capítulo 3. Resultados y discusión

3.1 Internalización de los virus CCMV y BMV.

Para analizar la internalización celular, las cápsides de los virus CCMV y BMV se cargaron con tamoxifeno, el fármaco más utilizado en quimioterapia. Los virus CCMV y BMV tienen grupos hidrofóbicos, que nos permiten unir eficazmente fármacos hidrofóbicos, como el tamoxifeno, o un fluoróforo hidrófobico como el NanoOrange, dentro de la cápside. Los virus CCMV y BMV cargados con tamoxifeno y/o NanoOrange y se incubaron en una monocapa de cultivo celular MDA-MB-231 para evaluar su capacidad de internalización en las células de cáncer de mama (Figura 7A y 7B). Las imágenes de la microscopía confocal mostraron la internalización celular efectiva de las cápsides de CCMV y BMV cargadas con tamoxifeno y NanoOrange. Es importante señalar que las cápsidas pueden internalizarse en las células tumorales sin ninguna funcionalización. La internalización celular se evaluó cuantitativamente mediante citometría de flujo utilizando cápsides marcadas con NanoOrange (Figura 7B). Se podrían esperar diferencias debido a que el CCMV y BMV tienen diferentes cargas superficiales como lo revelan las mediciones de potencial zeta, -9.27 ±0.47 mV y -5.16 ±0.40 mV respectivamente. El análisis de citometría de flujo, se realizó después del tratamiento con tripsina que promueve el desprendimiento de las cápsides de la superficie celular (Figura 7C) (Devi et al., 2006). Lo cual posteriormente a la centrifugación de la muestra nos permitió analizar solo las cápsides que se encontraban dentro de las células. Los resultados mostraron una eficiencia ligeramente mayor de internalización pero significativa para BMV en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 (Figura 7D). Además, para evitar resultados erróneos debido a la posible separación de tamoxifeno o NanoOragen de las cápsides, el fluoróforo FITC se conjugó covalentemente a la superficie de la cápside y se analizó mediante microscopia confocal. Las imágenes de microscopía confocal mostraron la fluorescencia del fluoróforo FITC localizado dentro de las células sin colocalización con la membrana plasmática teñida con FM4-64, evidenciando una internalización celular efectiva de las cápsides del BMV y CCMV (Figura 8 y 17). Este resultado concuerda con los obtenidos con los virus cargados con NanoOrange.

El análisis de citometria de flujo muestra que las cápsides del CCMV y BMV cargadas con NanoOrange fueron internalizadas por el 70% de las células. Sin embargo, las imágenes de microscopía confocal mostraron que casi el 100% de las células contenían cápsides de CCMV y BMV. Por lo tanto, parece que

todas las células pueden internalizar las cápsides, pero algunas de ellas contienen una baja cantidad de cápsides por lo cual la señal fluorescente no es suficiente para su detección por citometría de flujo.

Estos resultados demuestran claramente que las cápsides de CCMV y BMV pueden ser internalizadas eficientemente por las células de tumorales de mama, sin la necesidad de acoplar un ligando celular específico. Estos resultados difieren de los reportados para el virus de la planta CPMV (cowpea mosaic virus) en estas mismas líneas celulares, las cuales no muestran altos niveles de vimentina en la superficie celular (Lyer et al., 2017). La vimentina es un receptor utilizado en la endocitosis caveolar (Steinmetz et al., 2016; Merigan et al., 1973) y se ha reportado que promueve la internalización celular del CPMV (Devi et al., 2006; Lyer et al., 2017; Steinmetz, et al., 2019; Ru et al., 2019). Por lo tanto, la internalización celular del virus CPMV ocurre a través de la endocitosis, que incluye múltiples rutas: dependiente de clatrina, caveolar y macropinocitosis (Steinmetz et al., 2016; Ru et al., 2019). Nuestros resultados mostraron que la presencia de bajos niveles de vimentina en la célula la superficie no es un factor limitante para la internalización celular de CCMV y BMV. Por lo tanto, parece posible que la internalización de la cápside se pueda llevar a cabo mediante macropinocitosis, un proceso independiente de la vimentina (Steinmetz et al., 2016; Li et al., 2011).

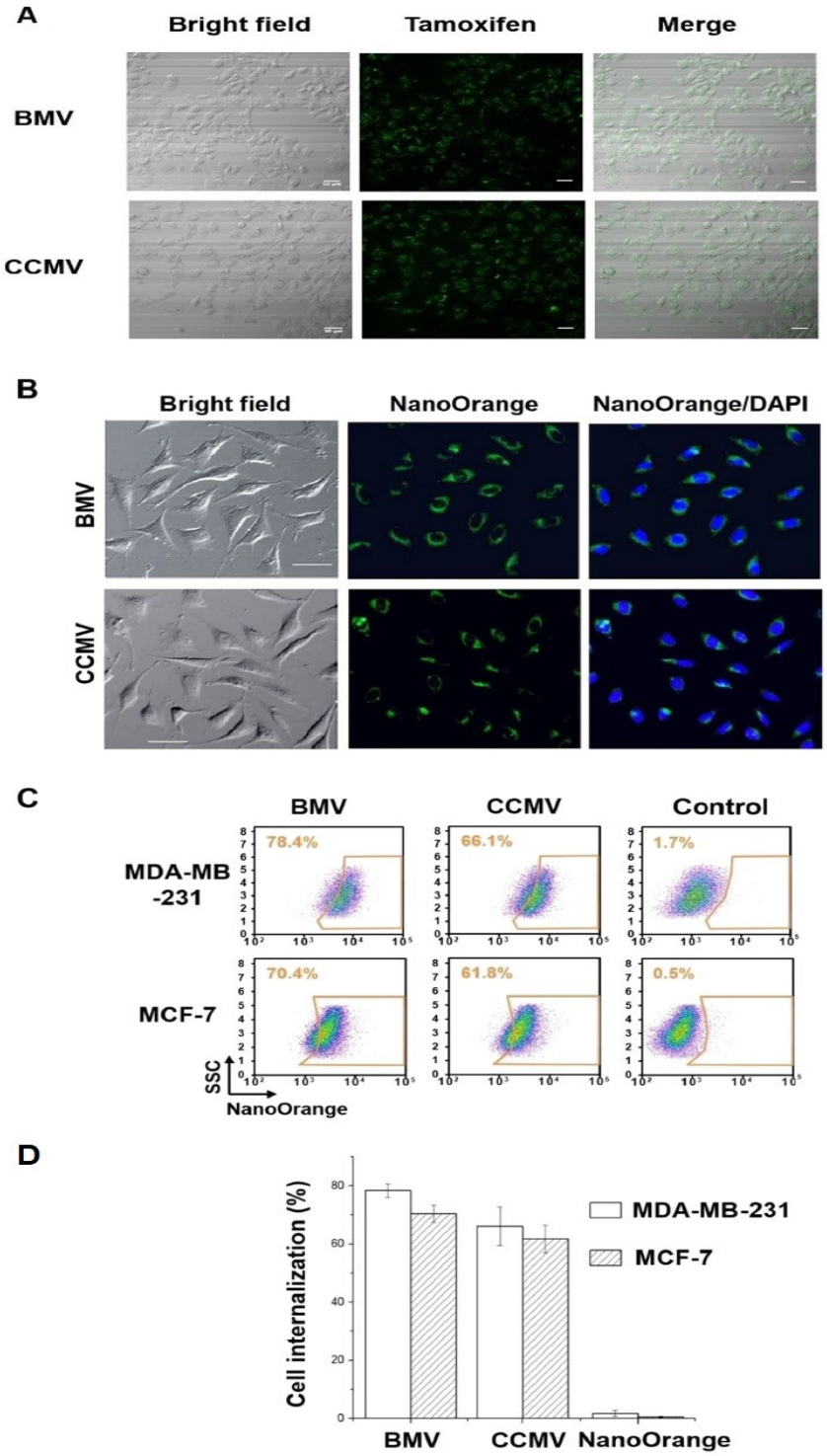


Figura 7. Captación celular de virus CCMV y BMV. (a) Imágenes de microscopía de escaneo láser confocal (CLSM) de células tratadas con Virus-Tamoxifeno (canal verde) y (b) para NnaoOrange. (c) Datos representativos de citometría de flujo (d) y los datos estadísticos de la internalización del virus en células cancerosas MDA-MB-231 y MCF7. La cápside se conjugó con el fluoróforo NanoOrange para no modificar la superficie. Barra de escala = 50 µm. Las barras de error representan medias ± SD (n = 3). Los valores de P se calcularon mediante la prueba t de Student (P <0.01).

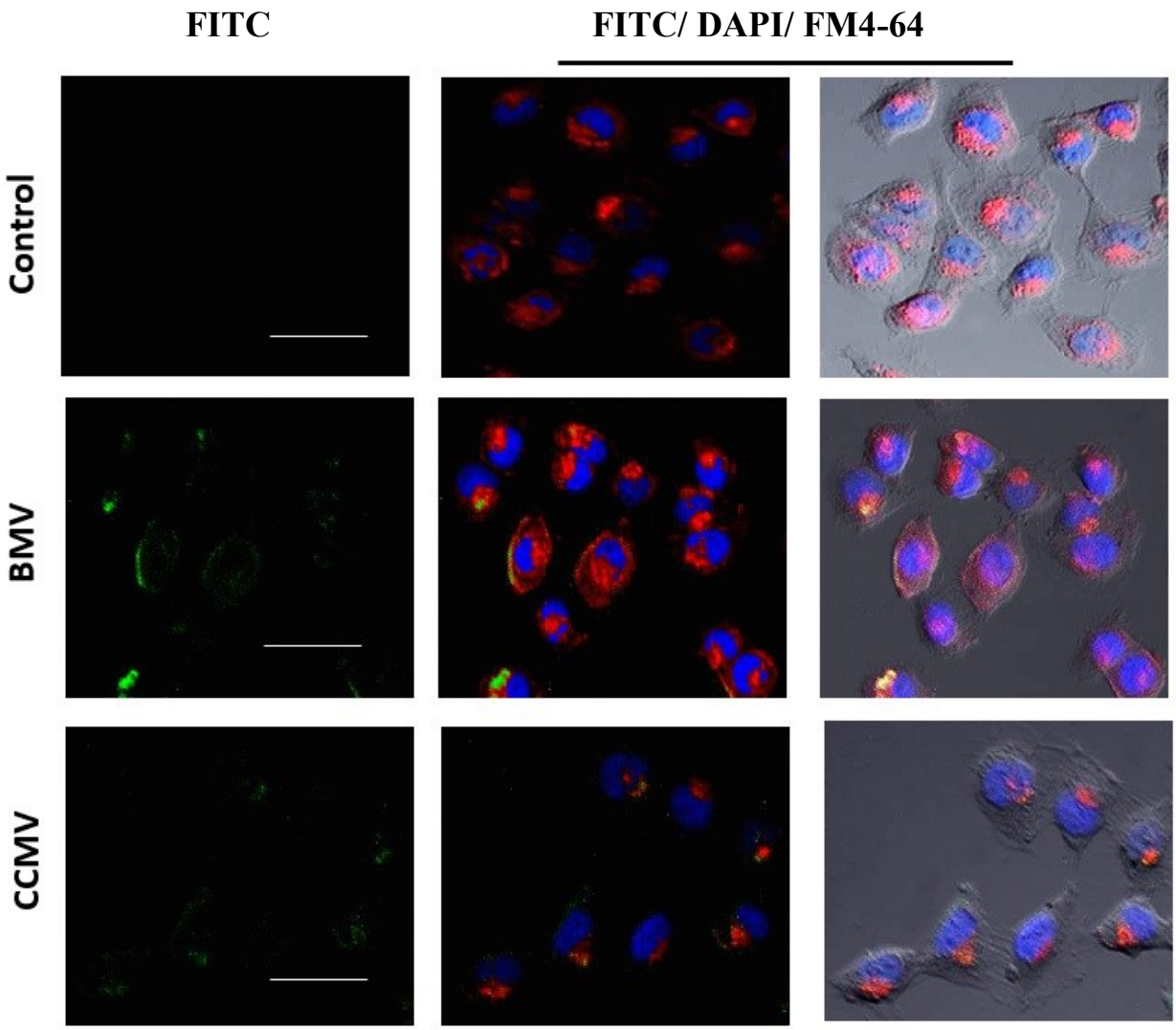


Figura 8. Internalización de CCMV y BMV conjugado con FITC. Las células MDA-MB-231 se incubaron con BMV-FITC (canal verde) y CCMV-FITC (canal verde). El núcleo celular se tiñó con DAPI (canal azul) y FM4-64 para la membrana (canal rojo). El FITC libre no mostró internalización. Se usó una concentración de 1.3 x 10^6 virus / célula. Barra de escala = 50 µm.

3.2 Biocompatibilidad de CCMV y BMV.

Para evaluar una posible citotoxicidad, los virus CCMV y BMV se incubaron durante 24 horas en la línea celular MDA-MB-231, utilizando 2.62 x 10^7 virus por célula, una concentración similar fue utilizada en las pruebas de viabilidad celular con CCMV (Yadav et al., 2016; Manchester et al., 2007) y nanopartículas de glicol quitosano (Her et al., 2009). Los resultados muestran que ambos virus no tienen efecto citotóxico (Figura 9A). El análisis de la citometría de flujo mostró que las células tienen una supervivencia celular de

alrededor del 90%, mientras que prácticamente las células mueren cuando se tratan con DMSO (control de muerte) (Figura 9B). Estos resultados concuerdan con estudios previos con VLPs derivadas del BMV en células HBE (Anvari et al., 2011) y también con otros virus de planta, en los que incluso a altas concentraciones de virus, no se encontró ningún efecto citotóxico en las células (Manchester et al., 2007; Singh et al., 2007; Finn et al., 2005). La baja ó nula toxicidad convierte a las cápsides de estos virus en candidatos idóneos para el desarrollo de nanovehículo para administrar fármacos terapéuticos o moléculas de siRNA. Sin embargo, aun cuando estos no presenten toxicidad es necesario tomar en cuenta su respuesta inmunológica.

3.3 Inmunogenicidad de CCMV y BMV.

La línea celular de macrófagos RAW 264.7-blue se usó para determinar *in-vitro* la respuesta inmune potencial del CCMV y BMV. Las células RAW-Blue son derivadas de macrófagos RAW 264.7 murinos con integración cromosómica de una construcción que contempla la fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) inducible por NF-κB y AP-1. Estas células expresan muchos receptores de reconocimiento de patrones (PRR), incluidos los receptores tipo Toll (TLR), los receptores tipo NOD (NLR), los receptores tipo RIG-I (RLR) y los receptores de lectina de tipo C (CLR) , todos estos asociados a la activación de células del sistema inmune y una respuesta exacerbada.

