

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

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



---

**Maestría en Ciencias en Nanociencias**

---

**Nanopartículas virales con capacidad de inhibir la cadherina-  
11 y su potencial uso en el tratamiento de cáncer de mama**

Tesis

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

Presenta:

Martha Mariana Herrera Hernández

Ensenada, Baja California, México  
2023

Tesis defendida por  
**Martha Mariana Herrera Hernández**

y aprobada por el siguiente Comité

---

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

**Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier**

**Dr. Andrés Zárate Romero**



---

**Dra. Catalina López Bastidas**  
Coordinadora del Posgrado en Nanociencias

---

**Dr. Pedro Negrete Regagnon**  
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Martha Mariana Herrera Hernández** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias

**Nanopartículas virales con capacidad de inhibir la cadherina-11 y su potencial uso en el tratamiento de cáncer de mama**

Resumen aprobado por:

---

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

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres. La metástasis es un factor que incrementa la tasa de mortalidad, por lo cual la búsqueda de terapias para evitarla es de vital importancia. Se ha encontrado que existen proteínas que juegan un papel muy importante en los procesos de proliferación y metástasis de células cancerosas, por ejemplo, la cadherina-11 (CDH11), que se sobreexpresa en células altamente invasivas. Por lo cual, en este proyecto se propuso bloquear el ectodominio 1 (EC1) de la CDH11 para disminuir o suprimir la proliferación de células cancerosas y la metástasis. Se consideraron dos estrategias: la primera utilizando el farmacóforo hidrofóbico SD133\* y, la segunda a través de nanoanticuerpos (Nb o VHH) anti-CDH11. Considerando que la molécula SD133\* es muy pequeña, es necesario tener nanopartículas que la contengan para evitar que sean eliminadas rápidamente del organismo. Para llevar a cabo tal objetivo se obtuvieron nanopartículas virales (VNPs) del virus del mosaico del bromo (BMV) y virus del moteado clorótico del caupí (CCMV) funcionalizadas con la molécula SD133\* y con PEG-SD133\*. Las VNPs anti-CDH11 se evaluaron in vitro a través de ensayos de herida y se demostró que las partículas de BMV-PEG-SD133\* retrasaron 8 y 12 h la migración de la línea celular de cáncer invasivo humano MDA-MB-231 y de ratón 4T1, respectivamente. Además, las mismas VNPs tuvieron un efecto negativo en el crecimiento de las células tumorales 4T1 en modelo murino, al reducir un 23% el volumen y un 20% el peso de los tumores. Para la obtención de Nbs anti-CDH11 se purificaron los plásmidos que contenían la secuencia codificante del dominio VHH. Se estandarizó el protocolo de expresión de Nbs utilizando el sistema pComb3XSS-TOP10F', así como el protocolo de extracción de la proteína periplásmica y de purificación a través de cromatografía de exclusión molecular (SEC), con un rendimiento de aproximadamente 17 mg/L de cultivo inducido. Finalmente, se comprobó que el Nb anti-CDH11 purificado fue capaz de unirse al EC1-CDH11. Las dos estrategias anti-CDH11 evaluadas, arrojaron resultados prometedores por lo cual es importante continuar con el desarrollo de éstas.

**Palabras clave:** Cadherina-11, Farmacóforo, SD133\*, Nanoanticuerpo, Nanopartículas virales

Abstract of the thesis presented by Martha Mariana Herrera Hernandez as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience.

### **Viral nanoparticles to block cadherin-11 and its potential use against breast cancer**

Abstract approved by:

---

Rubén Darío Cadena Nava PhD  
**Thesis Director**

Breast cancer is the main cause of cancer associated death in women. Metastasis is a factor that increases the mortality rate, thus the search for therapies to prevent it is of vital importance. It has been found that there are proteins that play a fundamental role in the processes of proliferation and metastasis of cancer cells, for example, cadherin-11 (CDH11), which is overexpressed in highly invasive cells. Therefore, in this project we proposed to block ectodomain 1 (EC1) of CDH11 to decrease or suppress cancer cell proliferation and metastasis. Two strategies were considered: the first using the hydrophobic pharmacophore SD133\* and, the second through anti-CDH11 nanobodies (Nb). It's important to note that SD133\* molecule needs to be bound to a nanoparticle to prevent it from being rapidly eliminated from the body because of its small size. To achieve this objective, viral nanoparticles (VNPs) of brome mosaic virus (BMV) and cowpea chlorotic mottle virus (CCMV) functionalized with the SD133\* molecule and with PEG-SD133\* were obtained. The anti-CDH11 VNPs were evaluated in vitro through wound assays, and it was shown that BMV-PEG-SD133\* particles delayed 8 and 12 h the migration of human invasive cancer cell line MDA-MB-231 and mouse 4T1, respectively. Furthermore, the same VNPs had a negative effect on the growth of 4T1 tumor cells in mouse model by reducing tumor volume by 23% and tumor weight by 20%. To obtain anti-CDH11 Nbs, plasmids containing the coding sequence of the VHH domain were purified. The protocol for Nbs expression using the pComb3XSS-TOP10F' system was standardized, as well as the protocol for periplasmic protein extraction and purification through molecular exclusion chromatography (SEC), with a yield of approximately 17 mg/L of induced culture. Finally, the purified anti-CDH11 Nb was found to be able to bind EC1-CDH11. Both anti-CDH11 strategies evaluated showed promising results, therefore it is important to continue their development.

**Keywords:** cadherin-11, pharmacophore, SD133\*, nanobodies, viral nanoparticles

## Dedicatoria

*Para mi abuela.*

## Agradecimientos

Extiendo mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la dedicación de tiempo completo a la realización de mi posgrado. Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y al Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN-UNAM), por admitirme en el posgrado y permitirme el uso de sus instalaciones. Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) proyecto IT101822 *Partículas tipo virus contra el cáncer de mama*, por el financiamiento para esta investigación.

A mi asesor de tesis el Dr. Rubén Cadena, por haberme hecho parte en su equipo de trabajo, por haberme guiado paso a paso, por sus enseñanzas, tiempo, dedicación, por su confianza en mí y en la culminación exitosa de este proyecto.

A los miembros de mi comité de tesis el Dr. Andrés Zarate y el Dr. Pierrick Fournier quienes no solo revisaron mis avances, si no que con gran disposición y amabilidad estuvieron apoyándome en el trabajo de laboratorio, brindándome sus conocimientos y experiencia y velando por el cumplimiento de mis objetivos.

A la Dra. Kanchan Chauhan quién me proporcionó el farmacóforo SD133\* y me instruyó en las reacciones de funcionalización para la obtención de las VNPs y a la Dra. Ana Rodríguez, quién me capacitó en el manejo de cultivos celulares y me ayudó en el montaje de mis ensayos con la mayor disponibilidad, claridad y paciencia.

Al Departamento de Bionanotecnología que me proporcionó un espacio de trabajo, así como a su técnico la M.A. Itandehui Betanzo quien me facilitó el material necesario para mis experimentos. También, al Departamento de Innovación Biomédica donde realicé mis ensayos con ratones y por la instrucción y apoyo prestado a su técnico la M.C. Samanta Jiménez.

A la Dra. Gabriela Guzmán Navarro del Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada (LNMA-CICESE), por su ayuda para el análisis de muestras por TEM. Al Dr. Raúl García por su instrucción en el laboratorio y ayuda en el análisis de mis resultados, así como por sus consejos y amistad.

A mi compañera en el grupo de investigación y amiga Elizabeth Loredó, con quien compartí metas, logros y muchas horas de trabajo, momentos buenos y difíciles, tanto en lo académico como en lo

personal. A mi compañero de laboratorio David Morales, quién además de ayudarme a realizar experimentos me brindó su amistad. A mis compañeros de laboratorio y amigos Carlos Medrano y Karen Méndez, gracias por sus consejos, ayuda y todos los buenos momentos. A los mejores amigos Ale, Oscar y Anel, de quienes siempre he recibido cariño, comprensión, motivación y soporte. Gracias por escucharme.

Finalmente, a mi madre, hermano y mis tías, quienes siempre me han dado todo lo que está en sus manos para que cumpla mis sueños sin importar cuáles y que tan difíciles sean.



# Tabla de contenido

|                                                                                  | Página        |
|----------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Resumen en español.....                                                          | ii            |
| Resumen en inglés.....                                                           | iii           |
| Dedicatoria .....                                                                | iv            |
| Agradecimientos.....                                                             | v             |
| Lista de figuras.....                                                            | x             |
| Lista de tablas .....                                                            | xiii          |
| <br><b>Capítulo 1. Introducción .....</b>                                        | <br><b>1</b>  |
| 1.1 Antecedentes .....                                                           | 5             |
| 1.1.1 Sobreexpresión de cadherina-11 y su relación con neoplasias malignas ..... | 5             |
| 1.1.2 Farmacóforo SD133.....                                                     | 8             |
| 1.1.3 Inmunoterapia dirigida a cadherina-11.....                                 | 11            |
| 1.1.3.1 Nanoanticuerpos dirigidos a tumores.....                                 | 13            |
| 1.1.4 Nanopartículas virales bioconjugadas.....                                  | 16            |
| 1.2 Hipótesis.....                                                               | 19            |
| 1.3 Objetivos .....                                                              | 19            |
| 1.3.1 Objetivo general.....                                                      | 19            |
| 1.3.2 Objetivos específicos.....                                                 | 19            |
| <br><b>Capítulo 2. Metodología.....</b>                                          | <br><b>20</b> |
| 2.1 Producción, extracción y purificación de BMV y CCMV .....                    | 20            |
| 2.2 Bioconjugación de las partículas virales con SD133* .....                    | 21            |
| 2.2.1 Bioconjugación directa de SD133* .....                                     | 21            |
| 2.2.2 Bioconjugación con ligando .....                                           | 22            |

|         |                                                                                             |    |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.3   | Caracterización de las partículas virales conjugadas con SD133* .....                       | 22 |
| 2.2.3.1 | Determinación del diámetro hidrodinámico y potencial Z .....                                | 22 |
| 2.2.3.2 | Microscopia electrónica de transmisión .....                                                | 23 |
| 2.2.4   | Ensayos <i>in vitro</i> .....                                                               | 23 |
| 2.2.4.1 | Cultivo celular.....                                                                        | 23 |
| 2.2.4.2 | Ensayo de herida .....                                                                      | 24 |
| 2.2.5   | Ensayos <i>in vivo</i> .....                                                                | 24 |
| 2.2.5.1 | Manejo y cuidado de ratones.....                                                            | 24 |
| 2.2.5.2 | Cultivo de células 4T1 para la inoculación .....                                            | 25 |
| 2.2.5.3 | Formación de tumores primarios de cáncer de mama en ratones.....                            | 25 |
| 2.2.5.4 | Administración peri-tumoral de los tratamientos .....                                       | 25 |
| 2.2.5.5 | Eutanasia de los ratones y disección de los tumores primarios .....                         | 26 |
| 2.3     | Análisis estadístico .....                                                                  | 26 |
| 2.4     | Obtención del Nanoanticuerpo anti-CDH11 .....                                               | 26 |
| 2.4.1   | Cultivo de las transformantes 5αF' .....                                                    | 26 |
| 2.4.2   | PCR de colonias 5αF' .....                                                                  | 27 |
| 2.4.3   | Purificación y PCR del ADN plasmídico .....                                                 | 28 |
| 2.4.4   | Transformación en células electrocompetentes TOP10F' .....                                  | 29 |
| 2.4.5   | Estandarización del protocolo de expresión del dominio VHH.....                             | 30 |
| 2.4.6   | Estandarización del protocolo de extracción de proteínas del espacio periplásmico .....     | 30 |
| 2.4.7   | Selección del protocolo de purificación del Nb.....                                         | 31 |
| 2.4.7.1 | Cromatografía por afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC) .....                     | 31 |
| 2.4.7.2 | Precipitación con sulfato de amonio [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]..... | 32 |
| 2.4.7.3 | Cromatografía de exclusión molecular (SEC) .....                                            | 32 |
| 2.4.8   | Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) .....                                   | 33 |

|                                                                                            |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Capítulo 3. Resultados .....</b>                                                        | <b>34</b> |
| 3.1 Caracterización de las VNPs conjugadas con Sd-133* .....                               | 34        |
| 3.1.1 Diámetro hidrodinámico y potencial Z.....                                            | 34        |
| 3.1.2 Tamaño promedio de las VNPs .....                                                    | 36        |
| 3.2 Evaluación de las VNPs bioconjugadas en cultivos celulares de MDA-MB-231 y 4T1 .....   | 42        |
| 3.3 Evaluación las VNPs biocojugadas en un modelo murino de cáncer de mama .....           | 52        |
| 3.4 Amplificación y secuenciación de los fragmentos VHH .....                              | 54        |
| 3.5 Expresión del fragmento VHH y extracción de la proteína del espacio periplásmico. .... | 57        |
| 3.6 Purificación del NbD4.....                                                             | 59        |
| 3.7 Identificación del NbD4 a través de ELISA.....                                         | 62        |
| <br><b>Capítulo 4. Discusión.....</b>                                                      | <b>63</b> |
| 4.1 VNPs bioconjugadas con SD133* .....                                                    | 63        |
| 4.2 Obtención del Nb anti-CDH11 .....                                                      | 68        |
| <br><b>Capítulo 5. Conclusiones .....</b>                                                  | <b>73</b> |
| <br><b>Literatura citada .....</b>                                                         | <b>75</b> |
| <br><b>Anexos .....</b>                                                                    | <b>82</b> |

## Lista de figuras

### Figura

### Página

1. Esquema de la cadeherina-11 (CDH11).....6
2. Homodímero EC1-EC1 de CDH11: (A) Residuos de triptófano (W2 y W4) de los dominios EC1 que forman el dímero; (B) bolsillo de W; (C) residuos de las cadenas laterales al bolsillo de W. Cada monómero tiene los mismos residuos: Fenilalanina de color azul (F7 y F92), Leucina de color naranja (L24), Serina de color verde (S26), Tirosina de color rojo (Y37), Alanina de color rosa (A75 y A77), Acido glutámico de color amarillo (E87); (D) vista lateral y superior del Homodímero, con los residuos marcados con diferentes colores y las regiones P1 y P2 circuladas en rojo. ....9
3. Ruta de síntesis química del farmacóforo SD133.....9
4. Ruta para la modificación química de SD133 y obtención de SD133\* ..... 10
5. Representación esquemática de diferentes formatos de anticuerpos: (A) Anticuerpo convencional (Ab) consiste en dos cadenas ligeras (L) y dos cadenas pesadas (H); (B) Anticuerpo de cadena pesada (HCAb) formado por dos cadenas pesadas idénticas; (C) Fragmento de unión al antígeno (Fab); (D) Fragmento variable de una sola cadena (scFv); (E) Anticuerpo de dominio único (sdAb) o dominio VHH, llamado también nanoanticuerpo (Nb). .... 12
6. Flujo de trabajo para la generación y obtención de Nbs; modificado de (Pardon et al., 2014). ..... 15
7. Esquema de las relaciones molares utilizadas para calcular las cantidades de reactivos y de la molécula SD133\* que se añadieron en las reacciones de funcionalización. .... 21
8. Micrografías de las partículas de BMV conjugadas con SD133\* obtenidas por TEM: (A) BMV control; (B) BMV-2 SD133\*, (C) BMV-4 SD133\* y D) BMV-6 SD133\*. Las gráficas de distribución de tamaño se muestran en la esquina inferior izquierda de cada micrografía. Barras de escala de 100 nm..... 37
9. Micrografías de las partículas de BMV PEGiladas y conjugadas con SD133\* obtenidas por TEM: A) BMV control; B) BMV-PEG-2 SD133\*; C) BMV-PEG-4 SD133\* y D) BMV-PEG-6 SD133\*. Las gráficas de distribución de tamaño se muestran en la esquina inferior izquierda de cada micrografía. Barras de escala de 100 nm ..... 39
10. Micrografías de las partículas de CCMV conjugadas con SD133\* obtenidas por TEM: A) CCMV control; B) CCMV-2 SD133\*; C) CCMV-4 SD133\* y D) CCMV-6 SD133\*. Las gráficas de distribución de tamaño se muestran en la esquina inferior izquierda de cada micrografía. Barras de escala de 100 nm. .... 40
11. Micrografías de las partículas de CCMV PEGiladas y conjugadas con SD133\* obtenidas por TEM: A) CCMV control; B) CCMV-2 SD133\*; C) CCMV-4 SD133\* y D) CCMV-6 SD133\*. Las gráficas de distribución de tamaño se muestran en la esquina inferior izquierda de cada micrografía. Barras de escala de 100 nm. .... 41

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 12. Heridas realizadas en la línea celular MDA-MB-231 a las 0, 12 y 24 horas de ensayo; control, tratadas con BMV, BMV-SD133* y BMV-PEG-SD133* .....                                                                                                                                                                                                                                     | 44 |
| 13. Heridas realizadas en la línea celular MDA-MB-231 a las 0, 12 y 24 horas de ensayo; control, tratadas con CCMV, CCMV-SD133* y CCMV-PEG-SD133* .....                                                                                                                                                                                                                                  | 45 |
| 14. Heridas realizadas en la línea celular MDA-MB-231 a las 0, 12 y 24 horas de ensayo; control, tratadas con SD133* 5 $\mu$ M, SD133* 10 $\mu$ M y DMSO. ....                                                                                                                                                                                                                           | 46 |
| 15. Porcentaje de cierre de herida en MDA-MB-231 con ajuste polinomial: reducción del área de herida a través del tiempo de las células control y tratadas con SD133* 10 $\mu$ M en comparación con (A) las tratadas con BMV nativo, BMV-SD133* y BMV-PEG-SD133*; (B) tratadas con CCMV nativo, CCMV-SD133* y CCMV-PEG-SD133*; (C) tratadas con SD133* 5 $\mu$ M y control de DMSO. .... | 47 |
| 16. Heridas realizadas en la línea celular 4T1 a las 0, 12 y 24 horas de ensayo; control, tratadas con BMV, BMV-SD133* y BMV-PEG-SD133* .....                                                                                                                                                                                                                                            | 48 |
| 17. Heridas realizadas en la línea celular 4T1 a las 0, 12 y 24 horas de ensayo; control, tratadas con CCMV, CCMV-SD133* y CCM-PEG-SD133* .....                                                                                                                                                                                                                                          | 49 |
| 18. Heridas realizadas en la línea celular 4T1 a las 0, 12 y 24 horas de ensayo; control, tratadas con SD133* 5 $\mu$ M, SD133* 10 $\mu$ M y DMSO .....                                                                                                                                                                                                                                  | 50 |
| 19. Porcentaje de cierre de herida en 4T1 con ajuste polinomial: reducción del área de herida a través del tiempo de las células control y tratadas con SD133* 10 $\mu$ M en comparación con (A) las tratadas con BMV nativo, BMV-SD133* y BMV-PEG-SD133*; (B) tratadas con CCMV nativo, CCMV-SD133* y CCMV-PEG-SD133*; (C) tratadas con SD133* 5 $\mu$ M y control de DMSO.....         | 51 |
| 20. Monitoreo del peso de los ratones: (A) pesos promedios de los ratones por cada grupo ( $\pm$ EEM); (B) porcentaje promedio de cambio en el peso de los ratones ( $\pm$ EEM). EEM: Error estándar de la media. ....                                                                                                                                                                   | 52 |
| 21. Cambio en el volumen de los tumores: (A) volúmenes promedio de cada grupo ( $\pm$ EEM); (B) acercamiento a los promedios del día 25. Se realizó un ANOVA de dos vías con método de Dunnett (valor $p \leq 0.05$ indica significancia estadística). EEM: Error estándar de la media....                                                                                               | 53 |
| 22. Tumores izquierdos extirpados: (A) peso de los tumores de cada grupo; (B) imágenes de los tumores izquierdos de cada. Se realizó un ANOVA de una vía con método de Dunnett (valor $p \leq 0.05$ indica significancia estadística). ....                                                                                                                                              | 54 |
| 23. Geles de agarosa (1%): amplificación de los fragmentos VHH; (A) del primer grupo de transformantes 5 $\alpha$ F'; (B) del segundo grupo de transformantes 5 $\alpha$ F'; (C) tercer grupo de transformantes 5 $\alpha$ F' elegidas al azar. ....                                                                                                                                     | 55 |
| 24. Geles de agarosa (1%): amplificación del fragmento VHH a partir de los ADN plasmídicos purificados; (A) de las primeras 8 colonias; (B) últimas dos colonias positivas. ....                                                                                                                                                                                                         | 56 |
| 25. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS al 15%: proteínas celulares (Cels.) de diferentes transformantes; (A) con el ADN A (A1 - A3) y ADN B (B1 – B3); (B) con el ADN C (C1 - C4) y ADN D (D1 - D4). Los controles corresponden a las colonias no inducidas.....                                                                                                                | 57 |

26. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS al 15%: proteínas en extracto periplásmico (Ex. P.) de diferentes colonias con el ADN C (C1 - C4) y ADN D (D1 - D4). ..... 58
27. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS al 15%: proteínas celulares (Cels.) y de extracto periplásmico (Ex. P.) a diferentes horas de incubación en hielo (H núm. horas) o en ciclos de congelamiento-descongelamiento (C núm. de horas); (A) transformantes C1; (B) transformantes D4. .... 59
28. Electroforesis en gel de poliacrilamida 15%-SDS: (A) cromatografía de afinidad a níquel; (B) precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . .... 60
29. Cromatograma de la purificación por cromatografía de exclusión molecular: (A) El cromatograma completo muestra un pico a los 150 min que concuerda con la elución de proteínas menores a 30 kDa; (B) Acercamiento al pico de interés, donde se señalan en rojo el número de las fracciones que le corresponden. .... 61
30. Electroforesis en gel de poliacrilamida 15%-SD: cromatografía de exclusión molecular; fracciones (F. núm. de fracción). Encerradas con rojo las bandas de la proteína NbD4. .... 61
31. Espectros de emisión promedio de quimioluminiscencia (el área sombreada representa las barras de  $\pm\text{EEM}$ ). prueba de ELISA; control positivo: pozo con HRP-anti-HA.11; control negativo: pozo bloqueado con BSA. EEM: Error estándar de la media. .... 62

## Lista de tablas

| Tabla                                                                                                             | Página |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. Mezcla de componentes para realizar la PCR de colonia.....                                                     | 27     |
| 2. Condiciones del termociclador para el PCR de colonia.....                                                      | 28     |
| 3. Mezcla de componentes para realizar la PCR de los ADN plasmídicos purificados.....                             | 28     |
| 4. Diámetro hidrodinámico y potencial Z de las partículas de BMV-SD133* .....                                     | 34     |
| 5. Pruebas simultáneas de Dunnett para la media del diámetro hidrodinámico y potencial Z de las BMV-SD133* .....  | 34     |
| 6. Diámetro hidrodinámico y potencial Z de las partículas de BMV-PEG-SD133* .....                                 | 35     |
| 7. Pruebas simultáneas de Dunnett para la media del diámetro hidrodinámico y potencial Z de BMV-PEG-SD133* .....  | 35     |
| 8. Diámetro hidrodinámico y potencial Z de las partículas de CCMV-SD133* .....                                    | 35     |
| 9. Pruebas simultáneas de Dunnett para la media del diámetro hidrodinámico y potencial Z de CCMV-SD133* .....     | 36     |
| 10. Diámetro hidrodinámico y potencial Z de las partículas de CCMV-PEG-SD133* .....                               | 36     |
| 11. Pruebas simultáneas de Dunnett para la media del diámetro hidrodinámico y potencial Z de BMV-PEG-SD133* ..... | 36     |
| 12. Tamaño de las BMV-SD133* .....                                                                                | 38     |
| 13. Pruebas simultáneas de Dunnett para la media de tamaño de BMV-SD133* .....                                    | 38     |
| 14. Tamaño de las BMV-PEG-SD133* .....                                                                            | 38     |
| 15. Pruebas simultáneas de Dunnett para la media del tamaño de BMV PEG-SD133* .....                               | 39     |
| 16. Tamaño de las CCMV-SD133* .....                                                                               | 40     |
| 17. Pruebas simultáneas de Dunnett para la media del tamaño de CCMV-SD133* .....                                  | 40     |
| 18. Tamaño de las CCMV-PEG-SD133* .....                                                                           | 41     |
| 19. Pruebas simultáneas de Dunnett para la media del tamaño de CCMV-PEG-SD133* .....                              | 42     |
| 20. Resultados de alineación de segmentos de ADN plasmídicos con secuencias de Nbs de camélidos. ....             | 57     |
| 21. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen VHH.....                                            | 82     |

22. Ecuaciones y coeficientes de determinación ( $R^2$ ) del ajuste polinomial aplicado a los datos de cada tratamiento en células MDA-MB-231..... 84
23. Ecuaciones y coeficientes de determinación ( $R^2$ ) del ajuste polinomial aplicado a los datos de cada tratamiento en células 4T1..... 84



## Capítulo 1. Introducción

---

La nanomedicina se puede definir como la nanotecnología aplicada a la medicina para el desarrollo de nuevos fármacos y/o estrategias terapéuticas (Tran et al., 2017). En particular, los avances de la nanotecnología en inmunoterapia están impulsando la próxima generación de tratamientos contra el cáncer (Charmsaz et al., 2018). En este proyecto se investiga un tratamiento de este tipo.