Los virus CCMV y BMV presentan una alta homología bioquímica, el tamaño del genoma y su cápside son idéntico, las proteínas de la cápside de estos virus tienen una homología del 80% en su secuencia de aminoácidos (Johnson et al., 1995), y como se mencionó no presentan citotoxicidad. Sin embargo, sorprendentemente, se encontró una diferencia notable, el CCMV mostró una alta activación de los macrófagos, mientras que el BMV mostró una respuesta inmunogénica casi nula (Figura 9 C,D). Así también, el CCMV y el BMV difieren en su carga superficial, de acuerdo a nuestras mediciones del potencial zeta, en un entorno de pH 7, en el que los macrófagos fueron desafiados. En estas condiciones, el potencial zeta del CCMV es -9.27 ±0.47 mV aproximadamente dos veces más negativo que el del BMV (-5.16 ±0.40 mV)(Figura 21). Las diferencia en la carga superficial entre las dos cápsides podría ser el origen de por qué CCMV activa las células de macrófagos en mayor medida, ya que es bien sabido que a mayor carga aniónica las partículas tienden a ser reconocidas y fagocitadas por los macrófagos. En consecuencia, la captación de virus por parte de los macrófagos puede también activar

los receptores intracelulares, receptores tipo Toll (TLR) 7/8, que pueden reconocer el genoma viral de ssRNA, promoviendo la activación de los macrófagos. Este mecanismo de activación TLR 7/8 se ha reportado utilizando el virus del mosaico de la papaya (Leclerc et al., 2015).

Para analizar la respuesta inmune de las cápsides de CCMV y BMV, estas se funcionalizaron su superficie exterior con polietilenglicol (PEG) para disminuir su carga superficial y enmascarar los dominios de la proteína de la capside que los macrófagos podrían reconocer. El PEG se ha usado ampliamente para reducir la inmunogenicidad de las proteínas, y ha sido aprobado por la FDA. Actualmente se utilizan varios medicamentos disponibles comercialmente. Los conjugados de fármaco PEG muestran varias ventajas que incluyen residencia prolongada en el cuerpo, degradación reducida por enzimas metabólicas e inmunogenicidad proteica reducida o nula (Manchester et al., 2007). Aunque la PEGilación de las cápsides del CCMV (CCMV-PEG) redujo en gran medida la respuesta inmunogénica, parece que la baja la respuesta inmunológica del BMV lo convierte en un mejor candidato para nanovehículos de moléculas de interés terapéutico (Figura 9 C,D). A pesar de su inmunogenicidad, que puede limitar su uso para ciertas terapias, CCMV podría actuar como un inmunorregulador en terapias inmunológicas para mejorar algunos tratamientos contra el cáncer. Aun cuando estos resultados mostraron lo esperado es necesario determinar si la cápside se desensambla y libera su genoma para descartar la participación de su ssRNA en la respuesta inmune.

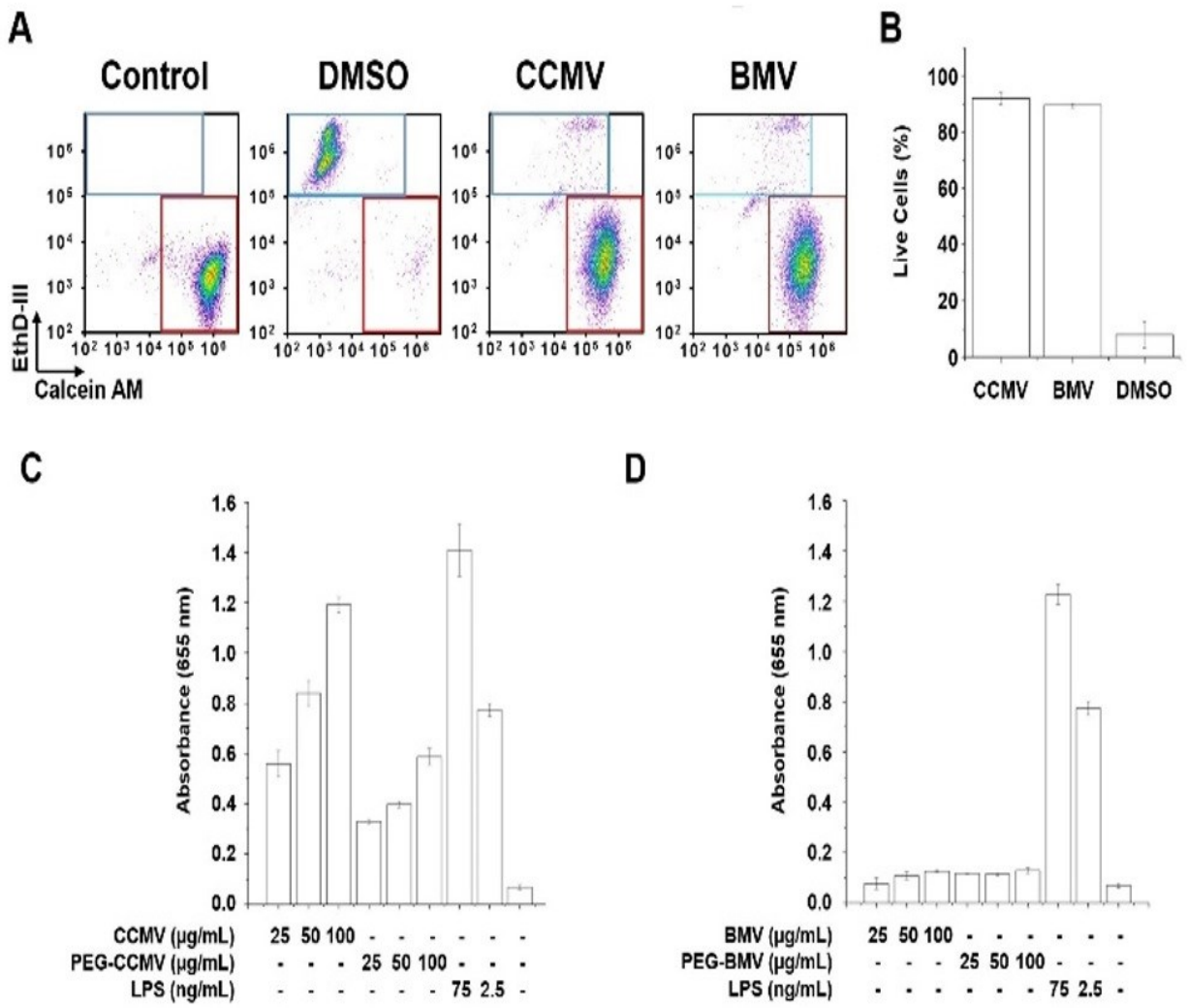


Figura 9. Biocompatibilidad y respuesta inmune de CCMV y BMV. (A) Las células MDA-MB-231 se incubaron con el virus CCMV y BMV durante 24 h con 2,62 x 107 virus / célula. La citotoxicidad se midió mediante citometría de flujo, usando calceína AM para cuantificar células vivas y EthD-III para células muertas. (B) Datos estadísticos representativos de células vivas después de la incubación del virus. La activación de macrófagos por (C) CCMV, (D) BMV y nanopartículas de virus PEGilado (PEG-CCMV / PEG-BMV) a diferentes concentraciones se midieron usando células RAW 264.7-Blue. El extracto de lipopolisacárido (LPS) se usó como control de la activación de los macrófagos. Las barras de error representan medias ± DE (n = 3). Los valores de P se calcularon mediante la prueba t de Student (P <0.01).

3.4 Síntesis y caracterización de VLPs-siRNA.

La tecnología de silenciamiento génico mediante ARN interferente se ha considerado entre las terapias más prometedoras para combatir el cáncer (Her et al., 2009). Sin embargo, hasta hoy el uso del siARN ha estado limitado por la falta de un vehículo que permita su funcionalidad y entrega al tejido deseado. Para resolver este problema, proponemos utilizar la cápsides virales de planta como nanovehículos para administrar el siARN. Aprovechando la propiedad de autoensamblaje de las proteínas de la cápside BMV y CCMV se realizó la síntesis de las VLPs con siRNA. Para probar la eficacia de estos nanovehiculos se encápsido un RNA interferente pequeño (siRNA) para silenciar la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP). Debido a los resultados anteriores en los que el BMV mostró una respuesta inmunogénica casi nula *in vitro* y cápsides de una estructura uniforme icosaédrica, únicamente las VLP derivadas del BMV que contienen siGFP. Nuestros resultados muestran una encapsidación eficiente del siRNA utilizando una relación de masa de 1:6 (siGFP:CP) para formar las VLPs-siGFP. Las VLPs-siRNA de BMV mostraron estructuras icosaédricas de aproximadamente 27.7 nm de diámetro, similares a las del virus nativo (T=3), lo cual se corroboro por TEM (Figura 10A y 18). De igual forma, las VLPs-siGFP de CCMV mostraron una morfología esférica similar, sin embargo también se observaron estructuras de mayor tamaño y en forma de rodillos. Es importante destacar que este es el primer informe de encapsidación de ácidos nucleicos en VLPs derivadas del BMV sin la necesidad de señal de empaquetamiento de RNA. Estudios anteriores reportaron que la estructura similar a tRNA (TLS) es indispensable para ensamblar BMV-VLPs con RNA que no contienen esta región (Rao et al., 2002; Rao et al., 2003), sin embargo, en este trabajo mostramos que no es necesaria la región TLS abriendo la probabilidad para un sin número de aplicaciones bionanotecnológicas.

Se estudió la internalización y liberación de siGFP en las células tumorales de mama MDA-MD-231, que expresan constitutivamente GPF. Los resultados muestran que después de 6 horas de tratamiento con VLPs-siGFP, se inhibió eficazmente la expresión de GFP, ver (Figura 10B), demostrando de esta manera la internalización de las nanopartículas y liberación del siGFP de las VLPs en el interior de las células tumorales. Cabe mencionar, que este es el primer trabajo que muestra la encapsidación y entrega eficiente de siRNA usando cápsides del virus BMV.

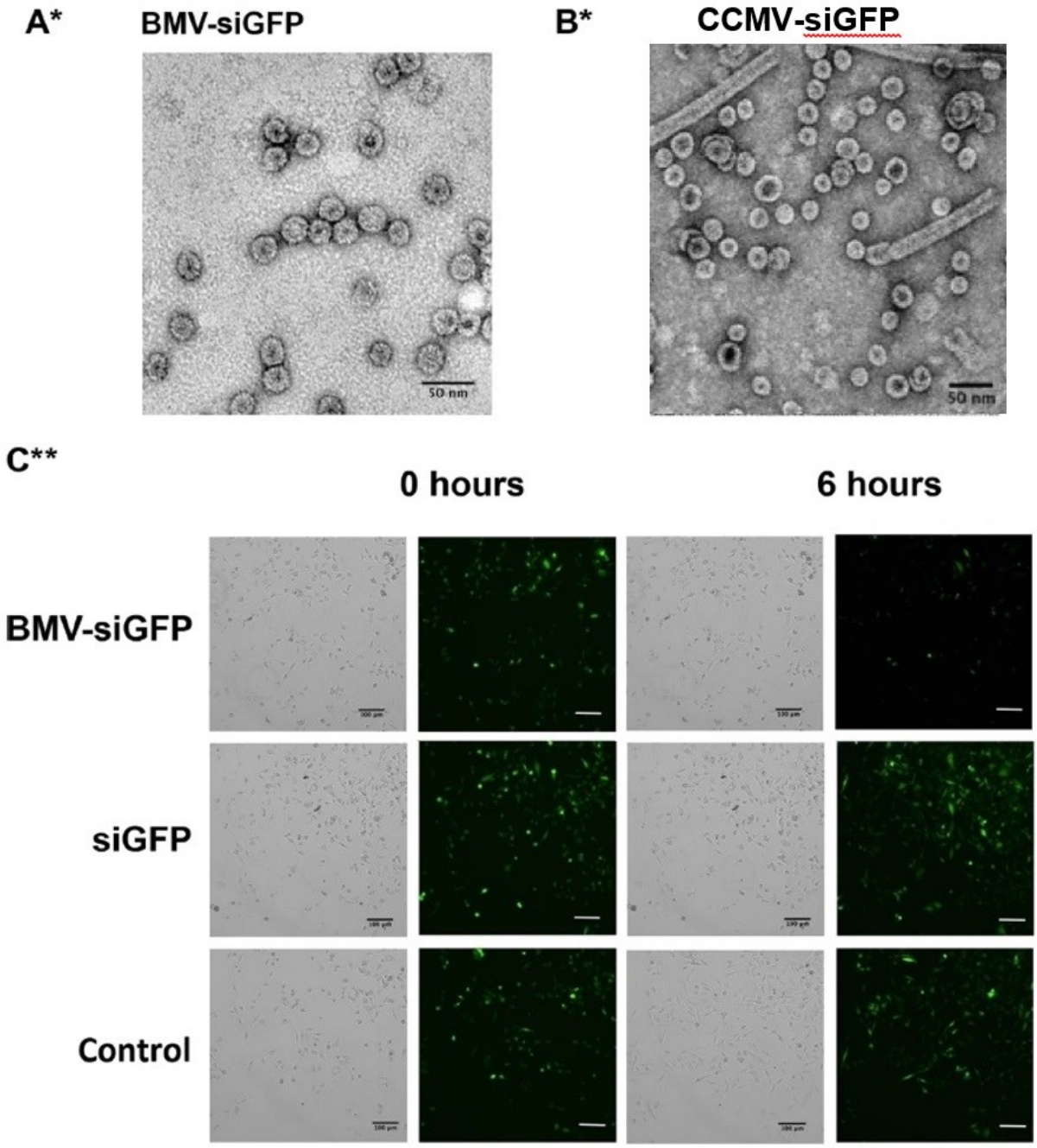


Figura 10. Encapsidación de siRNA usando CCMV y BMV. Imágenes de TEM de las VLPs ensambladas *in vitro* en una relación de masa de 1: 6 (siRNA: CP). (A) BMV VLP-siGFP, (B) CCMV VLP- siGFP). (C) Ensayo de silenciamiento de GFP para células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 que expresan establemente GFP. Las células se incubaron con BMV VLPs-siGFP y siGFP a una concentración de 50 nM. * Barra de la escala = 50 nm, ** 100 µm.

3.5 BMV VLPs-siAKT1.

Con la finalidad de obtener una nanopartícula con actividad terapéutica se encapsuló el RNA de interferencia pequeño contra el oncogén Akt1 siRNA (siAkt1) en BVM-VLP. Como se mencionó anteriormente, Akt1 es una quinasa involucrada en los procesos de proliferación celular, migración y transformación (Dennis et al., 2002; Nicosia et al., 2005). La encapsidación del siAkt1 se realizó utilizando una relación de masa 1:6 (siRNA-Akt1:CP-BMV). Se obtuvieron VLPs con una morfología icosaédrica de aproximadamente 27.8 nm de diámetro (T = 3), similar a la VLP-siGFP y la del BMV nativo (29.3 nm) (Figura 11 y 18). El tamaño de las nanopartículas se obtuvo mediante mediciones de dispersión dinámica de luz (DLS) (Figura 19).