Por otra parte, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, con 10 millones de fallecimientos registrados en 2020. Además, se prevé que tanto la incidencia como la mortalidad aumenten en más del 50% durante las siguientes 2 décadas (OMS, 2021).

De acuerdo con la incidencia mundial de todos los tipos de cáncer en el 2020, el cáncer de mama es el más común con 2.26 millones de casos. También, es una de las principales causales de muerte debido al cáncer, con alrededor de 685 mil defunciones. En México, el cáncer de mama se mantiene como la principal causa de morbilidad y mortalidad hospitalaria por tumores malignos en las mujeres a partir de los 20 años (OMS, 2021; INEGI, 2021).

Las terapias convencionales, como la cirugía, la quimioterapia, hormonoterapia y radioterapia, siguen siendo un pilar del tratamiento contra el cáncer, siendo posible eliminar casi la totalidad de los tumores sólidos primarios (Charmsaz et al., 2018; Román, 1999). Particularmente, el tratamiento del cáncer de mama puede ser sumamente eficaz, con probabilidades de supervivencia del 90% o más alta, dependiendo de la detección temprana (OMS, 2021). Por lo tanto, el pronóstico de los pacientes queda condicionado a la existencia o no de metástasis, ya que esta es la principal causa de muerte por cáncer (OMS, 2021; Román, 1999).

A pesar de que la incidencia del cáncer de mama es similar en países desarrollados y en desarrollo, la mayoría de las muertes se dan en países de bajos ingresos, en donde el diagnóstico se realiza en etapas muy avanzadas de la enfermedad (INEGI, 2014; OMS, 2021). Aunque una estrategia importante, es la educación de la población para la detección temprana, es notable la necesidad de nuevas estrategias terapéuticas, pues la mayoría de los tratamientos existentes no son lo suficientemente efectivos para brindar una protección completa contra esta enfermedad (Chakraborty y Rahman, 2012).

Los tratamientos anticancerígenos actuales no son específicos al tejido tumoral, ya que también pueden dañar el tejido normal (Tran et al., 2017). Aunque existe una gran cantidad de fármacos quimioterapéuticos, estos se caracterizan por ser tóxicos para todas las células, por lo tanto, la administración de estos agentes también ocasiona la muerte de células sanas, lo que puede provocar efectos secundarios graves y, en ocasiones, puede causar la muerte de los pacientes. Así también, la radioterapia no dirigida padece de una falta de especificidad similar. Por lo tanto, la finalidad de los nuevos tratamientos es matar selectivamente las células cancerosas mientras se reducen los efectos colaterales en el organismo (Chakraborty y Rahman, 2012).

Hanahan y Weinberg (2000), describieron un conjunto de características distintivas del cáncer, compartidas por la mayoría de las células tumorales. Estas características de identidad incluyen el mantenimiento de la señalización proliferativa, evasión de los factores supresores del crecimiento, activación de invasión y metástasis, habilitación la inmortalidad replicativa, inducción de la angiogénesis y resistencia a la muerte celular. Posteriormente, en el año 2011 se agregaron dos rasgos distintivos; la reprogramación del metabolismo energético y la evasión de la destrucción inmunológica. Además, se incorporó el concepto de “características habilitadoras” las cuales representan los mecanismos celulares y moleculares mediante los cuales se adquieren las ocho características distintivas. Las primeras características habilitadoras fueron la inestabilidad del genoma y la inflamación promotora de tumores (Hanahan y Weinberg, 2011). Recientemente, Hanahan propuso dos nuevas características distintivas; el desbloqueo de la plasticidad fenotípica y las células senescentes, y dos nuevos rasgos habilitadores; la reprogramación epigenética no mutacional y los microbiomas polimórficos (Hanahan, 2022). Un conocimiento profundo de estos complejos fenómenos es de fundamental importancia para diseñar terapias precisas y eficientes (Pucci et al., 2019).

La metástasis, singularmente, plantea un gran problema en el tratamiento del cáncer, pues además de tratarse de neoplasias sumamente agresivas, implica que el tratamiento no solo debe dirigirse hacia el foco primario, sino que también, debe eliminarlo de los sitios secundarios (Chakraborty y Rahman, 2012). En 2000, los mecanismos subyacentes a la invasión y la metástasis eran en gran medida desconocidos (Hanahan y Weinberg, 2011). Estaba claro que a medida que los carcinomas que surgen de los tejidos epiteliales progresaban hacia grados patológicos más altos de malignidad, reflejados en invasión local y metástasis a distancia. Las células cancerosas asociadas típicamente desarrollaban alteraciones en su forma, así como en su unión a otras células y a la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) (Hanahan y Weinberg, 2011). La caracterización de tales alteraciones ha demostrado su relación con la desregulación de las cadherinas (CDHs), proteínas transmembranales de adhesión celular.

En este sentido, se ha comprobado que la expresión alterada de CDHs juega un papel vital en los procesos de metástasis, tumorigénesis, la angiogénesis y la respuesta inmune del tumor. Por ello, ahora se les considera posibles objetivos para las terapias contra el cáncer (Yu et al., 2019).

Los cánceres derivados del epitelio a menudo exhiben cambios morfológicos y moleculares característicos de una transición epitelial-mesenquimal (EMT, por sus siglas en inglés) y los marcadores EMT se encuentran predominantemente en tumores con un fenotipo similar al basal. Las líneas celulares de cáncer de mama de linaje basal están poco diferenciadas, presentan una morfología mesenquimatosa y, con frecuencia, son muy agresivas e invasivas. En este contexto, el aumento de la expresión de las cadherinas mesenquimales, neuronal N-cadherina (CDH3) y/o cadherina-11 (CDH11), y la disminución de la epitelial E-cadherina (CDH1) se han asociado tanto con la EMT como con la progresión tumoral (Assefnia et al., 2014).

La CDH11, también conocida como cadherina osteoblástica (OB-cadherina), se identificó por primera vez en osteoblastos de ratón, células formadoras de hueso, y se expresa más comúnmente, a través de etapas tempranas de diferenciación, de este tipo de células, en humanos adultos. También, es fundamental para el establecimiento de tejidos mesenquimales derivados de la cresta neural durante el desarrollo embrionario y se conserva alguna función en el mantenimiento de la integridad del tejido y la señalización en ciertos tejidos adultos (Pohlodek et al., 2016). Aunque se encuentra principalmente en osteoblastos, la expresión de CDH11 se observa en condrocitos y sinoviocitos de cartílago similares a fibroblastos, junto con tejidos de estroma, cerebro, pulmón, riñón y corazón (Guidry, 2009).

Al ser un mediador de la reacción de los sinoviocitos (Pohlodek et al., 2016), hay que destacar que el CDH11 es un objetivo terapéutico en la artritis reumatoide (RA, por sus siglas en inglés), una enfermedad inflamatoria con propiedades que a menudo se comparan con el cáncer (Assefnia et al., 2014). CDH11, se sobreexpresa en células poco diferenciadas y altamente invasivas, en diferentes tipos de cáncer, tanto de mama como de próstata, gástrico, renal, pulmonar, colorrectal, pancreático, en melanoma maligno, glioblastoma y osteosarcomas (Dalle et al., 2019; Guidry, 2009).

Inspirados en estudios para el tratamiento de la RA, también se ha estudiado la inhibición de la función de la CDH11 en células de cáncer. Los trabajos relacionados han reportado, el uso de anticuerpos monoclonales (mAb, por sus siglas en inglés) Anti-CDH-11 y farmacóforos inhibitorios, como SD133, especialmente diseñados para unirse al dominio extracelular 1 (EC1, por sus siglas en inglés) de la CDH11,

resultando en la ralentización del crecimiento de tumores y disminución de la proliferación de células de cáncer (Assefnia et al., 2014).

Aunado a esto, en el campo de la nanotecnología y específicamente de la nanomedicina, una amplia variedad de opciones se investiga como nanotransportadores de estas sustancias con actividad anticancerígena, que faciliten su viaje a través de las barreras fisiológicas y su llegada al sitio de acción en un organismo (Tran et al., 2017).

Las nanopartículas virales (VNPs, por sus siglas en inglés) son un conjunto supramolecular basados en los virus, pueden diseñarse para que contengan las moléculas o nanomateriales en su interior o en la superficie de su cápside viral que está constituida por proteínas, ofreciendo ventajas en el control y la precisión a nivel molecular, además de biocompatibilidad en comparación con otros sistemas de nanopartículas sintéticas. Actualmente, la tecnología basada en VNPs han permitido el desarrollo de vacunas y otras que se encuentran en fases clínicas (Chung et al., 2020; Hema et al., 2019).

Se ha demostrado que también puede aprovecharse la estabilidad y versatilidad de las VNPs derivadas de virus de vegetales para el diseño de métodos diagnósticos y terapias en mamíferos (Chung et al., 2020; Hema et al., 2019; Yildiz et al., 2011). Por lo que, en este trabajo, se propone estudiar la inhibición de la proliferación y migración celular en células de cáncer de mama y en modelo murino, utilizando las VNPs del virus del mosaico del bromo (BMV, por sus siglas en inglés) y del virus del moteado clorótico del caupí (CCMV, por sus siglas en inglés) que contengan las moléculas SD133\* en su superficie, para frenar la propagación de células cancerosas.

Por otra parte, en investigaciones actuales, se ha logrado la generación de anticuerpos de cadena pesada contra la CDH11 en camélido (Alfredo, 2020; Rosales, 2020). El término nanoanticuerpos (Nb, por sus siglas en inglés) se refiere a la parte variable (VHH, por sus siglas en inglés) de este tipo especial de anticuerpos. La VHH posee características distintivas que incluyen tamaño pequeño, alta solubilidad, estabilidad, especificidad, afinidad, facilidad de producción, rentabilidad de clonación y resistencia térmica y química, características con las que podría superar a los mAb (Tillib, 2011; Van Audenhove y Gettemans, 2016; Zare et al., 2021). Con base en ello, en esta tesis se plantea, además, la búsqueda de Nb de camélidos anti CDH11.

## **1.1 Antecedentes**

### **1.1.1 Sobreexpresión de cadherina-11 y su relación con neoplasias malignas**

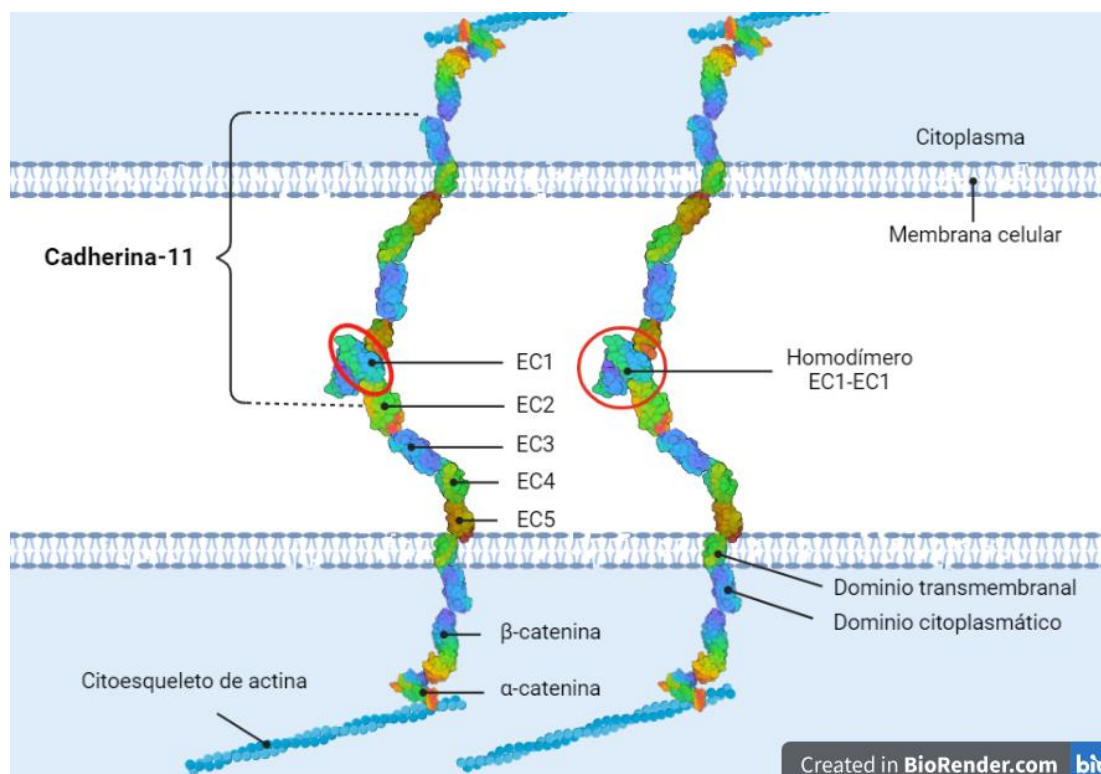
La mayoría de los cánceres de mama son carcinomas, es decir, son tumores que se originan de las células epiteliales. Cuando los carcinomas se forman en el seno, por lo general son de un tipo más específico llamado adenocarcinoma, que comienza en las células de los conductos o los lobulillos (ACS, 2019).

A pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento, la recurrencia y la formación de metástasis son la principal causa de muerte en las pacientes con cáncer de mama. En el complejo fenómeno de la diseminación de las células tumorales, uno de los primeros eventos importantes es la pérdida de la mayoría de las características epiteliales, a través de cambios drásticos en el citoesqueleto. Esta serie de eventos se conoce como transición epitelio-mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés), el cual es un proceso en el que las células epiteliales sufren cambios bioquímicos para transformarse en células mesenquimatosas, se pierden las uniones intercelulares y, por lo tanto, se vuelven alargadas y no polarizadas, lo que les permite moverse a través de la matriz extracelular (Moreno et al., 2016).

Se han descrito diversos marcadores implicados en la EMT: el aumento de la expresión de las cadherinas mesenquimales, la N-cadherina (neuronal) (CDH3) y/o la OB-cadherina (osteoblástica) o cadherina-11 (CDH11), y la disminución de la E-cadherina (epitelial) (CDH1) (Assefnia et al., 2014).

La CDH11 o cadherina osteoblástica (OB-cadherina) por su parte, es una proteína transmembranal de adhesión celular, dependiente de calcio, identificada originalmente en osteoblastos de ratón. Más tarde, se encontró comúnmente expresada, en etapas tempranas de diferenciación, también por las células osteoblásticas humanas. Dado que además es fundamental para el establecimiento de tejidos mesenquimales derivados de la cresta neural, pero no en tejidos epiteliales, durante el desarrollo embrionario, la CDH11 es un biomarcador del fenotipo mesenquimal, que conserva algunas funciones en el mantenimiento de la integridad y señalización en ciertos tejidos adultos (Chen et al., 2019; Pohlodek et al., 2016; Guidry, 2009). Aunque se expresa principalmente en los fibroblastos del revestimiento sinovial y los osteoblastos (Kyung Chang et al., 2010), también es necesaria para que los órganos y tejidos que contienen músculo liso, como las arterias y vejiga sean contráctiles (Row et al., 2016).

La CDH11 posee 5 dominios extracelulares o ectodominios (EC1-EC5), un dominio transmembranal y uno citoplasmático, el cual interactúa con la catenina p120,  $\alpha$ -catenina y  $\beta$ -catenina, para mediar la adhesión celular y regular la transducción de señales (Chen et al., 2021). La comunicación célula-célula ocurre a través del establecimiento de un homodímero formado por la interacción de dominios EC1 como se observa en la Figura 1 (Dalle et al., 2019; Kyung Chang et al., 2010).



**Figura 1.** Esquema de la cadeherina-11 (CDH11).

Pishvaian et al. (1999), evaluaron la expresión del mRNA que codifica para la CDH11 y la presencia de la proteína como tal en diferentes líneas celulares de cáncer de mama, por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés) y por el análisis Western blot, respectivamente. Encontraron que la CDH11, se expresa en 5 de las células más invasivas y menos diferenciadas, por lo que puede estar bien correlacionada con el fenotipo metastático y puede servir como marcador molecular para el conjunto más agresivo de tumores. Además, propusieron que la CDH11 puede mediar la interacción entre las células tumorales y otros tipos de células que normalmente expresan CDH11, como los osteoblastos o quizás incluso con la matriz extracelular circundante, facilitando así la invasión y metástasis de las células tumorales. Aunque no profundizaron en ensayos *in vitro* ni *in vivo*, ni realizaron análisis estadísticos de los datos, se comenzó a considerar a la CDH11 como un buen objetivo terapéutico (Pishvaian et al., 1999).

Más tarde, Assefnia et al. (2014) demostraron que el fármaco celecoxib, utilizado para tratar exitosamente la artritis reumatoide, tenía la capacidad estructural de unirse directamente al dominio extracelular EC1 de la CDH11. Además, habían observado que anticuerpos dirigidos a ella, ya se encontraban en ensayos clínicos para tratar la misma patología. Con base en ello, advirtieron que, si se podía demostrar que la CDH11 impulsa la progresión maligna del cáncer, y no solamente está asociada a ella, existe gran posibilidad de que dichas opciones terapéuticas, también pudieran aplicarse al tratamiento de cáncer.

En inicio, para probar formalmente la asociación de CDH11 con neoplasias malignas, realizaron un análisis de todos los conjuntos de datos de microarreglos (*microarrays*, por sus siglas en inglés) disponibles, de tejido humano tumoral y sano. Con ello comprobaron que, además de estar elevada desde las primeras etapas del cáncer de mama invasivo, la CDH11 se sobreexpresa en tumores gastrointestinales y del sistema nervioso central (Assefnia et al., 2014).

Posteriormente, realizaron ensayos para averiguar la necesidad de la CDH11 en el crecimiento del tumor de células MDA-MB-231, una línea derivada de cáncer de mama humano triple negativo. Para lo cual, inocularon células cancerosas en ratones, que se trataron previamente con Matrigel™, adicionado con un anticuerpo monoclonal (mAb, por sus siglas en inglés), específico para la CDH11. Esta terapia con anti-CDH11, inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos recién inyectados y de tumores ya establecidos, en comparación con los ratones control. Por otra parte, usaron dos tipos de RNA de interferencia; RNA pequeños de interferencia (siRNA, por sus siglas en inglés), y RNA de horquilla corta (shRNA, por sus siglas en inglés), para disminuir la expresión de CDH11 en los tumores de las células MDA-MB-231. La ausencia de la proteína impidió la formación de tumores en los ratones. Estos datos sugirieron, que las células CDH11<sup>+</sup> son necesarias para el crecimiento tumoral (Assefnia et al., 2014).

Chen et al. (2019), también analizaron el papel biológico de la CDH11, sus redes de señalización asociadas y la capacidad de ser el blanco de estrategias terapéuticas. A través de análisis bioinformático de los datos disponibles del cáncer de mama invasivo, no invasivo y tejido de mamario sano, revelaron que la CDH11 se sobreexpresaba de manera significativa en el grupo de casos invasivos, en comparación con sus homólogos no invasivos. También, relacionaron la alta expresión de la CDH11 con la menor supervivencia del paciente o mayor probabilidad de recaída. Además, encontraron que la CDH11 está asociada funcionalmente con otros efectores claves de metástasis, como la vimentina, CTNNB1 ( $\beta$ -catenina), receptor del factor de crecimiento epidérmico, FYN, proteínas quinasa C y beta y CD44. Con ello, aportaron pruebas de que la CDH11 es un regulador del fenotipo metastásico (Chen et al., 2019).

Particularmente, se consideró el microambiente tumoral (TME, por sus siglas en inglés), que se forma en los organismos afectados específicamente por la presencia de los fibroblastos asociados al cáncer (CAF, por sus siglas en inglés), lo cuales también sobreexpresan CDH11 y desempeñan un papel fundamental en inducir y favorecer la invasión y metástasis. Se emplearon cocultivos, uno con la línea celular MCF7+ CAFs, y otro de células MDA-MB-231 + CAFs. Al analizar las células, se encontró que ambos cocultivos presentan niveles significativos del mRNA y proteína CDH11 y otros factores metastáticos, en comparación con las mismas líneas celulares cultivadas independientemente. En ensayos de herida en placa y ensayos en Matrigel™, las mismas células cocultivadas mostraron una mejor capacidad de migración e invasión respectivamente. Por lo tanto, el TME enriquecido con CDH11 mejoró el potencial metastático de las células cancerosas (Chen et al., 2019).

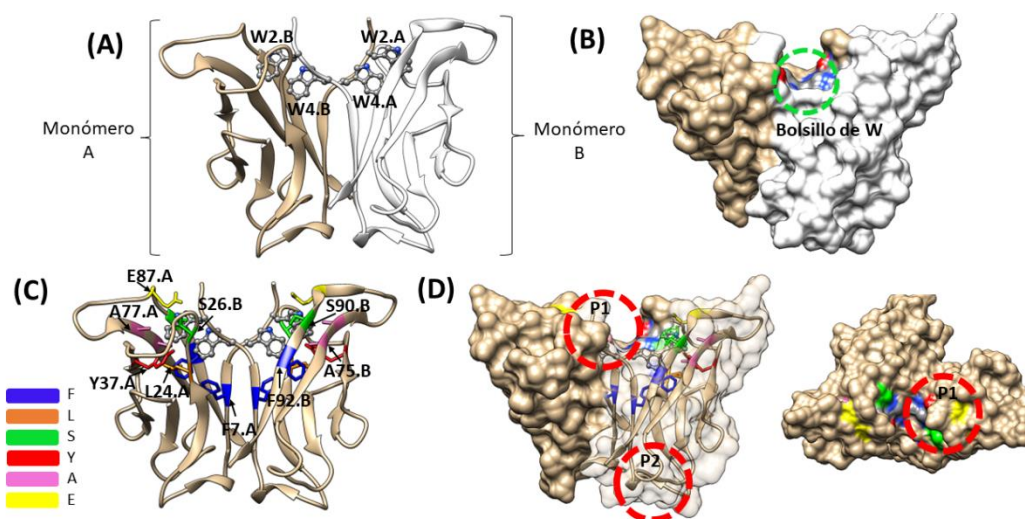
Fundamentado en la información presentada en esta sección, es propósito del presente trabajo el desarrollo de sistemas bloqueantes de la CDH11, que a su vez inhiban su función en la progresión de células de cáncer de mama.

### 1.1.2 Farmacóforo SD133

El fármaco celecoxib y un análogo de este, el dimetil-celecoxib (DMC), poseen potencial estructural de unirse a CDH11. Usando resonancia del plasmón de superficie (SPR, por sus siglas en inglés) y electroforesis nativa, Assefnia et al. (2014) demostraron que ocurría la unión directa de ambos fármacos con la CDH11, así como inhibían su dimerización. Debido a esto, ambos compuestos lograron detener el crecimiento de células de cáncer de mama CDH11<sup>+</sup>, MDA-MB-231, BT549 y HS578T, pero no afectar a las células MCF7 que son CDH11<sup>-</sup>. Usando las estructuras de ambos fármacos como base en simulaciones computacionales, diseñaron farmacóforos para bloquear las regiones P1 y P2, en el dominio EC1 (Figura 2). Tres de los compuestos probados *in silico*, fueron los más prometedores: SD133, SD037 y SD073, nombrados así a partir del término small molecule drug (SD). Ya que la estructura de SD133 fue la más parecida a una droga, de hecho, parecida al celecoxib, lo tomaron como su compuesto principal (Assefnia et al., 2014).

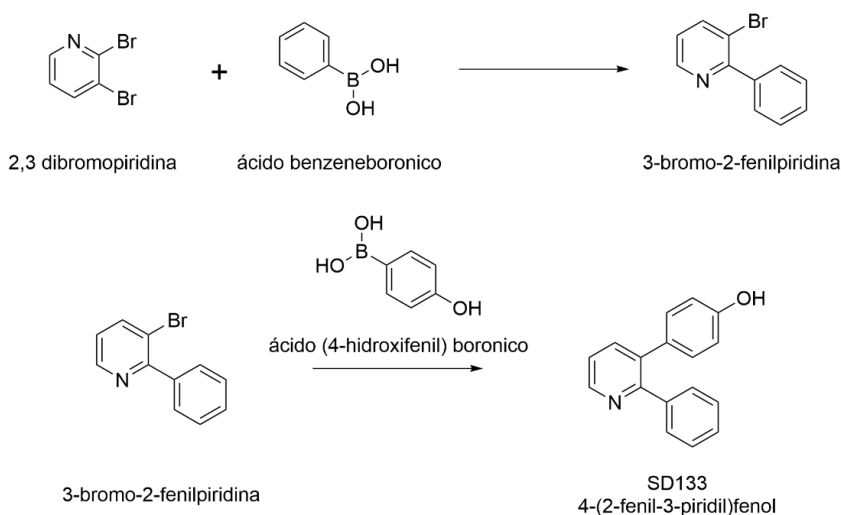
La molécula SD133 es hidrofóbica, compuesta por tres anillos aromáticos que recibe el nombre IUPAC 4-(2-fenil-3-piridil) fenol. Fue sintetizada por la ruta de desprotonación-transmetalación dirigida hacia las piridinas (Karig et al., 2001), partiendo del compuesto dibromopiridina (Figura 3). Posteriormente, se comprobó su capacidad para competir por el sitio de unión de la CDH11, usando SPR.





**Figura 2.** Homodímero EC1-EC1 de CDH11: (A) Residuos de triptófano (W2 y W4) de los dominios EC1 que forman el dímero; (B) bolsillo de W; (C) residuos de las cadenas laterales al bolsillo de W. Cada monómero tiene los mismos residuos: Fenilalanina de color azul (F7 y F92), Leucina de color naranja (L24), Serina de color verde (S26), Tirosina de color rojo (Y37), Alanina de color rosa (A75 y A77), Acido glutámico de color amarillo (E87); (D) vista lateral y superior del Homodímero, con los residuos marcados con diferentes colores y las regiones P1 y P2 circuladas en rojo.

Al igual que lo hicieron celecoxib y DMC en ensayos *in vitro*, SD133 inhibió significativamente la proliferación de tres líneas celulares de cáncer de mama CDH11<sup>+</sup> (MDA-MB-231, BT549 y HS578T). También, detuvo la invasión evaluada en un ensayo sobre Matrigel<sup>TM</sup> y la formación de colonias de MDA-MB-231. Es probable que la actividad de SD133 se deba a su forma y flexibilidad estructural moderada que le permite adaptarse y unirse firmemente al dominio de unión (Assefnia et al., 2014). Por lo que demostraron que una molécula pequeña que bloquea la dimerización de CDH11, inhibe su función, como lo hacen el celecoxib y DMC.



**Figura 3.** Ruta de síntesis química del farmacóforo SD133.



Otra de las estrategias actuales que facilitarían la distribución y unión de la SD33\* con la CDH11, recurre a transportarla en nanovehículos apropiados, como las VNPs. El grupo amino añadido a la SD133\* puede participar en reacciones bien comprendidas de funcionalización de cápsides virales, facilitando la unión química de la molécula al vehículo (Gillitzer et al., 2002), como se describirá más adelante.

### 1.1.3 Inmunoterapia dirigida a cadherina-11

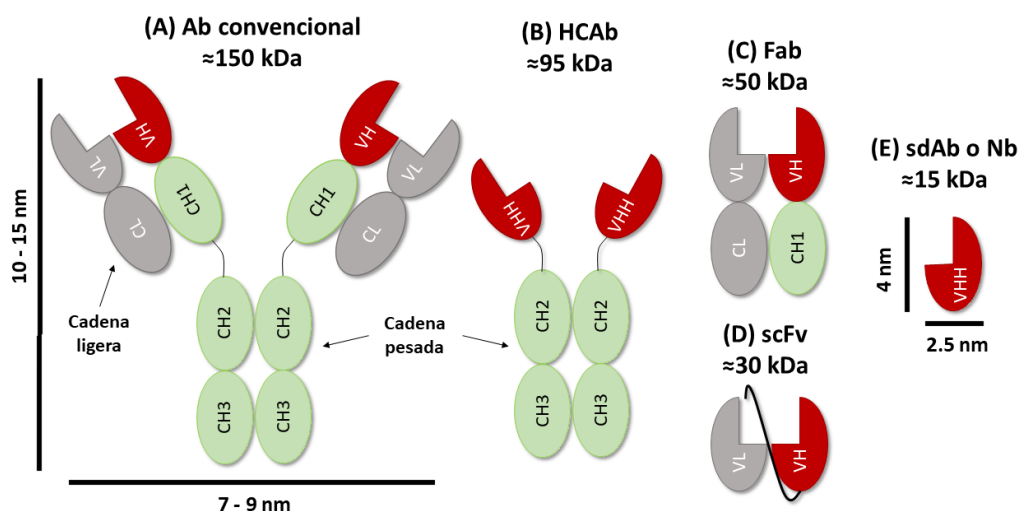
Tras investigar la relación de la CDH11 en el TME del cáncer, Chen et al. (2019), exploraron la posibilidad de que fuera un objetivo terapéutico usando un mAb. Utilizando cultivos de células MCF7 enriquecidas con CDH11 y MDA-MB-231, montaron ensayos de herida en placa y probaron que, al tratarlas con 1 mg/mL de mAb anti-CDH11, se reprimía significativamente la motilidad de las células. A través de *Western blot*, observaron que el tratamiento atenuó la expresión de biomarcadores asociados a metástasis e incremento la expresión de E- cadherina (Chen et al., 2019).

Dados los resultados que se habían obtenido hasta el momento, realizaron estudios de validación *in vivo*. Se inocularon ratones con células MDA-MB-23 o MCF7 y se dividieron aleatoriamente en grupos de control y los destinados al tratamiento con anti-CDH11. Las imágenes no invasivas *in vivo*, mostraron que el tratamiento inhibió significativamente el crecimiento tumoral dependiendo del tiempo, de modo que, a la sexta semana, los ratones tratados exhibieron una carga tumoral menor en comparación con su control, como se observaba en la intensidad de la bioluminiscencia. Al final del estudio, solo tres ratones del grupo control sobrevivieron, mientras que todos los ratones del grupo anti-CDH11 sobrevivieron, confirmando una ventaja de supervivencia del 40% y reduciendo la incidencia de metástasis al mismo porcentaje (Chen et al., 2019). Finalmente, sus resultados respaldan el continuar con el desarrollo de anticuerpos anti-CDH11 para lograr su aplicación clínica.

Por otra parte, si bien los mAbs pueden dirigir una carga citotóxica útil, una de sus principales restricciones es el transporte deficiente hacia las células tumorales (Thurber et al., 2007). El cáncer se presenta clínicamente como tumores sólidos vascularizados o como micrometástasis prevasculares, cada uno de los cuales tiene sus parámetros farmacocinéticos (Thurber et al., 2007, 2008). Por lo anterior y, además debido a sus dimensiones ( $\approx 150$  kDa, 10 a 15 nm de largo y 7 a 9 nm de ancho), se ha observado que los mAbs no logran acceder a todas las células tumorales, lo que resulta en una penetración tumoral limitada y distribución heterogénea (Carlisle y Coussios, 2013; Thurber et al., 2008; Xiang et al., 2015). Además,

persiste el problema de las respuestas inmunitarias que podría presentar el hospedero ante el mAb (Van Audenhove y Gettemans, 2016; Xiang et al., 2015).

En la mayoría de los mamíferos los anticuerpos son estructurados por una cadena pesada y una cadena ligera, cada una con una región constante y una variable. Pero a principios de los años 90, fue descubierto un tipo especial de anticuerpo, carente de las cadenas ligeras, que era producido por especies de camélidos y tiburones (Hamers-Casterman et al., 1993; Kang et al., 2021). Estos anticuerpos de cadena pesada (HCAb, por sus siglas en inglés) poseen anticuerpos de dominio único (sdAb, por sus siglas en inglés), también conocidos como Nbs o fragmentos variables (VHH, por sus siglas en inglés, Figura 5) (Hamers-Casterman et al., 1993; Kang et al., 2021).



**Figura 5.** Representación esquemática de diferentes formatos de anticuerpos: (A) Anticuerpo convencional (Ab) consiste en dos cadenas ligeras (L) y dos cadenas pesadas (H); (B) Anticuerpo de cadena pesada (HCAb) formado por dos cadenas pesadas idénticas; (C) Fragmento de unión al antígeno (Fab); (D) Fragmento variable de una sola cadena (scFv); (E) Anticuerpo de dominio único (sdAb) o dominio VHH, llamado también nanoanticuerpo (Nb).

Los Nbs pueden proporcionar una respuesta a limitaciones de los mAbs. Las principales características de los Nbs incluyen tamaño pequeño ( $\approx 15$  kDa, 4 nm de largo y 2.5 nm de ancho), alta solubilidad, estabilidad, especificidad y afinidad, facilidad de clonación, resistencia térmica y química (Van Audenhove y Gettemans, 2016). Además, tienen mayor penetración tumoral y son menos inmunogénicos que los mAbs (Ackaert et al., 2021; Tillib, 2011). También, aunque poseen propiedades de unión al antígeno similares, pueden acceder a epítopos que están fuera del alcance de los anticuerpos convencionales o de los derivados de los anticuerpos, como los fragmentos variables de cadena única (scFvs, por sus siglas en

inglés). Por ejemplo, pueden penetrar en una hendidura de la superficie de una proteína o en una interfaz entre dominios proteicos, a reserva de los tamaños y características de estos (Verhaar et al., 2021).

### 1.1.3.1 Nanoanticuerpos dirigidos a tumores

En oncología, los Nbs que actúan como antagonistas pueden unirse a proteínas extracelulares en las células tumorales e interferir con las vías de señalización correspondientes. Dependiendo de la vía interferida, puede provocarse la inhibición del crecimiento y la proliferación de células tumorales (Kang et al., 2021). Algunos ejemplos de Nbs con actividad antitumoral son los dirigidos al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2, por sus siglas en inglés) y el receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2, por sus siglas en inglés) (Kang et al., 2021).

El EGFR es un receptor de tirosina quinasa que tiene un papel importante en la regulación del crecimiento y la diferenciación de un gran número de tipos de células diferentes, debido a lo cual, la sobreexpresión del receptor confiere ventajas a las células cancerosas en diferentes etapas del desarrollo tumoral, dígase la iniciación, progresión y neovascularización. De hecho, se encuentra sobreexpresado en un gran número de tumores epiteliales, incluidos los carcinomas de cabeza y cuello, mama, colon, pulmón, próstata, riñón, ovario, cerebro, páncreas y vejiga (Kang et al., 2021; Roovers et al., 2007; Verhaar et al., 2021).