Después de haber sintetizado las VLPs con siRNA en su interior, es importante poder determinar cómo está constituida esta nanopartícula tipo virus. Para determinar la cantidad de proteínas y la cantidad de siRNA encápsidado en cada una de las VLPs, se cuantificó mediante ensayos de fluorescencia utilizando VLPs purificadas. La correlación entre la fluorescencia observada y la concentración nos permitió estimar la concentración promedio de la proteína de la cápside y el siRNA en la suspensión de BMV-VLP (Figura 11 y 20). Con esta estimación, junto con los datos de las mediciones TEM, se estimó un promedio de 100 µg de CP por cada 23.8 µg de siRNA, por lo tanto, obtuvimos un promedio de 66 moléculas de siRNA por cápside, con un numero de triangulación T = 3 (180 CP), el cual fue estimado a través de las imágenes obtenidas por medio de TEM. Por lo tanto, la eficiencia de confinamiento de siRNA en BMV-VLPs es 10 veces mayor que lo reportado para CCMV VLPs (Steinmetz et al., 2019). Considerando que un siRNA tiene 42 cargas eléctricas negativas por molécula, en el interior de la VLP hay 2,772 cargas negativas, que está de acuerdo con el promedio de las cargas negativas en cada uno de los viriones que constituyen el BMV nativo: 3000 z^- / cápside (Johnson et al., 1995; Gelbart, et al., 2012).

El ensayo para evaluar la actividad de las BMV VLPs-siAKT1 se realizó en ratones BALB-c y se usaron como controles el CCMV, BMV y siAKT1. Los tumores de cáncer de mama se indujeron en ratones hembra usando la línea celular de ratón 4T1. Después de 10 días de inoculación del tumor, se administraron por inyección dosis de 100 µg del virus de planta y VLPs-siRNA cada tres días durante dos semanas en la periferia del tumor (Figura 12A). El tamaño del tumor se evaluó dos veces por semana durante 28 días. Se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 12 B,C). Los ratones se sacrificaron y las mediciones de peso y volumen ex vivo en los tratamientos con CCMV y BMV-siAKT1 mostraron diferencias significativas, inhibiendo alrededor del 50% del tamaño del tumor en comparación con el

control (Figura 12D, E). La eficiencia de las VLP de BMV en la administración de siRNA es similar a la observada cuando se usaron nanopartículas de niosomas de oro multilamelares para administrar siRNA-AKT (Leclerc et al., 2018). Inesperadamente, el tratamiento con el virus de BMV solo indujo el crecimiento tumoral en comparación con el control (Figura 12D), por lo que el tumor pudo haber invadido el peritoneo. Es importante mencionar que los ratones no mostraron diferencias significativas de peso después de los diferentes tratamientos. La reducción del crecimiento tumoral inducida por el tratamiento con CCMV es probable que se deba a su capacidad inmunogénica, esto concuerda con los experimentos de activación de macrófagos *in vitro* mostrados anteriormente, y con antecedentes previos de inmunorregulación *in situ* de tumores, y la inhibición de metástasis usando VLPs derivadas del virus CPMV (Leclerc et al., 2018; Steinmetz et al., 2015). Se sabe que el tratamiento con VLPs del CPMV muestra una mayor inhibición del tumor que el uso de agentes altamente inmunogénicos como lipopolisacárido (LPS), poli (I: C) y DMXAA (Leclerc et al., 2018). Es posible que el CCMV actué de manera similar que el virus CPMV, mediante la regulación del microambiente tumoral. El virus podría inducir la polarización de los macrófagos induciendo la expresión de citosinas y quimosinas que activan los neutrófilos infiltrados en el tumor, produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que culmina con un efecto citotóxico (Pasut et al., 2005). Por otro lado, el virus también podría modular y reclutar células T CD8 +, y células asesinas naturales (NK) para generar un efecto citotóxico como se ha demostrado anteriormente (Pasut et al., 2005; Suzuki et al., 2019). Finalmente, este resultado demuestra que *in vivo* las VLPs de BMV pueden internalizarse, administrar y liberar eficientemente siRNA anticancerígeno en células tumorales.

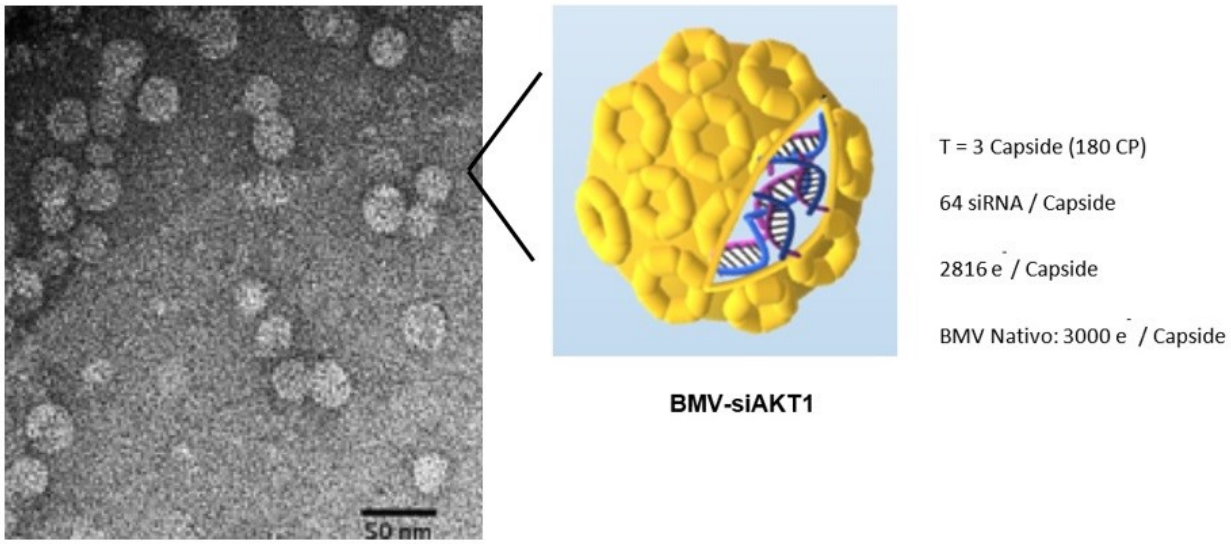


Figura 11. Caracterización de VLPs BMV-siAKT1. Imágenes de TEM representativa de las VLPs ensambladas *in vitro* en una relación de masa de 1: 6 (siRNA: CP). Donde se calculó el tamaño, estructura y dispersión de las nanoparticulas. Barra de la escala = 50 nm.

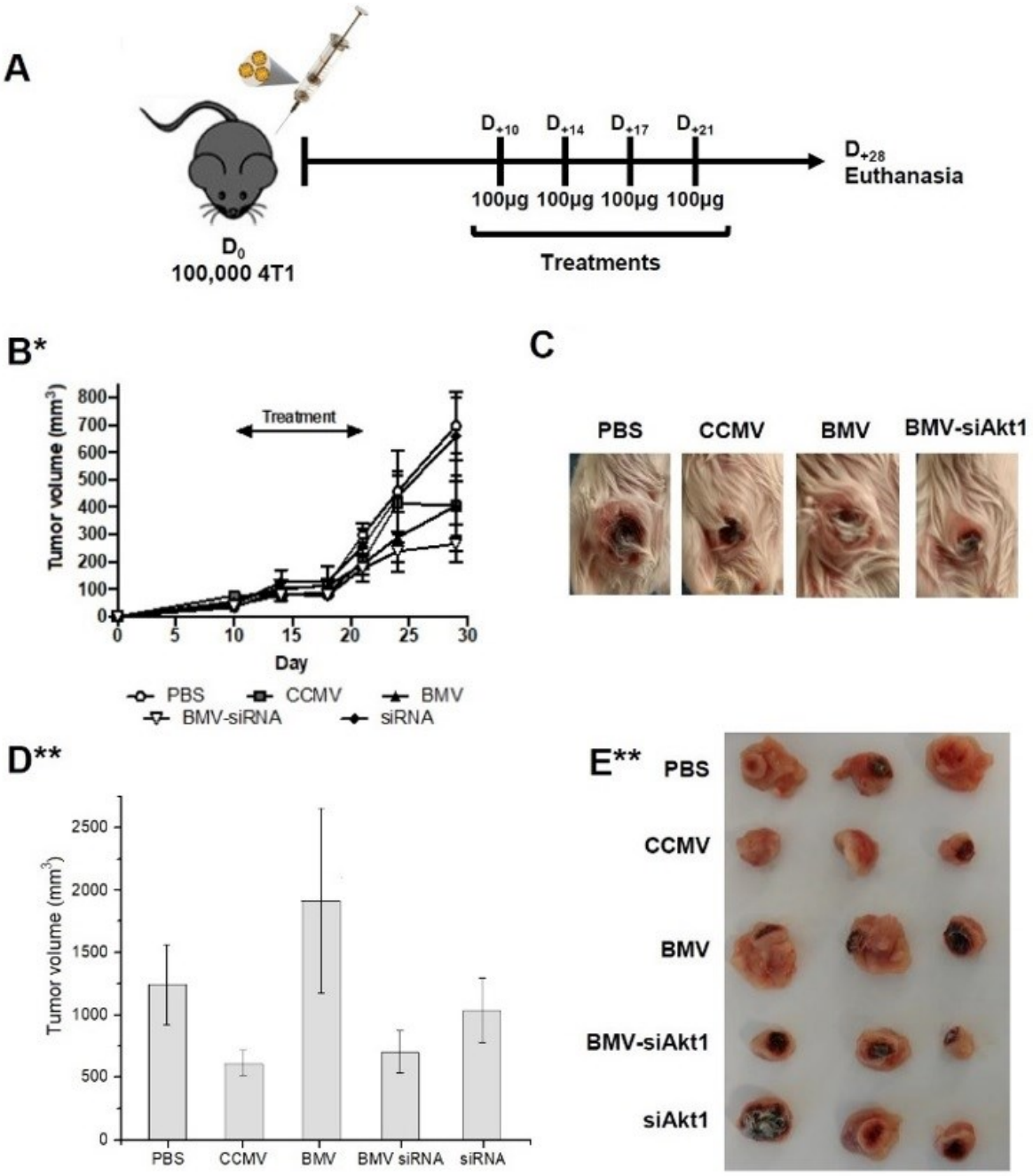


Figura 12. Efecto terapéutico antitumoral de las nanopartículas de virus. (A) Ilustración esquemática del diseño experimental. (B) Curvas de crecimiento *in vivo* de tumores 4T1 en ratones después de tratamientos con virus y VLPs. (C) *In vivo* CCMV, BMV y BMV VLP-siAkt1 mostraron el efecto de inhibición más alto para la progresión del tumor. (D) Representación gráfica ex vivo del tamaño del tumor para cada grupo de tratamiento. (E) Imágenes ex vivo del tumor de cáncer de mama 4T1 de los diferentes tratamientos en el día 28 día. Las barras de error representan medias ± SD. Los valores de P se calcularon mediante la prueba t de Student (* P <0.01, ** P <0.05).

3.6 Diseño de VLPs-CDH11.

Otra estrategia para combatir el cáncer mama es a través de la caderina-11. La caderina-11 (CDH11), es un receptor de adhesión celular que se asocia a la transformación epitelial mesenquimal (EMT) y por ende a un mal pronóstico de cáncer. En cáncer de mama de fenotipo basal B, el aumento de la expresión de las caderinas mesenquimales N-caderina y/o caderina-11 (CDH11) y disminución de la E-caderina se han asociado con la EMT y la progresión tumoral. Específicamente, en las células MDA-MB-231 la CDH11 es necesaria para el crecimiento tumoral, ya que regula los procesos de proliferación celular, formación de colonias, migración e invasión de varias células tumorales positivas para CDH11. Cabe mencionar que la CDH11 es una caderina tipo II que contiene dos residuos de triptófano con sitios hidrofóbicos distintivamente grandes en su dominio de unión al ectodominio extracelular 1 (EC1) (Shapiro et al., 2006). Como las caderinas tipo I, como las E y N-caderinas, solo tienen un residuo de triptófano en sus dominio de unión, entonces la CDH11 ofrece un dominio único para el direccionamiento de terapias contra el cáncer. Tomando como base estos antecedentes, el laboratorio de Stephen y Bryers (2013) utilizando química computacional y modelado identificó los posibles sitios de interacción del anticuerpo comercial Celecoxib (anti-caderina-11) para diseñar y sintetizar una variedad de pequeñas moléculas químicas que son capaces de unirse y bloquear a estos dominios de la caderina-11 y que promueven la interacción célula-célula. La molécula que presentó mayor actividad fue el sd-133, sin embargo no presento un efecto citotóxico en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y esto se asocia a que esta molécula tienen un alto perfil hidrofóbico.

Con la finalidad potenciar el efecto de sd-133, en el laboratorio se sintetizó un nuevo compuesto al adicionarle un grupo funcional NH_2 a la molécula (sd-133-NH_2). Esto con la finalidad de poder conjugar el sd-133-NH_2 a las VLPs de los virus del BMV y aumentar así su solubilidad.

Las VLPs de BMV se conjugaron químicamente de manera directa a las proteínas de la cápside e indirectamente utilizando PEG como intermediario (Figura 13A). Se obtuvieron partículas estables y monodispersas utilizando una proporción de un exceso molar de 300 veces más sd-133-NH_2 que de cápsides del BMV (300:1 – sd-133-NH_2:BMV) (Figura 13B). A su vez, mediante TEM y DLS se determinó el tamaño de las nanopartículas obtenidas y así verificar si que las cápsides virales de BMV se funcionalizaron eficientemente con la molécula sd-133-NH_2 (Figura 21). Los resultados de DLS muestran tamaños de 32 nm para el virus nativo del BMV, de 36.35 nm para el BMV-sd-133 funcionalizado, y de 42.24 nm para el BMV-PEG-sd-133 funcionalizado en el exterior de la cápside. De igual forma, utilizando el nanosizer, se

evaluó el potencial zeta de las nanopartículas para confirmar si la molécula sd-133, al presentar una carga negativa, aumentaba la carga superficial del virus del BMV. Ambos resultados, el análisis de tamaño y del potencial zeta, nos mostraron que las nanopartículas de BMV fueron efectivamente conjugadas con la nueva molécula sd-133-NH_2 (Figura 21).

Como ya se mencionó anteriormente, la molécula sd-133 es poco soluble en condiciones fisiológicas, por lo que es importante evaluar si el virus del BMV funcionalizado con esta molécula permite el incremento de su actividad. Para lo cual, las cápsides del BMV-sd-133 y BMV-PEG-sd-133 fueron inoculadas en la línea tumoral de cáncer de mama MDA-MB-231 para determinar si generaban un efecto citotóxico en las células. Se utilizaron las concentraciones de 5 y 10 μM que están dentro del rango de lo reportado previamente para la molécula sd-133. Mediante citometría de flujo y utilizando de kit de viabilidad celular (life/Dead) de biotum se determinó que las nanopartículas BMV-PEG-sd-133 aumentaron al doble su actividad citotóxica (Figura 14A). Resultado que nos alienta a pensar que las nanopartículas de BMV-sd-133 sintetizadas no solo nos permitirán reconocer de manera específica a la caderina-11, un receptor celular sobre expresado en células cancerígenas, si no que también al bloquear la función de la cadherina-11 (interacción célula-célula), generan un efecto citotóxico en las células tumorales de mama (Figura 14B).

Con base a estos resultado obtenidos, también se evaluó si las cápsides del BMV-sd-133 y BMV-PEG-sd-133 eran capaces de inhibir de proceso de proliferación celular. Con este fin se inocularon las células MDA-MB-231 con una concentración de 10 μM (BMV-sd-133 y BMV-PEG-sd-133) y se analizó la capacidad de las células para generar una alta confluencia. Como lo muestran las imágenes de microscopia, las células fueron marcadas digitalmente con azul para determinar el porcentaje de área cubierta por células (Figura 15A). Las nanopartículas del BMV-sd-133 y BMV-PEG-sd-133 inhibieron alrededor de un 40% de la proliferación celular, resultado que concuerda con los anteriormente reportados para el sd-133 (Stephen et al., 2013).