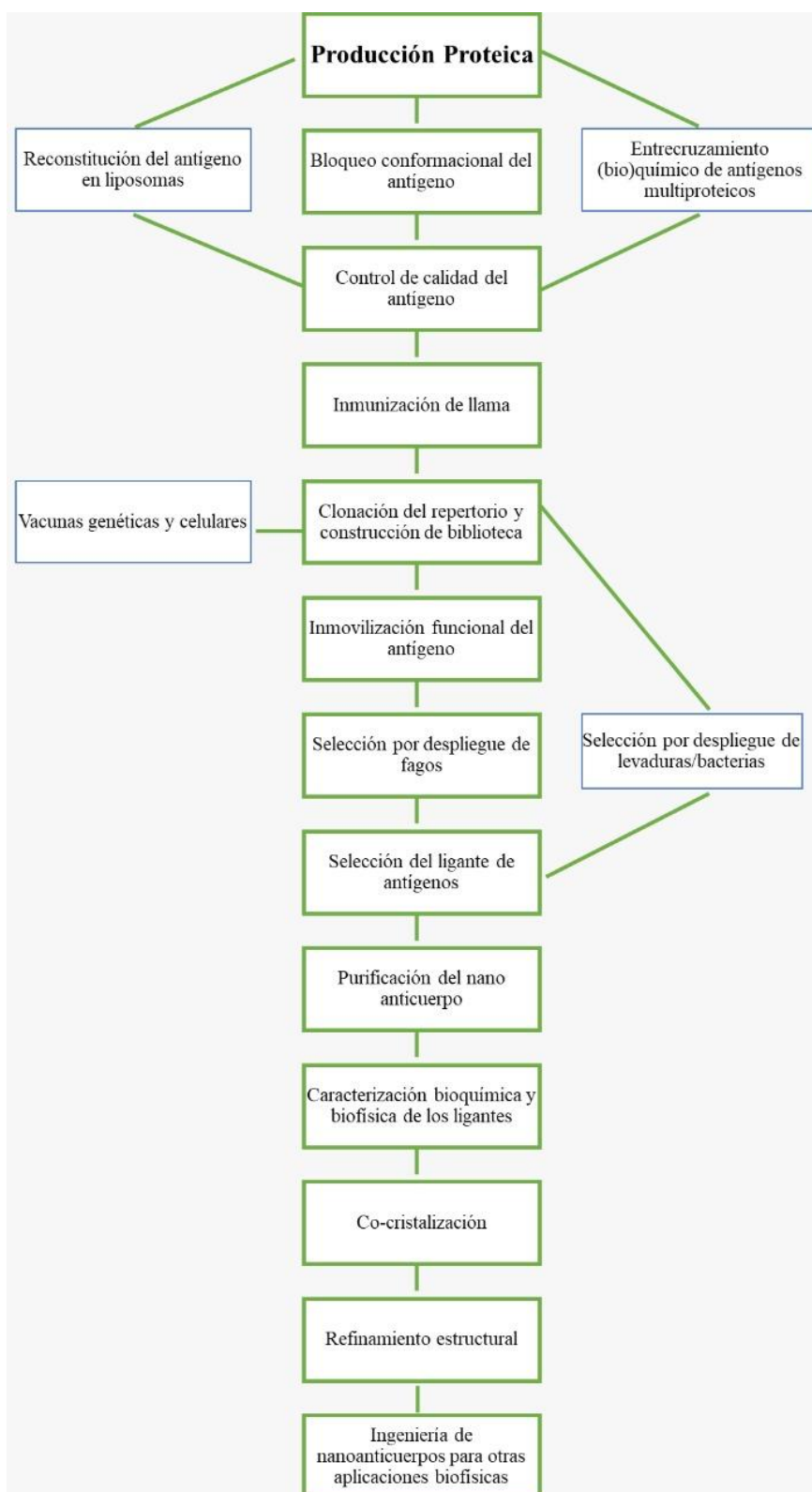
Roovers et al. (2007) inmunizaron ejemplares de *Llama glama* con extractos celulares que contenían EGFR. Posteriormente, Recolectaron la sangre de los animales para recuperar los linfocitos B y obtener la biblioteca inmune a partir de estos, es decir, extrajeron el ARN total y lo retro-transcribieron a ADNc. Este ADNc fue utilizado como molde para amplificar el repertorio de segmentos génicos que codifican a los anticuerpos de cadena pesada. Conociendo los sitios de restricción que presentan los genes de los Nbs, cortaron el repertorio y los fragmentos de ADNc de entre 300-400 pb fueron ligados a un vector fagémido para realizar la selección de anticuerpos específicos para EGFR por la técnica de despliegue de fagos. Después de la selección prosiguieron con la expresión y purificación de Nbs anti-EGFR. Tras comprobar su capacidad de inhibir la unión de EGF al EGFR, se evaluó su efecto sobre dos líneas celulares que sobreexpresan EGFR; una derivada de fibroblastos HER14 y una de carcinoma escamoso epidermoide humano A431, y demostraron que provocaban la inhibición de la señalización mediada por EGF y la proliferación celular. Alcanzaron los experimentos en ratones xenoinjertados con células A431, donde observaron que los Nbs eran efectivos para retrasar el crecimiento de los tumores. Este trabajo representa

el primer informe de Nbs no conjugados, es decir, no unidos a grupos efectores, como farmacóforos, toxinas, enzimas u otros agentes, que demostraron actividad antitumoral *in vivo* (Roovers et al., 2007).

Otro de los receptores importantes asociados con tumores en las células endoteliales es el VEGFR2 que forma parte de la familia de receptores humanos VEGFR. Su ligando, el VEGF, es secretado por tipos de células como los macrófagos y las células tumorales, induciendo así vías de señalización descendentes implicadas en la proliferación celular, la angiogénesis y la metástasis. Por ello, el bloqueo de la señalización del receptor VEGF puede conducir a la inhibición de la neovascularización y la metástasis tumoral (Behdani et al., 2012; Verhaar et al., 2021).

Siguiendo una estrategia similar a la de Roovers et al. (2007), Behdani et al. (2012), inmunizaron dos camellos (*Camelus dromedarius*) con una línea celular humana 293KDR que expresa altos niveles de VEGFR2. Describieron la obtención de la biblioteca inmune, la selección de los fragmentos VHH específicos mediante la técnica de despliegue de fagos, así como la caracterización, expresión y purificación de Nbs anti-VEGFR2. Probaron que uno de estos Nbs, denominado 3VGR19, poseía la capacidad para unirse a VEGFR2 en la superficie celular e inhibir la formación de tubos capilares *in vitro*. Los resultados de estas investigaciones muestran el potencial de los Nbs para el bloqueo de la señalizaciones y proporcionan una base para el desarrollo de estos como herramientas poderosas para la terapia contra el cáncer (Behdani et al., 2012; Roovers et al., 2007). La metodología aplicada en los dos últimos trabajos citados muestra con éxito lo que unos años más tarde se encontraría establecido por Pardon et al. (2014) como protocolo general para la generación de Nbs. Este detalla los pasos y las técnicas para trabajar con la inmunización de llamas, camellos, dromedarios y alpacas, desde la preparación de los inmunógenos, la construcción y clonación del repertorio inmune, la selección por despliegue de fagos, la expresión, purificación y caracterización de los Nbs, hasta llegar al refinamiento de la estructura y la cristalización de la proteína para aplicaciones biológicas. Funciona como una pauta bien probada que se ajusta al esquema de la Figura 6.

Rosales-Fuerte, en su trabajo de tesis de 2020, realizó el diseño y obtención de Nbs dirigidos a la CDH11. Inició la construcción de la biblioteca inmune, a partir de los linfocitos obtenidos de una llama inmunizada con el péptido sintético de EC1-CDH11. El RNA total de los linfocitos purificados también contenía la información genética del fragmento VHH, que reconoce el antígeno de interés. El método de selección fue a través de la técnica de despliegue de fagos, con lo que, después de tres rondas de selección y pruebas de ELISA, se obtuvieron los bacteriófagos recombinantes capaces de reconocer a EC1-CDH11 (Rosales-Fuerte, 2020).



**Figura 6.** Flujo de trabajo para la generación y obtención de Nbs; modificado de (Pardon et al., 2014).

Los bacteriófagos recombinantes, se evaluaron en líneas celulares de MDA-MB-231 y MCF7, mediante ensayos de inmunofluorescencia. Los resultados indicaron que eran capaces de reconocer a la CDH11 en

las células MDA-MB-231, pero también reconocieron en menor grado otras cadherinas en MCF7, es decir, no fueron totalmente específicos. Al realizar un ensayo de viabilidad MTT, de las mismas líneas celulares de cáncer, ninguno de los bacteriófagos recombinantes afectó significativamente a las células. Sin embargo, el trabajo podía continuar con la selección de bacteriófagos con mayor reconocimiento de EC1-CDH11, aislamiento y purificación del Nb e implementación de nuevos ensayos de viabilidad y migración de células tumorales de mama (Rosales-Fuerte, 2020).

Aunque los Nb antagonistas pueden unirse a proteínas extracelulares en las células tumorales e interferir con las vías de señalización correspondientes, debido a la falta del fragmento cristalizable (Fc), la eficacia antitumoral del Nb puede ser inferior a la del mAb tradicional. Dado que una terapia antitumoral ideal es muy potente y específica, lo que significa que puede causar la muerte celular y la regresión del tumor, y este efecto tóxico debe restringirse a los sitios del tumor evitando los tejidos sanos, también se está estudiando ampliamente la conjugación de Nbs con agentes terapéuticos, la cual es una estrategia prometedora para mejorar la potencia de tratamientos anticancerígenos específicos basados en Nbs (Kang et al., 2021).

Actualmente, nueve de los Nbs para el tratamiento del cáncer se encuentran en fase de ensayo clínico (Kang et al., 2021). En algunos casos, los Nbs reaccionan de forma cruzada con dianas homólogas de otras especies, lo que puede facilitar la transición de las aplicaciones preclínicas a las clínicas (Verhaar et al., 2021). En el presente trabajo de tesis, se plantea retomar la producción de Nb anti-CDH11.

#### **1.1.4 Nanopartículas virales bioconjugadas**

Las VNPs se derivan de un virus por lo cual son nanopartículas bien estructuradas con tamaños y formas bien definidos. Son atractivos debido a que son partículas monodispersas, son excepcionalmente estables y han mostrado ser biocompatibles (Wen et al., 2012). Las VNPs derivadas de los bacteriófagos y los virus vegetales, han recibido recientemente gran atención debido a que son fáciles de manejar, extraer y se consideran sistemas nanoacarreadores más seguros para el ser humano, en comparación con los virus de mamíferos. En este sentido, es menos probable que las VNPs derivadas de virus que infectan vegetales desencadenen efectos secundarios negativos en los mamíferos debido a su incapacidad para proliferar en estos. También, se ha comprobado su biodisponibilidad y amplia biodistribución tras su administración oral o intravenosa en ratones (Bruckman y Steinmetz, 2014; Kaiser et al., 2007). Además, son unidades



"programables", es decir, que pueden diseñarse específicamente mediante modificación genética o métodos de bioconjugación química (Kovacs et al., 2007; Wen et al., 2012; Yildiz et al., 2012).

Con el objetivo de añadir una nueva función a estas estructuras, se han adaptado con éxito una serie de protocolos de bioconjugación convencionales y novedosos para modificar las superficies exteriores con péptidos, colorantes fluorescentes, polímeros, carbohidratos, oligonucleótidos y otras moléculas orgánicas, y con ello generar formulaciones con mayor especificidad y eficacia (Kovacs et al., 2007; Yildiz et al., 2012). A la vez se puede recurrir a estrategias de modificación interna para cargar/encapsular las partículas con fármacos o cualquier agente de interés como los ya mencionados. Aunque, incluso en ausencia de ligandos de orientación específicos, podría producirse una acumulación pasiva de estos materiales en los tumores sólidos por el efecto de permeabilidad y retención mejoradas (EPR, por sus siglas en inglés), la bioconjugación de estas partículas, facilita la introducción de ligandos específicos, lo que en la actualidad es ampliamente investigado para dirigirse a receptores moleculares sobreexpresados en células cancerosas. Al mismo tiempo, el ligando dirigido le confiere a las partículas virales protección ante el reconocimiento por anticuerpos, que las neutralizarían antes de llegar a sus destinos (Bruckman y Steinmetz, 2014; Gillitzer et al., 2002; Yildiz et al., 2012).

Las estructuras proteicas y altamente repetitivas de las VNPs son inmunogénicas, pero esto puede reducirse significativamente mediante la PEGilación, una técnica de modificación de la superficie de nanopartículas que consiste en incorporar un revestimiento de polietilenglicol (PEG), (Grun et al., 2021), el cual reduce las interacciones celulares no específicas e indeseables a la vez que mejora su farmacocinética. Esto vuelve a la PEGilación una de las modificaciones esenciales que se deben explorar (Wen et al., 2012; Yildiz et al., 2012).

Actualmente, dos de los virus icosaédricos más estudiados como vehículos con aplicación biomédica son el BMV y el CCMV. Las cápsides de estos tienen un tamaño promedio de 28 nm de diámetro, compuesta por 180 copias idénticas de las subunidades proteicas de cada virus, dispuestas en simetría T=3. Cada subunidad presenta múltiples grupos funcionales, como los residuos de amina (lisina), ácido carboxílico (glutamato y aspartato) y tiol (cisteína) expuestos en la superficie, que pueden reaccionar químicamente (Z. Chen et al., 2016; Gillitzer et al., 2002; Wen et al., 2012; Yildiz et al., 2012).

La estructura cristalina del CCMV, expone en el exterior hasta 11 grupos carboxilo, 6 grupos amino y 2 grupos tiol por proteína de cápside (Gillitzer et al. 2002). Por lo cual se estima que hay hasta 1980, 1080 y 360 sitios potenciales carboxilo, amino y tiol respectivamente. Tomando en cuenta lo anterior, Gillitzer

et al., (2002), realizaron la activación de los grupos carboxilo por reacción de entrecruzamiento del conjunto 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) para unirlos covalentemente con la amina de la fluoresceína cadaverina. Funcionalizaron el CCMV con un exceso de 550 moles de los reactivos NHS y EDC, y con diferentes cantidades de la fluoresceína (100-1000 moles de exceso por proteína viral). Al medir la fluorescencia del virus modificado, demostraron que 560 de los 1980 sitios posibles, se lograron etiquetar agregando 1000 moles de exceso del fluoróforo durante la reacción. También, mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) y microscopia electrónica de transmisión (TEM), determinaron que las partículas seguían intactas y monodispersas después del etiquetado. El DLS mostró que había un cambio de diámetro de 27 a 37 nm, y de manera similar en las micrografías observaron que las partículas aumentaron de 25 a 32 nm en promedio. Resultó evidente que los virus permanecieron intactos durante el procedimiento de etiquetado y la adición del fluoróforo estuvo relacionado con el aumento del diámetro de las partículas (Gillitzer et al., 2002).