De igual forma, también se evaluó la capacidad de las nanopartículas BMV-sd-133 y BMV-PEG-sd-133 para bloquear el proceso de migración celular. Bajo las mismas concentraciones y mediante el ensayo de herida en placa se analizó el potencial de las células de migrar y cerrar la herida. Ambas partículas (BMV-sd-133 y BMV-PEG-sd-133), fueron capaces de inhibir el 60% de la migración celular (Figura 15B). Este resultado confirma el efecto de la caderina-11 en el proceso de migración, y sugiere un efecto citotóxico al utilizar las nanopartículas BMV-PEG-sd-133.

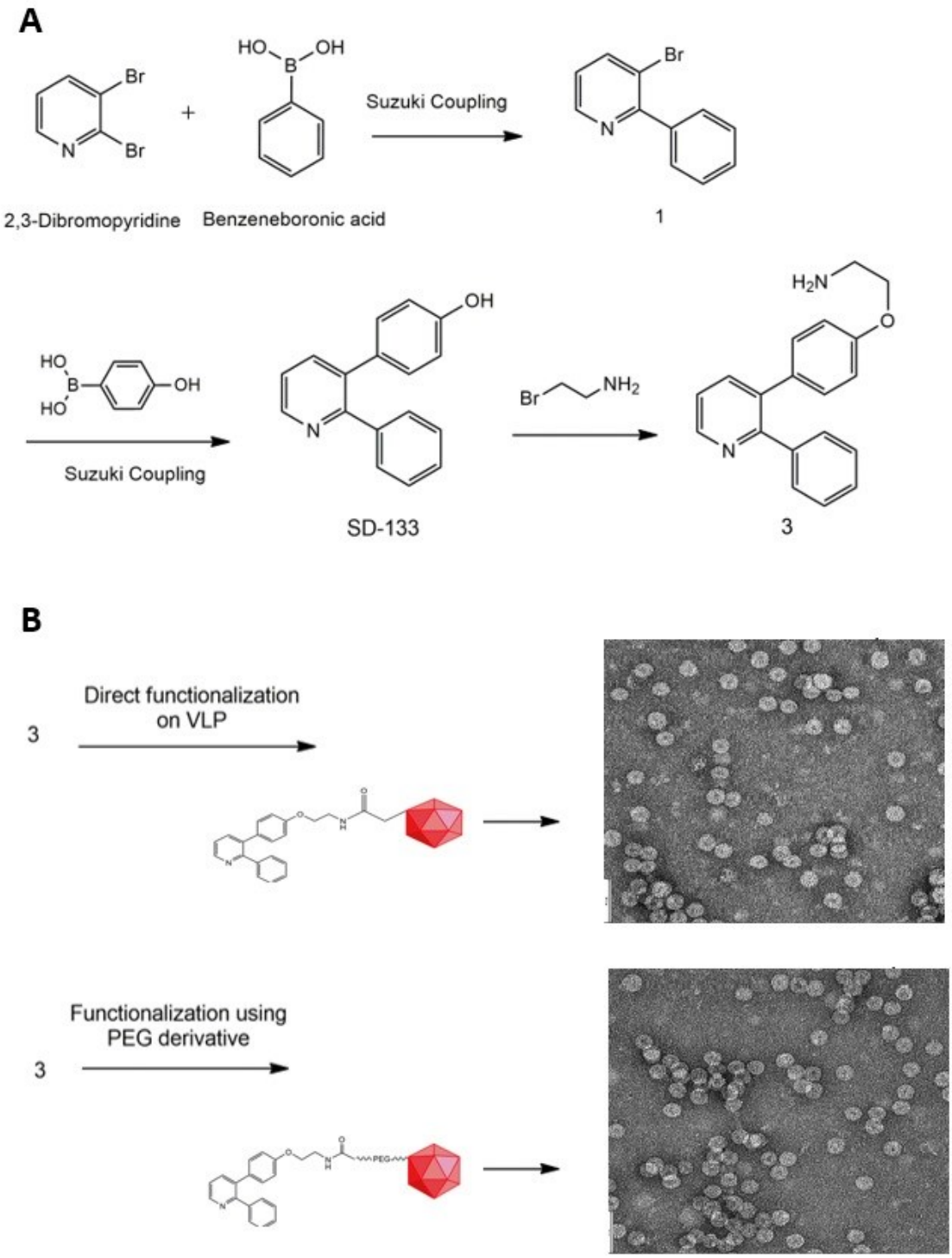


Figura 13. Representacion esquematica de la sinteiss de sd-133-NH_2. (A) Estrategia y precursores utilizados en la adición de grupo funcional NH_2 a la molécula sd-133. (B) Imágenes de TEM de los virus de BMV funcionalizados con sd-133-NH_2 y PEG-sd-133-NH_2 .

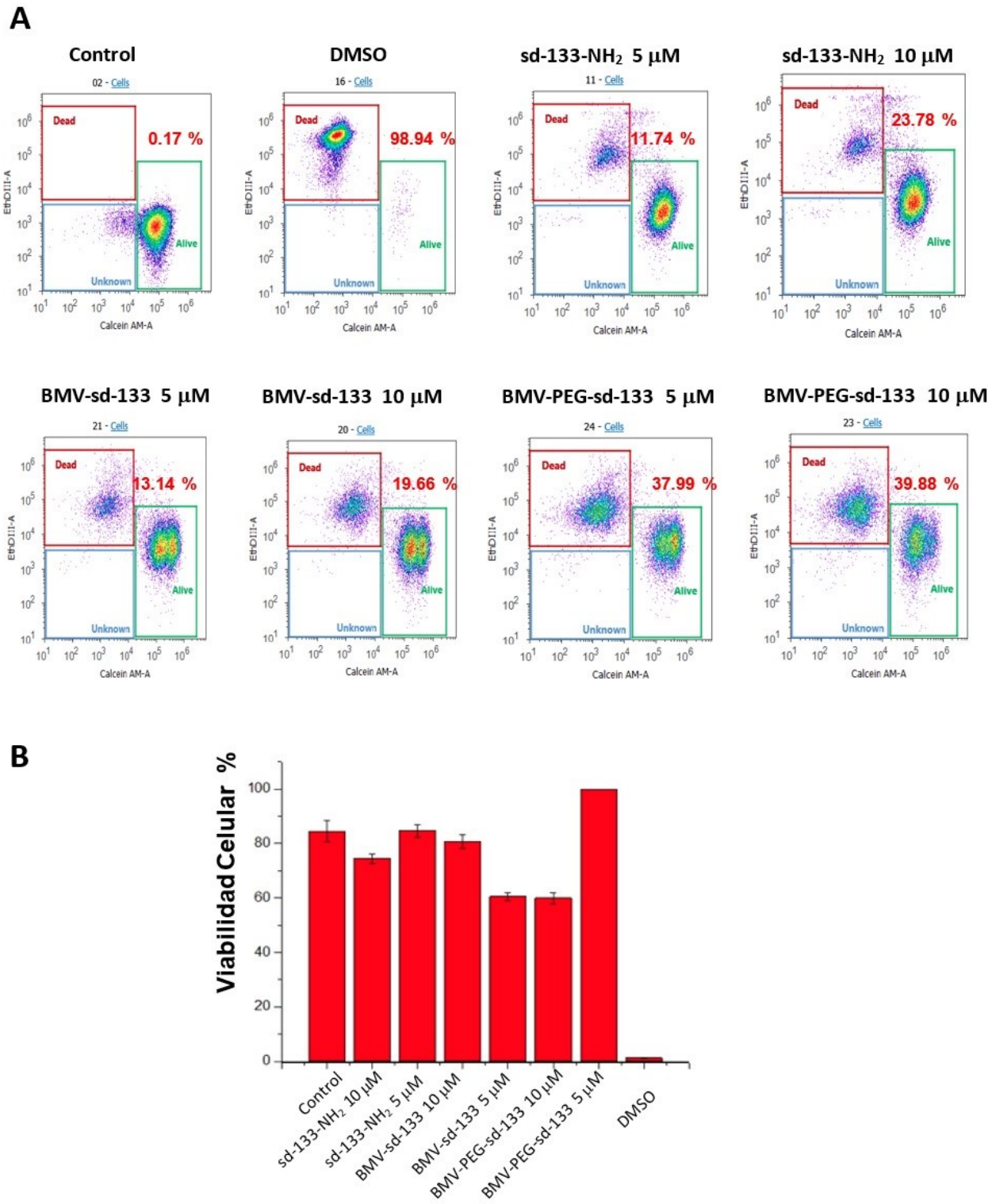


Figura 14. Citotoxicidad de sd-133 conjugada al BMV. (A) Histogramas de citometría de flujo que evalúan la actividad de las partículas BMV-sd-133 y BMV-PEG-sd-133. (B) Representación gráfica de la citotoxicidad de las cápsides virales funcionalizadas con sd-133 .

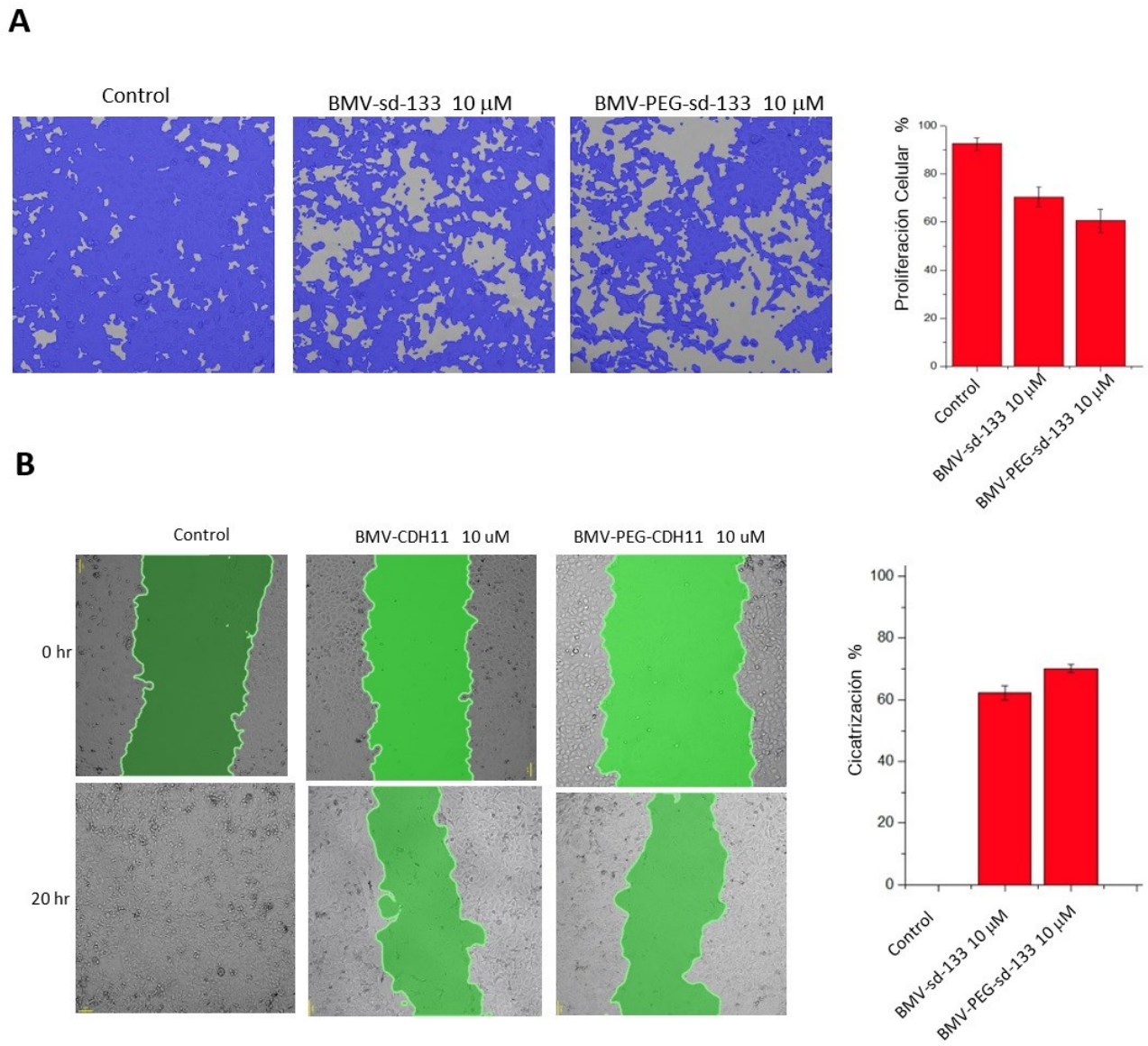


Figura 15. Inhibición de los procesos de proliferación y migración celular por BMV-sd-133. (A) Determinación del área no poblada por las células MDA-MB-231 en cultivos inoculados con los tratamientos BMV-sd-133 y BMV-PEG-sd-133, 24 horas despues. (B) Ensayos de Cicatrización/ Herida en placa que ejemplifican el potencial de sd-133 funcionalizado para inhibir la migración celular, aplicando una concentración 10 µM de sd-133.

En resumen, el desarrollo de nuevas terapias y combinaciones de medicamentos son necesarios para lograr una mayor efectividad y una respuesta que se mantenga a largo plazo para el tratamiento de canceres metastásicos. Se ha reconocido que las terapias moleculares y la inmunidad antitumoral son estrategias prometedoras para contender contra tal padecimiento. Tal vez sea necesario eliminar las células tumorales utilizando un régimen de quimioterapias óptimas en combinación con una terapia molecular y al mismo tiempo estimular una respuesta inmune antitumoral para eliminar las células

tumorales residuales o mantenerlas bajo control. Uno de los puntos clave para el desarrollo de estas nuevas terapias lo constituyen los nanovehículos.

En este trabajo demostramos que los nanovehiculos del CCMV y BMV son altamente biocompatibles y capaces de encapsidar eficientemente siRNA. Así mismo también se logró conjugar fármacos anti-cancerígenos a las cápsides virales. Por lo que pensar en una partícula que combine ambas estrategias, fármacos y siRNA, nos ofrecería una alternativa prometedora para inhibir la proliferación de tumores.

Se demostró también que el BMV-siAKT1 fue capaz de inhibir significativamente el tumor en modelos *in vivo* sin desarrollar tumores secundarios durante los 28 días de monitoreo. Con base en este resultado podemos sugerir que el BMV es capaz de internalizar a las células cancerígenas y liberar su cargo, induciendo la inhibición de la expresión del oncogén de AKT1. Cabe mencionar que este es el primer reporte donde se demuestra que un virus de planta, como el BMV, presenta una respuesta inmunológica casi nula, característica que potencializa su uso como nanovehículo para terapias contra el cáncer.

Sumado a estos resultados también se demostró el potencial inmunológico del CCMV, lo cual concuerda con reportes previos donde demuestran que el CPMV es capaz de actuar como inmunoregulador, a través del reclutamiento y activación de células del sistema inmune, al inhibir la metástasis y promoviendo la regresión tumoral en un modelo de cáncer de mama. Los virus nativos CCMV y CPMV parecen promover una respuesta inmune adaptativa y activar/ o reclutar células como macrófagos, monocitos DC y neutrófilos infiltrados en el tumor (TINs). Esto se podría asociar a la activación de receptores por PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), donde algún dominio inmunogénico de la proteína de la cápside o el ssRNA del virus podrían activar estos receptores. Los receptores TLRs (toll like receptors) son receptores que se expresan en las células del sistema inmune y pueden estimular una respuestas inmune innatas y adaptativa. En el caso del CPMV se ha evaluado a las cápsides vacías (sin su genoma de ssRNA) y fueron capaces de activar una respuesta inmune (Steinmetz et al., 2016). Sin embargo el virus del CPMV completo presentó una mejor actividad, por lo que las proteínas de la cápside podrían estar activando a los TLRs pero a su vez el ssRNA del virus también podría activar a estos receptores y potenciar su efecto. Se sabe que los TLRs 7/8 intracelulares son capaces de reconocer ssRNA y activar a las células del sistema inmune como macrófagos y neutrófilos (Steinmetz et al., 2019). Los TIN se han identificado como los moduladores primarios de las respuestas innatas antitumorales. Se ha demostrado que el contacto físico directo entre los neutrófilos y las células cancerosas es un requisito previo para generar citotoxicidad en células cancerígenas. Esta citotoxicidad se atribuye al H_2O_2 secretado por neutrófilos que induce la entrada de Ca^{2+} en las células cancerosas, lo que conduce a la apoptosis (Kudoh et al., 2002) o a la

interacción del ligando Fas (inductor de apoptosis) de los neutrófilos con el receptor Fas de las células cancerosas, que detiene la progresión del ciclo celular tumoral en la fase G1 a la S (Sun et al., 2018). Adicionalmente, los virus podrían estar induciendo la polarización de los TINs de tipo N2 a N1. Los neutrófilos tipo 1 (N1) son pro-inflamatorios, lo cuales promueven el reclutamiento y la activación de células T $CD8^+$ (citotóxicas) mediante la secreción de quimiocinas (p. ej., CCL3, CXCL9 y CXCL10) y citocinas (p. ej., IL-12, TNF-, GM-CSF) que atraen a las células T (Albelda et al., 2009). Al igual que a los neutrófilo los virus del CPMV y CCMV podrían inducir la polarización de los macrófagos de tipo 1 (M1) a 2 (M2) en el tumor, los cuales son pro-inflamatorios y podrían inducir el reclutamiento de células citotóxicas.

Otra población de células inmunes innatas infiltradas en el tumor son las células NK. Las células NK se encuentran entre las células citotóxicas más potentes contra las células tumorales y los altos niveles de células NK infiltrantes de tumores se asocian con un resultado tumoral favorable en los pacientes. Las células NK pueden matar a las células tumorales liberando gránulos citolíticos que contienen perforinas y granzimas, lo que conduce a la apoptosis de las células cancerosas; Las células NK también inducen la apoptosis mediada por el receptor de la muerte (Grandien et al., 2001). A su vez también la activación de células NK se asocia con una repuesta inmune adaptativa.

Como se discutió anteriormente, es necesario poder identificar exclusiva o preferencialmente a las células cancerígenas para direccionar las nuevas terapias de manera selectiva. En este trabajo propusimos al receptor de adhesión celular caderina-11 como ligando para reconocer a las células cancerígenas. Demostramos que se pudo sintetizar una nueva molécula sd-133-NH_2 capaz de reconocer a la caderina-11, y a su vez fuera capaz de conjugarse a las VLPs de virus de planta. Se determinó que el sd-133 al estar conjugada en las nanopartículas (BMV-sd-133 y BMV-PEG-sd-133) no pierde su actividad. Aún más, las BMV-PEG-sd-133 presentaron un efecto citotóxico en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, caracterizada por no presentar el sd-133 libre.

Un mal pronóstico para los pacientes con cáncer es el proceso de metástasis, cuando a partir de un tumor primario las células migran e invaden otros tejidos generando tumores secundarios. La ETM es un fenómeno asociado a la metástasisen células de cáncer de mama, , y una molécula es la que participa en esta transición, la caderina-11. Se sabe que de forma contraria la caderina-E actúa como un supresor de tumores y se expresa en células epiteliales, sin embargo cuando las células se transforman en mesenquimales se inhibe su expresión, y se induce la expresión de caderina-11. Por lo que nosotros proponemos que podría estar ocurriendo una transición en la expresión de la caderina-E por la caderina-11. Con base a estos antecedentes nuestros nanovehículos BMV-sd-133 y BMV-PEG-sd-133, no solo nos

podrán permitir direccionar y liberar nuestros tratamientos de manera selectiva hacia las células cancerígenas, si no que también nos permiten promover la MET y re-expresar a la caderina-E, la cual actúa como supresor de tumores, e inclusive promover un efecto citotóxico en las células cancerígenas. Esto sumando al potencial observado en los tratamientos con las VLPs-siAKT1. También se sabe que al promover la MET se asocian un mayor número de célula de sistema inmune infiltradas en el tumor, por lo que la terapia molecular ((VLPs-siAKT1)-PEG-sd-133) en combinación con el virus CCMV podrían modular aún más el nicho tumoral y aumentar el reclutamiento de células del sistema inmune innato, como linfocitos T $CD8^+$, neutrófilos, macrófagos y NKs, y promover un efecto citotóxico aún mayor.

Esta estrategia en particular, que combina la tecnología del RNAi, el bloqueo de la caderina-11, la promosión de la transición de células mesenquimales a epiteliales (MET), la utilización de los virus del CCMV y CPMV como inmunoestimuladores, y la entrega de fármacos de manera selectiva, sin duda es una plataforma multifuncional que tiene como fin controlar de manera eficaz y prolongada el desarrollo de cáncer y que nunca se había sugerido. Por lo que pensamos que este trabajo es de mayor relevancia ya que podrían integrarse múltiples estrategias en una misma nanopartícula, incrementando la eficiencia de los tratamientos contra el cáncer, en comparación con los convencionales que están actualmente disponibles en el mercado, que pueden ser muy ineficientes pero sobre todo que producen efectos secundarios no deseados al ser inespecíficos.

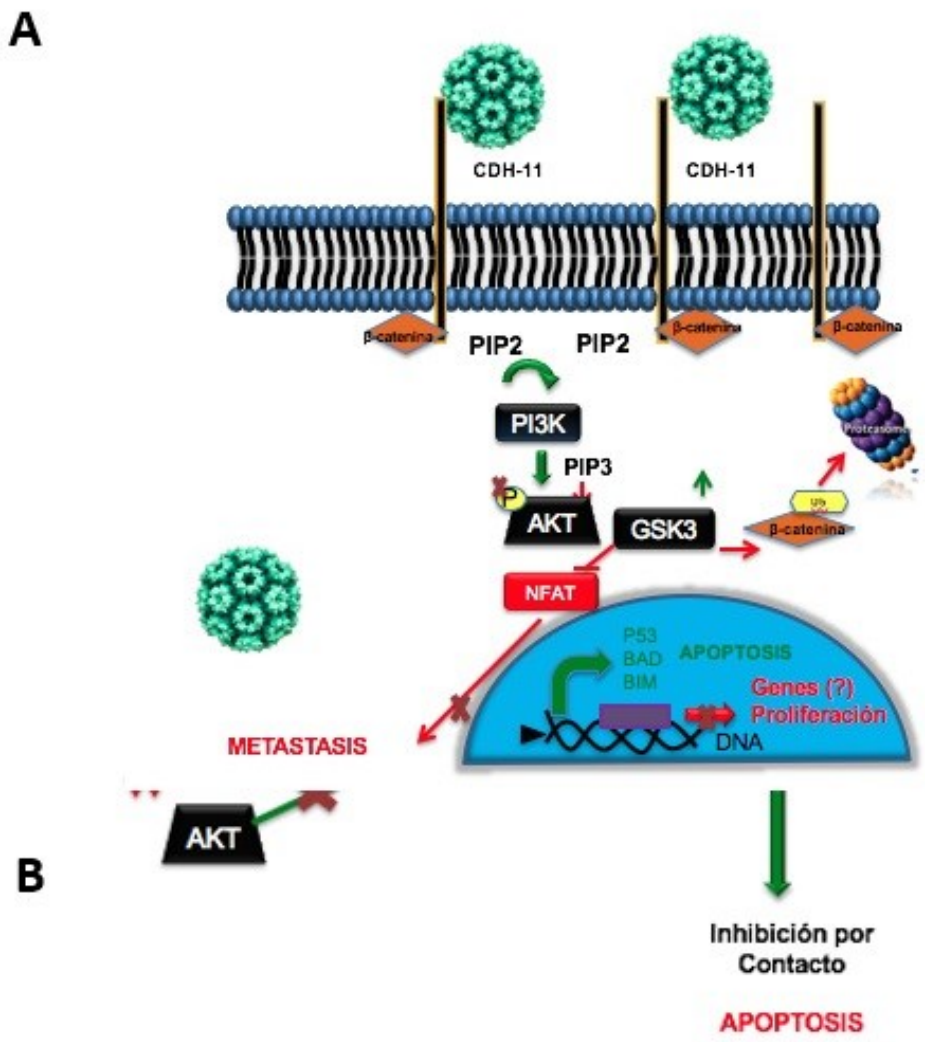


Figura 16. Modelos propuestos del mecanismo de acción las VLPs-sd133. (A) Reconocimiento y bloqueo del receptor para Caderina-11. (B) Inducción de la re-expresión de la caderina-E a través del bloqueo de la caderina-11.

Capítulo 4. Conclusiones

Se ha demostrado la capacidad de las VLPs de plantas para administrar siRNA en las células tumorales. Estas VLPs se internalizan portando, una o ambas, moléculas de RNA de interferencia y fármacos hidrófobicos. La hidrofobicidad de los fármacos es un factor limitante para el acoplamiento a las cápsides virales y los vuelve completamente solubles. La internalización celular de las VLPs del CCMV y BMV no mostró toxicidad, lo que los convierte en excelentes nanovehículos biocompatibles para transportar medicamentos y terapias moleculares hacia células cancerígenas. Las cápsides del BMV pueden transportar y liberar eficazmente siRNA en células tumorales sin inducir una respuesta inmunológica. Además, la versatilidad de estos nanovehículos permite su funcionalización en la superficie de la cápside viral con ligandos específicos (ácido fólico, anticuerpos, manosa modificada, etc.) que aumentan aún más el reconocimiento de tejidos específicos o células tumorales específicas. Para el caso específico de la cadherina-11 se determinó que las cápsides del BMV-sd-133 y BMV-PEG-sd-133 fueron capaces de inhibir los proceso de proliferación y migración celular. Inclusive, las cápsides BMV-PEG-sd-133 generaron un efecto citotóxico, en células de cáncer de mama, no reportado anteriormente para la molécula sd-133.

El acoplamiento de medicamentos, terapias moleculares como el siRNA y terapias inmunológicas en el mismo nanovehículo se presenta como una excelente estrategia para aumentar la eficiencia de las terapias contra el cáncer.

4.1 Trabajo a futuro.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se propone:

- Analizar a nivel molecular como ocurre la transición molecular entre caderina-11 y caderina-E, y a su vez el papel que juega AKT en este proceso.

- Diseñar y caracterizar las nanopartículas VLPs-siAKT1-PEG-sd-133.

- Probar las terapias moleculares VLPs-siAKT1-PEG-sd-133 en combinación con fármacos utilizados en quimioterapias.

- Evaluar la respuesta inmune de los diferentes virus de planta (CCMV, BMV, CPMV, CMV, etc.) en combinación con inmunoreguladores como PD-1L o antígenos que aumenten la respuesta inmunológica.

- Analizar la capacidad de promover apoptosis o citotoxicidad de las nanopartículas VLPs-siAKT1, VLPs-siAKT1-PEG-sd-133, VLPs-siAKT1 + (CCMV o CPMV + PD-1L), VLPs-siAKT1-PEG-sd-133 + (CCMV o CPMV + PD-1L). En diferentes líneas celulares.

Literatura citada

Agrawal, A.; Manchester, M. 2012. Differential uptake of chemically modified *Cowpea mosaic virus*nanoparticles in macrophage subpopulations present in inflammatory and tumor microenvironments. *Biomacromolecules*. *13*, 3320–3326.

Aguilar JC, Rodriguez EG. 2007. Vaccine adjuvants revisited. Vaccine 25:3752–62.

Aljabali, A. A. A.; Shukla, S.; Lomonossoff, G. P.; Steinmetz, N. F.; Evans, D. J. 2013. CPMV-DOX Delivers *Mol. Pharm. 10*, 3–10.

Arboleda, M.J., Lyons, J.F., Kabbinavar, F.F., Bray, M.R., Snow, B.E., Ayala, R., Danino, M., Karlan, B.Y., and Slamon, D.J. 2003. Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res* 63(1): 196-206.

Ashley, C. E.; Carnes, E. C.; Phillips, G. K.; Durfee, P. N.; Buley, M. D.; Lino, C. A.; Padilla, D. P.; Phillips, B.; Carter, M. B.; Willman, C. L. 2011. Cell-specific delivery of diverse cargos by bacteriophage MS2 virus-like particles. *ACS Nano*. *5*, 5729–5745.

Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. 2013. Mechanisms of action of adjuvants. Front. Immunol. 4:114.

Azizgolshani, O.; Garmann, R. F.; Cadena-Nava, R.; Knobler, C. M.; Gelbart, W. M. 2013.*Virology*. Reconstituted plant viral capsids can release genes to mammalian cells. *441*, 12–17.

Bancroft JB., Hiebert E., Bracker CE. 1969. The effect of various poly-anions on shell formation of some spherical viruses. Virology 39: 924-930.

Bancroft JB., Hiebert E. 1967. Formation of an infectious nucleoprotein from protein and nucleic acids isolated from small spherical virus. Virology 32: 354-356.

Barna, M., Pusic, A., Zollo, O., Costa, M., Kondrashov, N., Rego, E., Rao, P.H., and Ruggero, D. 2008. Suppression of Myc oncogenic activity by ribosomal protein haploinsufficiency. *Nature* 456(7224): 971-975.

Barwal, I.; Kumar, R.; Kateriya, S.; Dinda, A. K.; Yadav, S. C. 2016. Targeted delivery system for cancer cells consist of multiple ligands conjugated genetically modified CCMV capsid on doxorubicin GNPs complex. *Sci. Rep. 6*, 1–15.

Beauvillain, C.; Delneste, Y.; Scotet, M.; Peres, A.; Gascan, H.; Guermonprez, P.; Barnaba, V.; Jeannin, P.; Dc, W. 2011. Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. *110*, 2965–2973.

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.

Bellacosa, A.; Kumar, C. C.; Di Cristofano, A.; Testa, J. R. 2005. *Adv. Cancer Res. Vol 94*. Activation of AKT kinases in cancer: Implications for therapeutic targeting. *94*, 29–86.

Bertini, E., Oka, T., Sudol, M., Strano, S., and Blandino, G. 2009. YAP: at the crossroad between transformation and tumor suppression. *Cell Cycle* 8(1): 49-57.