Por su parte, Yildiz et al. (2012) describieron procedimientos de bioconjugación utilizando un mutante de BMV (cBMV) que fue modificado genéticamente para expresar cisteína en lugar del residuo de valina 168 en la superficie del virus. Sus protocolos se basaron en la aplicación de las reacciones químicas tiol-maleimida, para funcionalizar la partícula con colorantes fluorescentes, PEG, proteínas o quimioterapéuticos.

En la conjugación de cBMV con PEG (2000 Da), el virus se incubó con un exceso molar de 1000 veces el reactivo maleimida-PEG2000. La eficiencia del etiquetado se determinó midiendo la densidad de las proteínas de cápside nativas, en comparación con las PEGiladas, en geles teñidos con coomasie tras la electroforesis en gel desnaturizante y encontraron que alrededor del 50% de las proteínas fueron etiquetadas. Además, por TEM observaron que el cBMV-PEG permaneció estructuralmente integro.

El BMV nativo también presenta grupos carboxilo (17), amino (8) y tiol (1), por proteína viral, que pueden participar en reacciones de funcionalización. El presente trabajo, propone recurrir a las reacciones que involucran estos grupos funcionales, para conjugar la molécula SD133\* a la superficie externa del BMV y el CCMV, como estrategia para la entrega del farmacóforo al sitio de acción. También, tras obtener un Nb de mayor especificidad para la CDH11, se plantea explorar su transporte en virus de plantas como mecanismo de entrega adecuado de los mismos.

## 1.2 Hipótesis

Las partículas virales conjugadas con SD133\* y los nanoanticuerpos anti-cadherina-11 son capaces de acoplarse eficientemente al ectodominio 1 de la cadherina-11, y en consecuencia tienen el potencial de inhibir la progresión de células altamente invasivas de cáncer de mama.

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1 Objetivo general

Conjugar partículas virales con la molécula SD133\* y obtener un Nb anti-CDH11, para evaluar su efecto inhibitorio en células invasivas de cáncer de mama.

### 1.3.2 Objetivos específicos

1. Conjugar la molécula SD133\* a las cápsides del virus del mosaico del bromo (BMV) y del virus del moteado clorótico del caupí (CCMV).
2. Evaluar el efecto de las partículas virales conjugadas sobre la migración de células MDA-MB-231 y 4T1, a través de ensayos *in vitro*.
3. Determinar el efecto de las partículas virales conjugadas sobre el desarrollo tumoral *in vivo* en modelo murino.
4. Obtener un Nb anti-CDH11 por clonación molecular.

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Producción, extracción y purificación de BMV y CCMV

La producción de virus BMV y CCMV se realizó por infección de las plantas de la cebada (especie *Hordeum vulgare*) y del caupí (especie *Vigna unguiculata*) respectivamente. Las semillas de ambas plantas fueron cultivadas en macetas dentro de un invernadero y regadas cada tercer día. Particularmente, la cebada fue sembrada en época de invierno mientras que el caupí puede crecer durante todo el año. Después de dos semanas, se hicieron heridas por abrasión mecánica en las hojas con ayuda de una almohadilla de lana de acero superfina. Posteriormente se depositaron y distribuyeron cuidadosamente sobre estas 20  $\mu\text{L}$  de solución del virus correspondiente a concentración de 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en solución amortiguadora de inoculación ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.01M, pH 6 y  $\text{MgCl}_2$  0.01M). Alrededor de 11 días después de la inoculación se detectó el patrón de clorosis, por tanto, las hojas visiblemente infectadas, fueron cortadas, pesadas y almacenadas en bolsas herméticas a  $-20^\circ\text{C}$ .

En una licuadora se colocaron 250 g de hojas infectadas y se añadieron 500 mL (2 mL por gramo de hojas) de solución de extracción fría ( $\text{Mg}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$  0.01 M,  $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$  0.25 M,  $\text{MgCl}_2$  0.01 M, pH 4.5 ajustado con  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ ) con 70  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol  $\geq 99.0\%$  y se molieron en lapsos de 1 min 10 veces. La mezcla resultante se filtró con un colador y la solución recolectada se filtró con una gasa. Después se le agregó un volumen de cloroformo frío y se dejó en agitación por 10 min. La mezcla se llevó a centrifugar a 10000 rpm durante 20 min a  $4^\circ\text{C}$ . La fase superior fue recolectada y vuelta a centrifugar a 10000 rpm, 15 min a  $4^\circ\text{C}$ . Se recupero el sobrenadante y se colocó en agitación para agregar cuidadosamente el NaCl necesario para alcanzar una concentración de 0.02 M y 10% (p/v) de Polietilenglicol 8000 (PEG 8000). Esto se dejó en agitación a  $4^\circ\text{C}$  durante 12 h para disolver completamente el PEG 8000 y eliminar restos de cloroformo. Posteriormente la solución se centrifugo a 10000 rpm por 20 min a  $4^\circ\text{C}$ . En este paso se recuperó la pastilla y se resuspendió en 75 mL de solución amortiguadora de acetatos (SAMA;  $\text{Mg}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$  0.008 M,  $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$  0.05 M, pH 4.6 ajustado con  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ ).

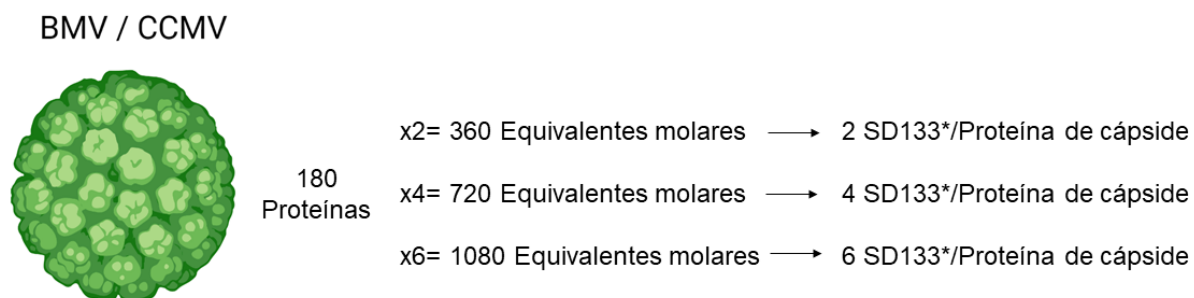
La solución se dividió en volúmenes de 25 mL en tubos de ultracentrífuga y se agregaron gota a gota 4 mL de sacarosa al 10% para formar el colchón de sacarosa al fondo de cada tubo. Las muestras fueron ultracentrifugadas a 32,000 rpm por 2.5 h y  $4^\circ\text{C}$  en un rotor SW-32 Ti utilizando una centrifuga Beckman XPN-100 (Beckman Coulter Inc.). Cada pastilla se resuspendió en 5 mL de solución amortiguadora SAMA.

Para terminar, se juntó cada muestra en un solo tubo para centrifugar a 4000xg durante 5 min a 4°C (Sorvall Legend RT, Thermo).

La concentración y pureza de los virus nativos fue determinada utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) haciendo mediciones a 260 y 280 nm. El valor de absorbancia a 260 nm fue dividido entre los coeficientes de extinción de cada virus ( $\epsilon_{\text{virus}}$ ), 5.15 para el BMV y 5.8 del CCMV, para obtener la concentración en mg/mL. La solución de virus se repartió en tubos de microcentrifuga que fueron almacenados a -80°C hasta su uso.

## 2.2 Bioconjugación de las partículas virales con SD133\*

La molécula SD133\* se conjugó a la superficie externa de las cápsides del BMV y CCMV de dos formas. Por una parte, uniéndola directamente a la cápside viral y por otra, utilizando polietilenglicol (PEG) como ligando entre la cápside y la molécula. Para ambos tipos de bioconjugación, se probaron 3 condiciones de reacción distintas cambiando la cantidad de los reactivos y de la molécula a participar en la reacción. Estas cantidades se establecieron considerando la relación de 2, 4 y 6 moléculas de SD133\* disponibles por proteína de cápside, es decir, se añadieron 360, 720 o 1080 equivalentes molares de los reactivos y del farmacóforo por cápside viral (Figura 7). El stock de SD133\* se diluyó en dimetilsulfóxido (DMSO). Los protocolos de funcionalización se aplicaron por igual tanto para BMV como para CCMV.



**Figura 7.** Esquema de las relaciones molares utilizadas para calcular las cantidades de reactivos y de la molécula SD133\* que se añadieron en las reacciones de funcionalización.

### 2.2.1 Bioconjugación directa de SD133\*

La reacción de unión directa consta de dos partes. En la primera se mezclaron el virus a funcionalizar (BMV o CCMV) junto con los reactivos 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida

(NHS), en solución amortiguadora PBS pH 7.4 y se dejaron en agitación rotatoria durante 30 min a temperatura ambiente (Ta). Posteriormente se añadió la molécula SD133\* (2, 4 o 6 por proteína de cápside) y se completó el volumen para alcanzar un 10% de DMSO. El volumen final se consideró para que el virus permaneciera a concentración de 0.5 mg/mL. Toda la mezcla continuó en agitación rotatoria durante 3 h protegida de la luz a Ta. Al finalizar el tiempo, la reacción se diluyó para disminuir el porcentaje de DMSO a 2.5%. Finalmente, los virus funcionalizados se recuperaron por ultrafiltración utilizando un filtro Amicon (Merck) de 100 kDa. Como productos de esta reacción se obtuvieron las VNPs: BMV-2-SD133\*, BMV-4-SD133\*, BMV-6-SD133\*, CCMV-2-SD133\*, CCMV-4-SD133\*, CCMV-6-SD133\*.

## **2.2.2 Bioconjugación con ligando**

Al igual que la conjugación anterior, ocurre en dos partes. Primero se agregó la SD133\* junto con el reactivo de N-hidroxisuccinimida- PEG 400- Maleimida (NHS-PEG4-Mal, disuelto en DMSO anhidro) y se dejó en agitación rotativa cubierto de la luz durante 1 h. Posteriormente, se añadió el virus junto con el PBS pH 7.4 1X (90% v/v final); se colocó en agitación protegido contra la luz durante 3 h. Después del tiempo indicado, la reacción se diluyó para disminuir el porcentaje de DMSO a 2.5%. Finalmente, los virus funcionalizados se recuperaron por ultrafiltración utilizando un filtro Amicon (Merck) de 100 kDa. Como productos de esta reacción se obtuvieron las VNPs: BMV-PEG-2 SD133\*, BMV-PEG-4 SD133\*, BMV-PEG-6 SD133\*, CCMV-PEG-2 SD133\*, BMV-PEG-4 SD133\*, BMV-6-SD133\*

## **2.2.3 Caracterización de las partículas virales conjugadas con SD133\***

### **2.2.3.1 Determinación del diámetro hidrodinámico y potencial Z**

Se prepararon muestras de los virus control y bioconjugados a una concentración de 0.5 mg/mL en solución amortiguadora PBS pH 7.4. 200 µL de muestra se colocaron en una celda ZEN0040 y se midió el diámetro hidrodinámico por la técnica de dispersión de luz dinámica. Para medir el potencial Z las muestras se prepararon a concentración de 0.1 mg/mL y se cargó 1 mL en una celda capilar DTS1070. Ambas determinaciones se realizaron en el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.).

### 2.2.3.2 Microscopia electrónica de transmisión

Sobre rejillas de cobre cubiertas con carbono conteniendo como soporte el formvar de la marca ted pella (400 mesh, Cat. 01754-F), se depositaron muestras de 7  $\mu$ L de los virus nativos y sus versiones funcionalizadas a concentración de 0.1 mg/mL. Las muestras se mantuvieron durante 5 min y el exceso de líquido se removió con papel filtro Whatman N° 2. Posteriormente se agregaron 7  $\mu$ L de solución de acetato de uranilo al 4% los cuales se dejaron reposar durante 2 min. Terminado el tiempo indicado, se retiró el exceso de contraste con papel filtro. Finalmente, las preparaciones se guardaron en un desecador para eliminar la humedad remanente. Las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico de transmisión (TEM) H-7500 (Hitachi Ltd.) operado a 80 kV. Las micrografías obtenidas fueron analizadas con el programa ImageJ (National Institutes of Health).