Black, D. R.; Connell, C. J.; Merigan, T. C. 1973. Structure and infectivity of picornaviral RNA encapsidated by cowpea chlorotic mottle virus protein. *J. Virol. 12(6)*, 1209–1215.

Blanco, E.; Shen, H.; Ferrari, M. 2015. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat. Biotechnol. 33*, 941–951.

BrownWL, Mastico RA,WuM, Heal KG, Adams CJ, et al. 2002. RNA bacteriophage capsid-mediated drug delivery and epitope presentation. Intervirology 45:371–80.

Burgering, B.M. and Coffer, P.J. 1995. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 376(6541): 599-602.

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. 446–450.

Cadena-Nava, R. D.; Comas-Garcia, M.; Garmann, R. F.; Rao, A. L. N.; Knobler, C. M.; Gelbart, W. M. 2012. Self-assembly of viral capsid protein and RNA molecules of different sizes: requirement for a specific high protein/RNA mass ratio. *J. Virol. 86*, 3318–3326.

Carignan, D.; Herblot, S.; Laliberté-Gagné, M. È.; Bolduc, M.; Duval, M.; Savard, P.; Leclerc, D. 2018. Activation of innate immunity in primary human cells using a plant virus derived nanoparticle TLR7/8 agonist. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. 14*, 2317–2327.

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.

Chau, N.-M.; Ashcroft, M. 2003. Akt2: a role in breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res. 6*, 55.

Chen, Z. G. 2010. Small-molecule delivery by nanoparticles for anticancer therapy. *Trends Mol. Med. 16*, 594–602.

Cheng, J. Q.; Lindsley, C. W.; Cheng, G. Z.; Yang, H.; Nicosia, S. V. 2005. The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery. *Oncogene*. *24*, 7482–7492.

Cheng, J.Q., Ruggeri, B., Klein, W.M., Sonoda, G., Altomare, D.A., Watson, D.K., and Testa, J.R. 1996. Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(8): 3636-3641.

Choi, H. S.; Liu, W.; Liu, F.; Nasr, K.; Misra, P.; Bawendi, M. G.; Frangioni, J. V. 2010. Design considerations for tumour-targeted nanoparticles. *Nat. Nanotechnol. 5*, 42–47.

Choi, Y. G.; Dreher, T. W.; Rao, A. L. N.2002. tRNA elements mediate the assembly of an icosahedral RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99*, 655–660.

Choi, Y. G.; Rao, A. L. N. 2003. Dispensability of 3' tRNA-like sequence for packaging cowpea chlorotic mottle virus genomic RNAs *J. Virol.77*, 9750–9757.

Clark, A. S.; West, K.; Streicher, S.; Dennis, P. 2002. Constitutive and inducible Akt activity promotes. resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. a. *Mol. Cancer Ther. 1*, 707–717.

Chackerian B, Rangel M, Hunter Z, Peabody DS. 2006. Virus and virus-like particle-based immunogensfor Alzheimer's disease induce antibody responses against amyloid-βwithout concomitant T cell responses. Vaccine 24:6321–31.

Daniel MC, Tsvetkova IB, Quinkert ZT, Murali A, De M, et al. 2010. Role of surface charge density in nanoparticle-templated assembly of bromovirus protein cages. ACS Nano 4:3853–60.

Decuzzi, P.; Godin, B.; Tanaka, T.; Lee, S. Y.; Chiappini, C.; Liu, X.; Ferrari, M. 2010. Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles. *J. Control. Release*. *141*, 320–327.

Destito, G.,Yeh, R.,Rae, C.S.,Finn, M.G.,Manchester, M.,2007. Folicacid mediated targeting of cowpea mosaic virus particles to tumor cells. Chem.Biol. 14, 1152–1162.

De Temmerman ML, Rejman J, Demeester J, Irvine DJ, Gander B, De Smedt SC. 2011. Particulate vaccines: on the quest for optimal delivery and immune response. Drug Discov. Today 16:569–82.

Devi, G. R. 2006. siRNA-based approaches in cancer therapy. 13(9):819-29.

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.

Dixit SK, Goicochea NL, Daniel MC, Murali A, Bronstein L, et al. 2006. Quantum dot encapsulation in viral capsids. Nano Lett. 6:1993–99.

Dongre, A. et al. 2017. Epithelial- to-mesenchymal transition contributes to immunosuppression in breast carcinomas. Cancer Res. 77, 3982–3989.

Douglas T, Strable E, Willits D. 2002. Protein engineering of a viral cage for constrained material synthesis. Adv. Mater. 14:415–18.

Dowdy, S. F. 2017. Overcoming cellular barriers for RNA therapeutics. *Nat. Biotechnol. 35*, 222–229.

Ebenezer T.; Julianne P.; Mitchell T.; David S. P.; Bryce C. 2012. VLPs Displaying a Single L2 Epitope Induce Broadly Cross-Neutralizing Antibodies against Human Papillomavirus. PLoS One. 2012; 7(11), e49751.

Ferrari, M. 2010. Frontiers in cancer nanomedicine: directing mass transport through biological barriers. *Trends Biotechnol. 28*, 181–188.

Flenniken, M. L.; Willits, D. A.; Harmsen, A. L.; Liepold, L. O.; Harmsen, A. G.; Young, M. J.; Douglas, T. 2006. Melanoma and lymphocyte cell-specific targeting incorporated into a heat shock protein cage architecture. *Chem. Biol. 13*, 161–170.

Folb PI,Bernatowska E, Chen R, Clemens J,Dodoo AN, et al. 2004. Aglobal perspective on vaccine safety and public health: the Global Advisory Committee on Vaccine Safety. Am. J. Public Health 94:1926–31.

Franke, T.F. 2008a. Intracellular signaling by Akt: bound to be specific. *Sci Signal* 1(24): pp29.
2008b. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 27(50): 6473-6488.

Franziska, M.; Jan, L.; Ferrari, M.; Jonathan, W. 2008. *Nano*. *6*, 2166–2171.

Freeman, D.J., Li, A.G., Wei, G., Li, H.H., Kertesz, N., Lesche, R., Whale, A.D., Martinez-Diaz, H., Rozengurt, N., Cardiff, R.D. et al. 2003. PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell* 3(2): 117-130.

Fridlender, Z.G.; Sun, J.; Kim, S.; Kapoor, V.; Cheng, G.; Ling, L.; Worthen, G.S.; Albelda, S.M. 2009. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: “N1” versus “N2” TAN. Cancer Cell. 16, 183–194.

Garcea RL, Gissmann L. 2004. Virus-like particles as vaccines and vessels for the delivery of small molecules. Curr. Opin. Biotechnol. 15:513–17.

Geynisman D, Chien CR, Smieliauskas F, Shen C, Tina Shih YC. 2014. Economic evaluation of therapeutic cancer vaccines and immunotherapy: a systematic review. Hum. Vaccines Immunother. 10:3415–24.

Gillitzer, E.; Willits, D.; Young, M.; Douglas, T. 2002. Chemical modification of a viral cage for multivalent presentation. *Chem. Commun. 2*, 2390–2391.

Golias, C.H., Charalabopoulos, A., and Charalabopoulos, K. 2004. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int J Clin Pract* 58(12): 1134-1141.

Gonzales, M.J.,Plummer,E.M.,Rae,C.S.,Manchester,M.J.,2009. Interaction of Cowpea Mosaic Virus(CPMV) nanoparticles with antigen presenting cells in vitro and in vivo. PLoSOne. 4,e7981.

Gottesman, M. M.; Fojo, T.; Bates, S. E. 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer*. *2*, 48–58.

Grgacic EV, Anderson DA. 2006. Virus-like particles: passport to immune recognition. Methods 40:60–65.

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.

Greenwood B, Salisbury D,Hill AV. 2011. Vaccines and global health. Philos. Trans. R. Soc. B 366:2733–42.

Gumbiner, B. M.. 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 6 (8)622–634.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57-70.

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.

Hansen RM., Libnoch JA. 1978. Remission of chronic lymphocytic leukemia after smallpox vaccination. Arch Intern Med. 138: 1137-1138.

Hara, Y.; Wakamori, M.; Ishii, M.; Maeno, E.; Nishida, M.; Yoshida, T.; Yamada, H.; Shimizu, S.; Mori, E.;

Kudoh, J.; et al. 2002. LTRPC2 Ca2+-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. Mol. Cell. 9, 163–173.

Huang X, Bronstein LM, Retrum J,DufortC,Tsvetkova I, et al. 2007. Self-assembled virus-like particles with magnetic cores. Nano Lett. 7:2407–16.

Hui Cai, Chao Wang, Sourabh Shukla, and Nicole F. Steinmetz. 2019. Cowpea Mosaic Virus Immunotherapy Combined with Cyclophosphamide Reduces Breast Cancer Tumor Burden and Inhibits Lung Metastasis. Adv. Sci. 6, 1802281.

Jung, B.; Rao, A. L. N.; Anvari, B. 2011. Optical nano-constructs composed of genome-depleted brome mosaic virus doped with a near infrared chromophore for potential biomedical applications. *ACS Nano*. *5*, 1243–1252.

Kaltgrad E.; O'Reilly M. K.; Liao L.; Han S.; Paulson J. C.; Finn M. G. 2008. On-virus construction of polyvalent glycan ligands for cell-surface receptors. J Am Chem Soc. 130(14):4578-9.

Kalluri, R. & Weinberg, R. A. 2009. The basics of epithelial–mesenchymal transition. J. Clin. Invest. 119, 1420–1428.

Karig G, Spencer JA, Gallagher T. Directed deprotonation-transmetalation as a route to substituted pyridines. Organic Letters 2001;3(6):835-8.

Kelso JM. 2012. Safety of influenza vaccines. Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 12:383–88.

Klem M. T.; Wilits D.; Young M.; Douglas T. 2003. 2-D array formation of genetically engineered viral cages on au surfaces and imaging by atomic force microscopy. J Am Chem Soc. 125(36):10806-7.

Kristopher J. K., Andrzej S. P.; Marianne M.; Nicole F. S. 2015. Virus-Based Nanoparticles as Versatile Nanomachines. *Annu. Rev. Virol*. 2:379–401.

Koudelka, K. J.; Rae, C. S.; Gonzalez, M. J.; Manchester, M. 2007. Interaction between a 54-kilodalton mammalian cell surface protein and cowpea mosaic virus. *J. Virol. 81*, 1632–1640.

Koudelka, K. J.; Destito, G.; Plummer, E. M.; Trauger, S. A.; Siuzdak, G.; Manchester, M. 2009. Endothelial targeting of cowpea mosaic virus (CPMV) via surface vimentin. *PLoS Pathog.5*, 1–10.

Kovacs E. W.; Hooker M.; Romanini D. W.; Holder P. G.; Berry K. E.; Francis M. B. 2007. Dual-surface-modified bacteriophage MS2 as an ideal scaffold for a viral capsid-based drug delivery system. *Bioconjug Chem.* 18(4):1140-7.

Kushnir N, Streatfield SJ, Yusibov V. 2012. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. Vaccine 31:58–83

Lam, P.; Steinmetz, N. F. 2009. Delivery of siRNA therapeutics using cowpea chlorotic mottle virus-like particles. *Biomater. Sci. 7*, 3138–3142.

Lamouille, S., Xu, J., Derynck, R. 2014. Molecular mechanisms of epithelial- mesenchymal transition. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 15, 178–196.

Leleux J, Roy K. 2013. Micro and nanoparticle-based delivery systems for vaccine immunotherapy: an immunological and materials perspective. Adv. Healthc. Mater. 2:72–94.

Lesniak, A.; Salvati, A.; Santos-Martinez, M. J.; Radomski, M. W.; Dawson, K. A.; Aberg, C. 2013. Nanoparticle adhesion to the cell membrane and its effect on nanoparticle uptake efficiency. *J. Am. Chem. Soc. 135*, 1438–1444.

Lewis, J. D.; Destito, G.; Zijlstra, A.; Gonzalez, M. J.; Quigley J.P.,Manchester M. and Stuhlmann H.

Viral nanoparticles as tools for intravital vascular imaging. 2006. *Nat. Med.. 12*, 354–360.

Link, C.; Alexis, F.; Pridgen, E.; Molnar, L. K. 2008. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol. Pharm.5*, 505–515.

Lizotte, P. H.; Wen, A. M.; Sheen, M. R.; Fields, J.; Rojanasopondist, P.; Steinmetz, N. F.; Fiering, S. 2016. In situ vaccination with cowpea mosaic virus nanoparticles suppresses metastatic cancer. *Nat. Nanotechnol. 11*, 295–303.

Lorena Sánchez-Sánchez Rubén D. Cadena-Nava, Laura A. Palomares Jaime Ruiz-Garcia Melissa S.T. Koay Jeroen J.M.T. Cornelissen, Rafael Vazquez-Duhalt. 2014. Chemotherapy pro-drug activation by biocatalytic virus-like nanoparticles containing cytochrome P450. Enzyme and Microbial Technology 14: 76-3.

Ludwig C, Wagner R. 2007. Virus-like particles—universal molecular toolboxes. Curr. Opin. Biotechnol. 18:537–45.

Lunov, O.; Syrovets, T.; Loos, C.; Beil, J.; Delacher, M.; Tron, K.; Nienhaus, G. U.; Musyanovych, A.; Mailänder, V.; Landfester, K. 2011. Differential uptake of functionalized polystyrene nanoparticles by human macrophages and a monocytic cell line. *ACS Nano*. *5*, 1657–1669.

Manchester, M.; Singh, P. 2006. Virus-based nanoparticles (VNPs): platform technologies for diagnostic imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev. 58*, 1505–1522.

Mantovani, A.; Cassatella, M. A.; Costantini, C.; Jaillon, S. 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2011, *11*, 519–531.

Medintz IL, Sapsford KE, Konnert JH, Chatterji A, Lin T, et al. 2005. Decoration of discretely immobilized cowpea mosaic virus with luminescent quantum dots. Langmuir 21:5501–10

Michelle R., L.; Mikako, O.; Peter L., C.; Hisataka, K. 2011. Biologically optimized nano-sized molecules and particles: more than just size. Bioconjug che. 22(6), 993-1000.

Miermont A, Barnhill H, Strable E, Lu X,Wall KA, et al. 2008. Cowpea mosaic virus capsid: a promising carrier for the development of carbohydrate based antitumor vaccines. Chemistry 14:4939–47.

Moghimi, S. M.; Patel, H. M. 1998, Serum-mediated recognition of liposomes by phagocytic cells of the reticuloendothelial system – The concept of tissue specificity. *Adv. Drug Deliv. Rev. 32*, 45–60.

Morris, E.J., Ji, J.Y., Yang, F., Di Stefano, L., Herr, A., Moon, N.S., Kwon, E.J., Haigis, K.M., Naar, A.M., and Dyson, N.J. 2008. E2F1 represses beta-catenin transcription and is antagonized by both pRB and CDK8. *Nature* 455(7212): 552-556.

Muldoon, L. L.; Nilaver, G.; Kroll, R. A.; Pagel, M. A.; Breakefield, X. O.; Chiocca, E. A.; Davidson, B. L.; Weissleder, R.; Neuwelt, E. A. 1995. Comparison of intracerebral inoculation and osmotic blood-brain barrier disruption for delivery of adenovirus, herpes virus, and iron oxide particles to normal rat brain. *Am J Pathol*. *47*, 1840–1851.

Nam, H. Y.; Kwon, S. M.; Chung, H.; Lee, S. Y.; Kwon, S. H.; Jeon, H.; Kim, Y.; Park, J. H.; Kim, J.; Her, S. 2009. Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles. *J. Control. Release*. *135*, 259–267.

Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O. 2011. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. Nat. Rev. Immunol. 11:823–36.

Nemunaitis J. 1999. Oncolytic viruses. New drugs. Invest Viruses 17: 375-386.

Nicole F, S.; Choi-Fong, C.; Amber, A.; Lewis, J. D.; Marianne, M. 2011. Cowpea mosaic virus nanoparticles target surface vimentin on cancer cells. *Nanomedicine (Lond)* 2011, 6, 351–364.

Nieto, M. A. 2009. Epithelial–mesenchymal transitions in development and disease: old views and new perspectives. Int. J. Dev. Biol. 53, 1541–1547.

Nieto, M. A., Huang, R. Y., Jackson, R. A. & Thiery, J. P. EMT: 2016. Cell 166, 21–45 (2016).

Pack GT. 1950. Note of the experimental use of rabies vaccine for melanomatosis. Arch Dermatol Syph. 62: 694-695.

ParmianiG, Russo V, Maccalli C, ParoliniD, Rizzo N, Maio M. 2014. Peptide-based vaccines for cancer therapy. Hum. Vaccines Immunother. 10:3175–78.

Peabody D. S. 2003. A Viral Platform for Chemical Modification and Multivalent Display. J Nanobiotechnology. 1(1)5.

Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R. 2007. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol. 2*, 751–760.

Peinado, H. & Cano, A. 2006. New potential therapeutic targets to combat epithelial tumor invasion. Clin. Transl. Oncol. 8, 851–857.

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. 1 (17), 947–952.

Plummer EM, Manchester M. 2010. Viral nanoparticles and virus-like particles: platforms for contemporary vaccine design. WIRES Nanomed. Nanobiotechnol. 3:174–96

Plummer, E. M.; Manchester, M. 2013. Endocytic uptake pathways utilized by CPMV nanoparticles. *Mol. Pharm. 10*, 26–32.

Rae, C. S.; Wei Khor, I.; Wang, Q.; Destito, G.; Gonzalez, M. J.; Singh, P.; Thomas, D. M.; Estrada, M. N.; Powell, E.; Finn, M. G. 2005. Systemic trafficking of plant virus nanoparticles in mice via the oral route. *Virology*. *343*, 224–235.

Rajput, S.; Puvvada, N.; Kumar, B. N. P.; Sarkar, S.; Konar, S.; Bharti, R.; Dey, G.; Mazumdar, A.; Pathak, A.; Fisher, P. B. 2015. Overcoming Akt Induced Therapeutic Resistance in Breast Cancer through siRNA and Thymoquinone Encapsulated Multilamellar Gold Niosomes. *Mol. Pharm. 12*, 4214–4225.

Ramachadra M., Raham A., Zou A. 2001. Re-engineering adenovirus regulatory pathways to enhance oncolytic specificity and efficacy. Nat Publ group. 19: 1035-1041.

Räty, J. K.; Liimatainen, T.; Wirth, T.; Airenne, K. J.; Ihalainen, T. O.; Huhtala, T.; Hamerlynck, E.; Vihinen-Ranta, M.; Närvänen, A.; Ylä-Herttuala, S. 2006. Magnetic resonance imaging of viral particle biodistribution in vivo. *Gene Ther. 13*, 1440–1446.

Rodell, C.; Arlauckas, S.; Michael, C.; Christipher, G.; Ran, L.; Ahmed, M.; Kohler, R.; Pittet, M.; Ralph, W. 2018. TLR7/8-agonist-loaded nanoparticles promote the polarization of tumour-associated macrophages to enhance cancer immunotherapy. *Nat Biomed Eng. 2*, 578–588.

Rosenberg SA. 2000. The identification of cancer antigens: impact on the development of cancer vaccines. Cancer J. 6(Suppl. 2):S142–49.

Rossig, L., Jadidi, A.S., Urbich, C., Badorff, C., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. 2001. Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Mol Cell Biol* 21(16): 5644-5657.

Ryan SO, Turner MS, Gariepy J, Finn OJ. 2010. Tumor antigen epitopes interpreted by the immune system as self or abnormal-self differentially affect cancer vaccine responses. Cancer Res. 70:5788–96.

Safia Wasi. 2003. RNA: interference the next genetic revolution?. Nature Genet. 33: 396–400.

Sánchez-Sánchez, L.; Cadena-Nava, R. D.; Palomares, L. A.; Ruiz-Garcia, J.; Koay, M. S. T.; Cornelissen, J. J. M. T.; Vazquez-Duhalt, R. 2014. Chemotherapy pro-drug activation by biocatalytic virus-like nanoparticles containing cytochrome P450. *Enzyme Microb. Technol.* 2014, *60*, 24–31.

Santra, M.K., Wajapeyee, N., and Green, M.R. 2009. F-box protein FBXO31 mediates cyclin D1degradation to induce G1 arrest after DNA damage. *Nature* 459(7247): 722-725.

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.

Satelli, A.; Li, S. 2011. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci. 68*, 3033–3046.

Screpanti, V.;Wallin, R.P.; Ljunggren, H.G.; Grandien, A. 2001. A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells. J. Immunol. 167, 2068–2073.

Shaw, A. R.; Suzuki, M. 2019. Immunology of Adenoviral Vectors in Cancer Therapy. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev. 15*, 418–429.

Shibue, T. & Weinberg, R. A. 2017. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. Nat. Rev. Clin. Oncol. 14, 611–629.

Shukla S, Wen AM, Commandeur U, Steinmetz NF. 2014. Presentation of HER2 epitopes using a filamentous plant virus-based vaccination platform. J. Mater. Chem. B 2:6249–58.

Singh, P.; Prasuhn, D.; Yeh, R. M.; Destito, G.; Rae, C. S.; Osborn, K.; Finn, M. G.; Manchester, M. 2007. Bio-distribution, toxicity and pathology of cowpea mosaic virus nanoparticles in vivo. *J. Control. Release*. *120*, 41–50.

Speir, J. A.; Munshi, S.; Wang, G.; Baker, T. S.; Johnson, J. E. 1995. Structures of the native and swollen forms of cowpea chlorotic mottle virus determined by X-ray crystallography and cryo-electron microscopy. *Structure*. *3*, 63–78.

Steinmetz,N.F. 2010. Viral nanoparticles as platforms for next-generation therapeutics and imaging devices. Nanomed. 6:634–641.

Sun, B.; Qin, W.; Song, M.; Liu, L.; Yu, Y.; Qi, X.; Sun, H. Neutrophil Suppresses Tumor Cell Proliferation via Fas/Fas Ligand Pathway Mediated Cell Cycle Arrested. Int. J. Biol. Sci. 2018, 14, 2103–2113.

Sun, J.; DuFort, C.; Daniel, M.-C.; Murali, A.; Chen, C.; Gopinath, K.; Stein, B.; De, M.; Rotello, V. M.; Holzenburg, A. 2007. Core-controlled polymorphism in virus-like particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. 104*, 1354–1359.

Tagliamonte M, Petrizzo A, Tornesello ML, Buonaguro FM, Buonaguro L. 2014. Antigen-specific vaccines for cancer treatment. Hum. Vaccines Immunother. 10:3332–46.

Tatiparti, K.; Sau, S.; Kashaw, S. K.; Iyer, A. K. 2017. siRNA Delivery Strategies: A Comprehensive Review of Recent Developments. *Nanomaterials*. 7(4), 77.

Thiery J. P.; Acloque H.; Huang R. Y.; Nieto M. A. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 139(5):871-90.

Terry, S.; Savagner P.; Ortiz-Cuaran S.; Mahjoubi L.; Saintigny P.; Thiery J. P.; Chouaib S. 2017. New insights into the role of EMT in tumor immune escape. Mol. Oncol. 11, 824–846.

U. Cavallaro and G. Christofori. 2004. Cell adhesion and signaling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. Nature Reviews Cancer. 4 (2) 118–132.

Van Maerken, T., Vandesompele, J., Rihani, A., De Paepe, A., and Speleman, F. 2009. Escape from p53-mediated tumor surveillance in neuroblastoma: switching off the p14(ARF)-MDM2-p53 axis. *Cell Death Differ* 16(12): 1563-1572.

Veronese, F. M.; Pasut, G. 2005. PEGylation, successful approach to drug delivery. *10*, 1451–1458.

Villagrana-escareño, V.; Reynaga-hern, E.; Galicia-cruz, O. G.; Dur, A. L.; Cruz-gonz, V. De; Hern, C. Y.; Ru, J. *2019*. VLPs Derived from the CCMV Plant Virus Can Directly Transfect and Deliver Heterologous Genes for Translation into Mammalian Cells. Biomed Res Int. 2019, 4630891.

Vyas JM, Van der Veen AG, Ploegh HL. 2008. The known unknowns of antigen processing and presentation. Nat. Rev. Immunol. 8:607–18.

Wang, C.; Beiss, V.; Steinmetz, N. F. 2019. Cowpea Mosaic Virus Nanoparticles and Empty Virus-Like Particles Show Distinct but Overlapping Immunostimulatory Properties. *J. Virol. 93*, 1–14.

Wang Q. Lin T. Johnson J. E. Finn M. G. 2002. Natural supramolecular building blocks. Cysteine-added mutants of cowpea mosaic virus. Chem Biol. 9(7):813-9.

Whibley, C., Pharoah, P.D., and Hollstein, M. 2009. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer* 9(2): 95-107.

Whitfield, M.L., George, L.K., Grant, G.D., and Perou, C.M. 2006. Common markers of proliferation. *Nat Rev Cancer* 6(2): 99-106.

Wu M, Brown WL, Stockley PG. 1995. Cell-specific delivery of bacteriophage-encapsidated ricin A chain. Bioconjug. Chem. 6:587–95.

Wu Z., Chen K., Yildiz I., Dirksen A., Fischer R., Dawson P.E., Steinmetz N.F., 2012. Development of viral nanoparticles for efficient intracellular delivery. Nanoscale. 4: 3567–3576.

Xu, R.; Zhang, G.; Mai, J.; Deng, X.; Segura-Ibarra, V.; Wu, S.; Shen, J.; Liu, H.; Hu, Z.; Chen, L. 2016. An injectable nanoparticle generator enhances delivery of cancer therapeutics. *Nat. Biotechnol. 34*, 414–418.

Xu, W.; Atkinsona, V. G.; Menzies, A. M. 2020. Intratumoural immunotherapies in oncology. *European Journal of Cancer*. *127*, 1–11.

Yaddanapudi K, Mitchell RA, Eaton JW. 2013. Cancer vaccines: looking to the future. Oncoimmunology 2:e23403.

Yang J.; Weinberg R. A. 2018. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. Dev Cell. 14(6):818-29.

Yildiz, I.,Shukla, S.,Steinmetz, N.F., 2011. Applications of viral nanoparticles in medicine. Curr.Opin.Biotechnol. 22: 901–908.

Yildiz, I.; Tsvetkova, I.; Wen, A. M.; Shukla, S.; Masarapu, M. H.; Dragnea, B.; Steinmetz, N. F. 2016. Engineering of Brome mosaic virus for biomedical applications. RSC Adv. *2*, 3670–3677.

Yin Z, Nguyen HG, Chowdhury S, Bentley P, Bruckman MA, et al. 2012. Tobacco mosaic virus as a new carrier for tumor associated carbohydrate antigens. Bioconjug. Chem. 23:1694–703.

Young M,Willits D, Uchida M, Douglas T. 2008. Plant viruses as biotemplates for materials and their use in nanotechnology. Annu. Rev. Phytopathol. 46:361–84.

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S.J. 1996. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87(4): 619-628.

Anexos

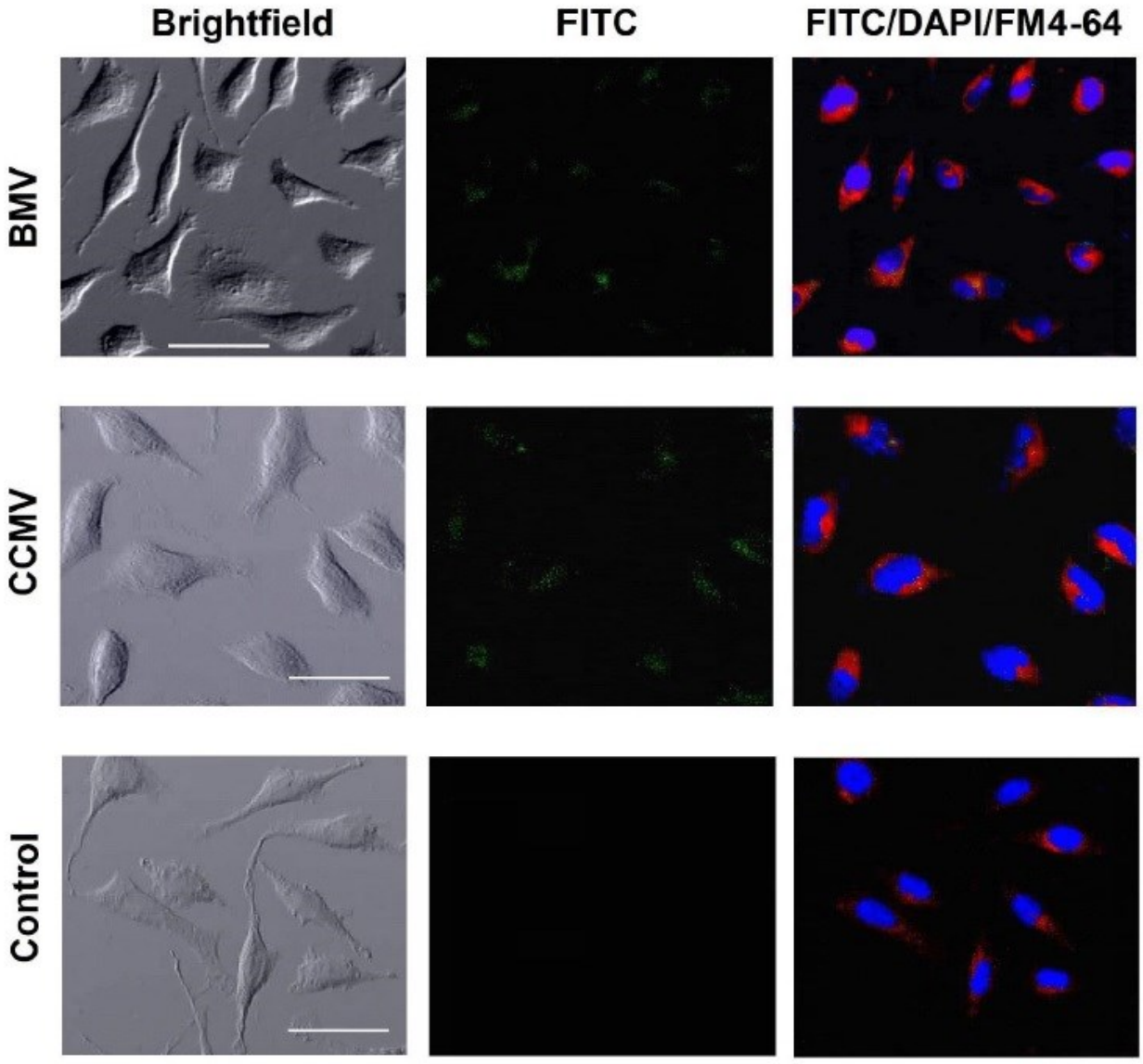


Figura 17. Internalización de CCMV y BMV conjugado con FITC. Las células MCF7 se incubaron con BMV-FITC (canal verde) y CCMV-FITC (canal verde). El núcleo celular se tiñó con DAPI (canal azul) y FM4-64 para la membrana (canal rojo). Se usó una concentración de 1.3 x 10^6 virus / célula. Barra de escala = 50 µm. Ambos virus pueden ser internalizados eficientemente por las células MCF7. Barra de escala = 50 µm.

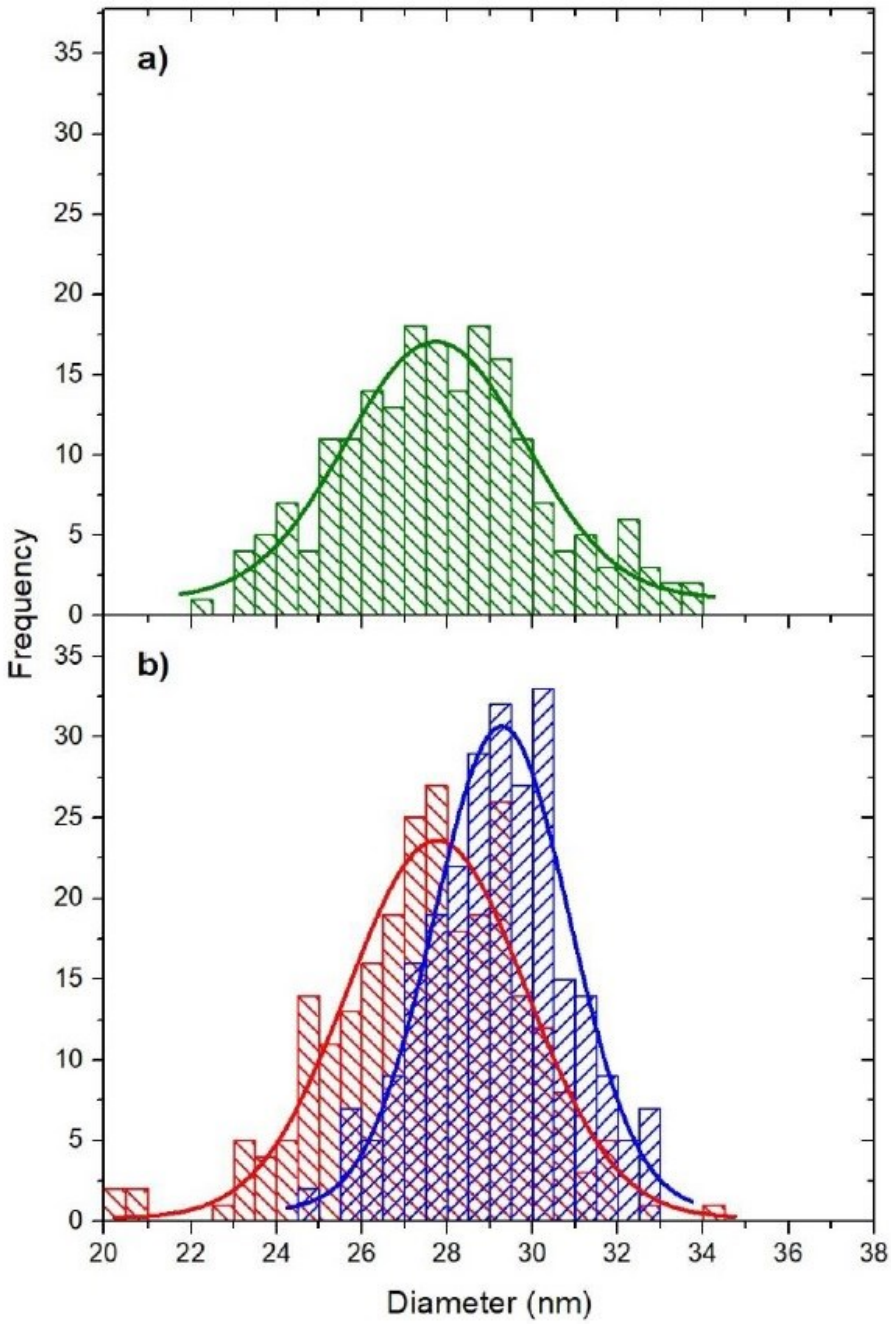


Figura 18. (a) Histograma del diámetro de VLPs de BMV-siGFP ensamblados utilizando una relación de masa 6: 1 (CP: siGFP). La distribución se ha determinado a partir de imágenes de 200 cápsides. (b) Histograma de diámetro de VLP de BMV–siAKT1 utilizando las mismas condiciones de relación de masa (CP a siRNA). La distribución se ha determinado a partir de imágenes de 250 cápsides. Curvas gaussianas de mejor ajuste, centradas en 27.7 (verde), 27.8 (rojo) y 29 nm (azul) para BMV VLP-GFP, VLP-AKT1 y BMV nativo, respectivamente.

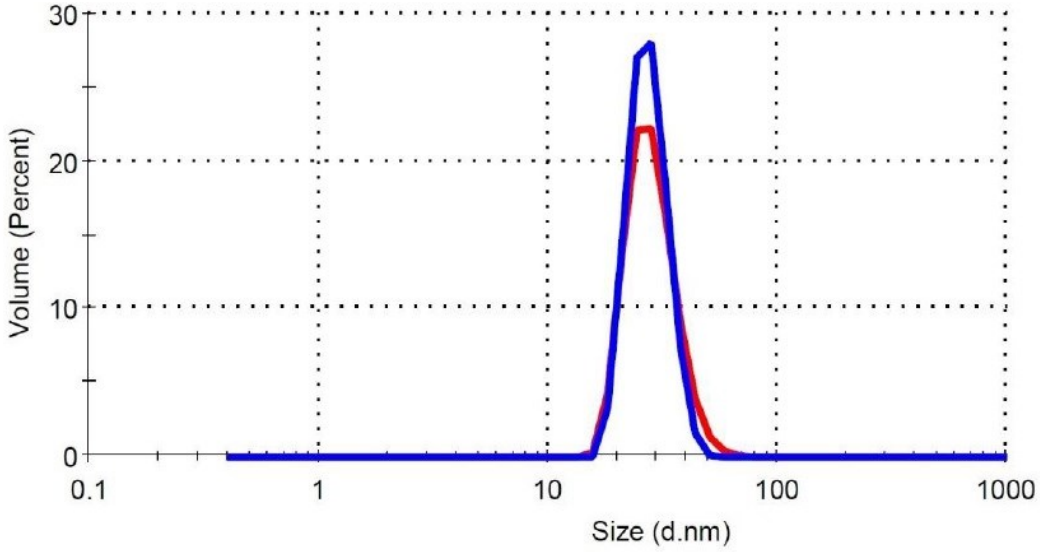


Figura 19. Distribución de volumen de diámetros y tamaños de VLP de BMV – siAKT1 (curva roja) y BMV nativo (curva azul) por DLS. Los histogramas de distribución de volumen y tamaño para VLP y BMV muestran que las nanopartículas tienen aproximadamente el mismo tamaño.

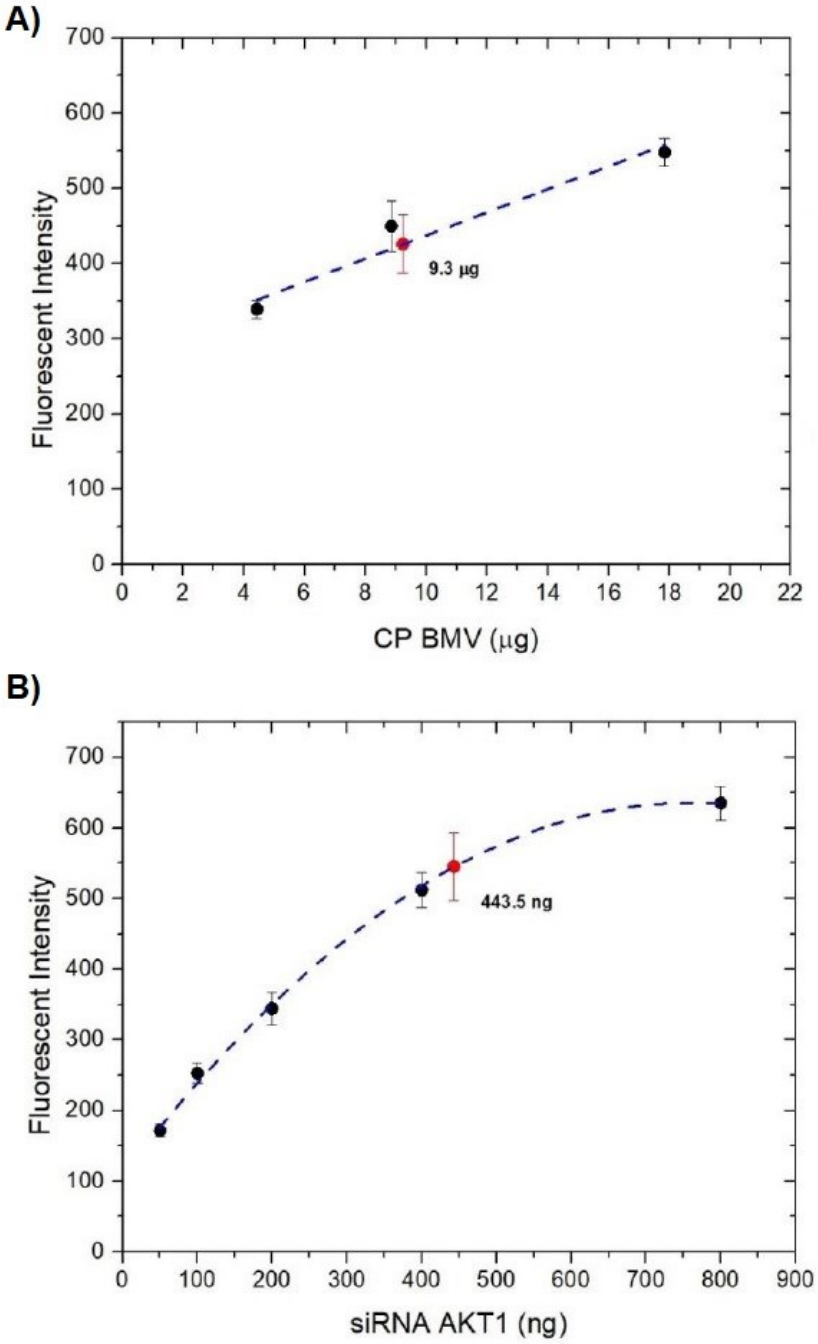
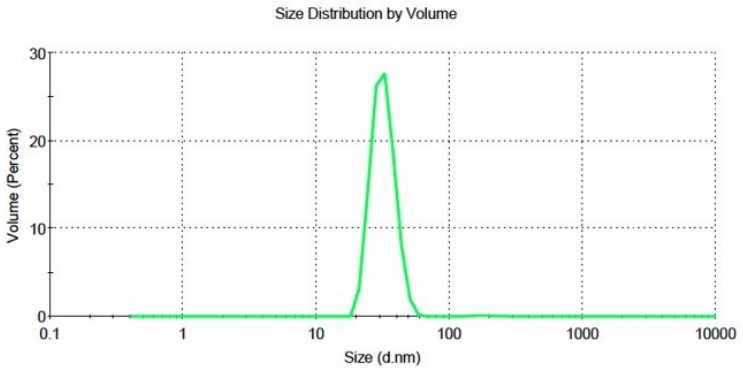


Figura 20. Curvas de calibración por fluorescencia para cuantificar el siRNA y la proteína de cápside de las BMV VLPs-siAKT1. (a) emisión fluorescente de la proteína de la cápside BMV de tres soluciones de proteína de la cápside libre teñida con NanoOrange y 1 µl de VLP purificadas. (b) Emisión fluorescente siAKT1 de cinco soluciones de siRNA libre teñidas usando el kit RNA RiboGreen Quant-iT y 5 µl de VLP purificadas.

A) BMV-Nativo

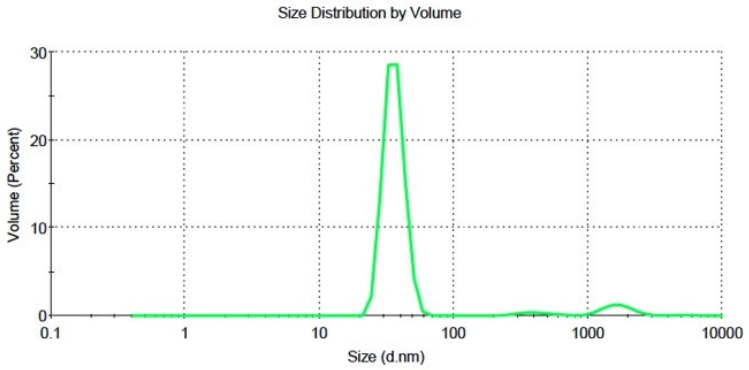


Tamaño: 32 nm ± 6.44

% Volumen: 99.6

Potencial zeta: - 5.16 ± 0.40 mV

B) BMV-sd-133

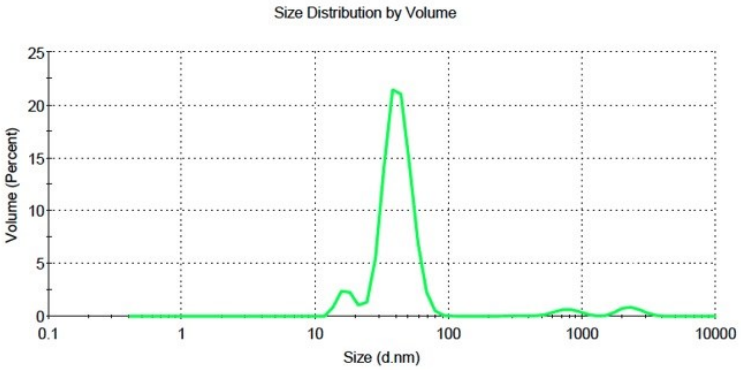


Tamaño: 36.25 nm ± 6.29

% Volumen: 92.5

Potencial zeta: - 11.21 ± 2.28

C) BMV-PEG-sd-133



Tamaño: 42.24 nm ± 10.17

% Volumen: 87.7

Potencial zeta: - 10.24 ± 0.53

Figura 21. Medición de tamaño y carga para las moléculas BMV-sd-133 y BMV-PEG-sd-133. Mediante DLS se caracterizaron las moléculas de BMV funcionalizadas con sd-133. (A) BMV nativo, (B) BMV-sd-133 y (C) BMV-PEG-sd-133.