### 2.2.4 Ensayos in vitro

#### 2.2.4.1 Cultivo celular

La línea celular de cáncer metastásico humano MDA-MB-231/GFP se cultivó en medio completo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Biowest) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB, Biowest), 1% de antibiótico/antimicótico (anti/anti 100x; Biowest) y 3.7 g/L de  $\text{NaHCO}_3$ . Además, se utilizó la línea celular 4T1 derivada de tumor de cáncer de mama de ratón de la cepa BALB/cfC3H. Esta se cultivó en medio completo Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640; Biowest) suplementado con 10% (v/v) SFB, (Biowest) y 1% de anti/anti (Biowest). Ambas líneas se incubaron a 37°C en atmosfera húmeda de 5% de  $\text{CO}_2$ .

Una vez que las células alcanzaron una confluencia del 80-90% se recolectaron por tripsinización y se hicieron sub-cultivos. Para ello, se les retiró el medio y se les añadió una solución de tripsina/EDTA (0.05% tripsina y 10 mM EDTA; Corning Cellgro), con la que se incubaron a 37°C por 5 min. Después, se les agregó medio completo y todo el contenido de la caja de cultivo se pasó a un tubo para llevar a centrifugar a 1200 rpm por 5 min. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla celular con medio nuevo. Las células fueron sembradas en cajas de cultivo nuevas.

#### 2.2.4.2 Ensayo de herida

El protocolo para este ensayo se aplicó de la misma manera para la línea celular MDA-MB-231/GFP y 4T1, utilizando el medio correspondiente para cada una. Para comenzar las células fueron tripsinizadas y contabilizadas en una cámara de Neubauer. Después, en una placa de 12 pozos se depositaron 60000 células por pozo junto con 2mL de medio completo nuevo. La placa se dejó en incubación en las condiciones previamente mencionadas durante 12 h. Posteriormente las células se sincronizaron a fase G0/G1, para lo cual se descartó el medio completo y se les agregó medio sin SFB para dejar incubando en período de hambruna durante 12 h. Transcurrido este período de hambruna, se le realizó el cambio a medio completo nuevamente y se dejaron crecer hasta alcanzar un 80% de confluencia.

Una vez formada el monocapa celular se realizó la herida atravesando cada pozo con una punta estéril para micropipeta de 200  $\mu$ L. Nuevamente se descartó el medio viejo y se agregó nuevo junto con las partículas virales, que fueron el BMV y CCMV nativos, que funcionan como controles, el BMV-SD133, BMV-PEG-SD133, CCMV-SD133, CCMV-PEG-SD133, que son los tratamientos de interés, así como la molécula libre SD133 a concentración de 5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M. Ya que la SD133\* esta disuelta en DMSO también se agregó un control de DMSO a 10  $\mu$ M. Cada placa se colocó en una incubadora acoplada al microscopio Lumascope 720 (Etaluma Inc.), que se programó para tomar una fotografía de cada pozo cada 10 min durante 24 h. Las imágenes fueron analizadas con el programa ImageJ (National Institutes of Health) y el complemento *Wound\_healing\_size\_tool* desarrollado por Suarez-Arnedo et al. (2020).

#### 2.2.5 Ensayos *in vivo*

##### 2.2.5.1 Manejo y cuidado de ratones

Todos los experimentos con ratones se realizaron siguiendo las normas NOM-062-ZOO-1999 y NOM-087-ECOL-1995. Se adquirieron 26 ratones de la cepa BALB/cAnNCrI hembras de entre 4 y 5 semanas de edad provenientes de la unidad de producción de la UAM-Xochimilco. El día de la recepción se tomó el peso de cada uno de los ratones para después alojarlos en grupos de 5 en cajas de plexiglás preparadas con una cama de virutas de Aspen (Nepco), agua potable y alimento solido (LabDiet), así como un rollo de cartón y un pañuelo de papel. Las jaulas fueron colocadas en un condominio Optimice (Animal care Systems),



instalado en una habitación a 22°C y con ciclos controlados de 12 h de luz/12 h de oscuridad. El cambio de los ratones a cajas limpias se hizo cada 14 días.

#### 2.2.5.2 Cultivo de células 4T1 para la inoculación

El cultivo de células se 4T1 se llevó a cabo como se describe en la sección 2.2.4.1. El día de la inoculación las células se lavaron 2 veces con 6 mL de PBS. Luego, se incubaron por 5 min con 1.5 mL de tripsina/EDTA. La reacción se neutralizó con 8.5 mL de RPMI frío (4 °C) y esta suspensión celular se centrifugó a 400xg por 10 min a 4 °C. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con PBS frío centrifugando en las últimas condiciones mencionadas. El botón celular se resuspendió en 2 mL de PBS frío y se contaron las células mediante tinción con azul de tripano en una cámara de Neubauer. Por último, se ajustó la concentración a 10<sup>5</sup> células/25µL de PBS.

#### 2.2.5.3 Formación de tumores primarios de cáncer de mama en ratones

Los ratones ya de 6 a 7 semanas de edad fueron pesados y después inoculados con 10<sup>5</sup> células 4T1/25 µL PBS, en la cuarta glándula mamaria izquierda y derecha usando una jeringa de insulina de 300 µL con aguja de 30G. El estado de los ratones y el desarrollo de los tumores fueron monitorizados hasta que los tumores fueron palpables. El día 9 post-inoculación se tomó el peso de los ratones y fue posible medir el largo (L) y ancho (A) de todos los tumores utilizando un calibrador Vernier. Con estos datos fue posible hacer la estimación del volumen (V) de cada tumor usando la fórmula:

$$V = \frac{(L \cdot A^2)}{2} \quad (1)$$

#### 2.2.5.4 Administración peri-tumoral de los tratamientos

Los ratones se dividieron en 4 grupos homogéneos respecto al volumen de sus tumores, para recibir los tratamientos. Un grupo de 7 ratones fue asignado para recibir el vehículo o placebo que fue PBS (pH 7.4). A un grupo de 6 ratones se les administró 100 µg de BMV nativo, 7 ratones recibieron 1.3 µg de molécula SD133\* libre, y 6 ratones 100 µg de BMV-PEG-SD133\* que llevan 1.3 µg del farmacóforo. Las cantidades indicadas fueron administradas por tumor. El día 10 post-inoculación se realizó la primera administración

de 25  $\mu\text{L}$  de cada tratamiento mencionado por vía peri-tumoral usando una jeringa de 300  $\mu\text{L}$ . Las siguientes administraciones fueron los días 13, 17, 20, 24 y 25 post-inoculación. El peso de los ratones, así como el ancho y largo de los tumores se continuó midiendo un día antes o el mismo día de cada administración.

#### 2.2.5.5 Eutanasia de los ratones y disección de los tumores primarios

A la conclusión del experimento, los ratones fueron anestesiados con pentobarbital (90 mg/Kg, i.p.), se confirmó la profundidad de la anestesia por la ausencia de reflejo en las patas traseras. Los ratones anestesiados fueron eutanasiados por el método de dislocación cervical. Posteriormente, se extrajeron los tumores, se pesaron y se tomaron imágenes digitales.

### 2.3 Análisis estadístico

Los resultados de caracterización y ensayos *in vivo* se analizaron estadísticamente por ANOVA de una vía (para una sola variable) o ANOVA de dos vías (para dos variables) con la prueba post-hoc de Dunnett, para comparaciones de medias, con intervalo de confianza (IC) de 95%. Las pruebas se realizaron a través del programa estadístico Minitab. Los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

### 2.4 Obtención del Nanoanticuerpo anti-CDH11

#### 2.4.1 Cultivo de las transformantes 5 $\alpha$ F'

Se contaba con el stock de glicerol de transformantes *E. coli* cepa 5 $\alpha$ F', que contenían los fagémidos pComb3XSS con los genes VHH anti-CDH11 seleccionados por Rosales-Fuerte (2020). Se realizó un pre-cultivo de 5 mL de dichas células en medio LB a 37 °C, agitando a 200 rpm, durante una noche (12-16 h). Transcurrido el tiempo de incubación, se hicieron diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  del pre-cultivo y se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de este y de cada dilución para sembrarlos por extensión en placas de LB agar suplementadas con 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de ampicilina y 2% de glucosa. Las 4 placas se incubaron a 37 °C por 24 h.

Una nueva placa de LB agar-100 µg/µL de ampicilina-2% de glucosa, fue dividida en cuadrantes de 1 x 1 cm numerados del 1 al 30. De la placa correspondiente a la dilución  $10^{-3}$  se tomaron 30 colonias aisladas, es decir, cada una se raspó y se estrío en una sección de la placa cuadrículada, respetando los límites marcados. Finalmente, la placa se dejó en incubación a 37 °C por 24 h.

#### 2.4.2 PCR de colonias 5αF'

De la placa cuadrículada, se seleccionaron al azar 20 de las colonias aisladas y numeradas. Cada una se muestreo en condiciones de esterilidad, y se resuspendió en 40 µL de agua Mili-Q, en tubos para PCR. Estos tubos, se colocaron en el termociclador a 95 °C por 10 min.

Por otra parte, para cada 10 muestras, se preparó la mezcla de componentes para PCR como se describe en la Tabla 1. Las secuencias de los oligonucleótidos VHHBack-*Sfil* y VHHFor-*Sfil*, se encuentran en el Anexo A, Tabla 21.

**Tabla 1.** Mezcla de componentes para realizar la PCR de colonia.

| Componente                                     | Volumen (µL) |
|------------------------------------------------|--------------|
| Agua Mili-Q                                    | 42           |
| Ready Mix Taq PCR Reaction mix (Sigma Aldrich) | 100          |
| VHHBack- <i>Sfil</i> (10 µM)                   | 4            |
| VHHFor- <i>Sfil</i> (10 µM)                    | 4            |

En nuevos tubos para PCR, se agregaron 15 µL de la mezcla para la reacción, más 5 µL de cada colonia, anteriormente resuspendida en agua Mili-Q. También, se colocó un tubo con los componentes, pero con 5 µL del vector pComb3XSS-VHH (5 ng/µL), para tener un control positivo.

Las muestras se colocaron en un termociclador MyCycler (BIO-RAD) y se programaron las condiciones de reacción señaladas en la Tabla 2. Al terminar, los productos de la PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

**Tabla 2.** Condiciones del termociclador para el PCR de colonia.

| Ciclos | Temperatura (°C) | Tiempo |
|--------|------------------|--------|
| 1      | 95               | 2 min  |
| 30     | 95               | 20 s   |
|        | 65               | 20 s   |
|        | 72               | 15 s   |
| 1      | 72               | 1 min  |

### 2.4.3 Purificación y PCR del ADN plasmídico

Diez de las colonias analizadas por PCR, presentaron el gen VHH de alrededor de 400 pb. Cada una de las colonias identificadas, se tomó de la placa cuadrículada con un asa bacteriológica y se sembró en 5 mL de LB-100 µg/ml ampicilina-2% de glucosa, para dejar en incubación a 37 °C y agitación a 200 rpm, por una noche (12-16 h). Posteriormente, el ADN de cada colonia se purificó usando el GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific).

La concentración de los ADN plasmídicos purificados se obtuvo midiendo la absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop 2000c (Thermo Scientific). Se prepararon muestras de 500 ng de cada plásmido, más 1 µL del cebador VHHBack-Sfil (10 µM) y se enviaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología-UNAM.

**Tabla 3.** Mezcla de componentes para realizar la PCR de los ADN plasmídicos purificados.

| Componente                                     | Volumen (µL) |
|------------------------------------------------|--------------|
| Agua Mili-Q                                    | 82           |
| Ready Mix Taq PCR Reaction mix (Sigma Aldrich) | 100          |
| VHHBack-Sfil (10 µM)                           | 4            |
| VHHFor-Sfil (10 µM)                            | 4            |

Después, se realizó una PCR de los plásmidos purificados, para lo cual se preparó la mezcla de componentes como se indica en la Tabla 3.

En tubos para PCR se agregaron 19  $\mu\text{L}$  de la mezcla de componentes, con 1  $\mu\text{L}$  de los plásmidos purificados y para el control, con 1  $\mu\text{L}$  del vector pComb3XSS-VHH (5 ng/ $\mu\text{L}$ ). Las reacciones se colocaron en el termociclador programado en las condiciones mostradas en la tabla. Por último, los productos de la PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

#### **2.4.4 Transformación en células electrocompetentes TOP10F'**

A los ADN plasmídicos extraídos de las colonias número 10, 18, 19 y 26, se les asignaron las letras A, B, C y D, respectivamente. Para transformar la cepa de expresión, se retiraron de ultracongelación ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 200  $\mu\text{L}$  de células *E. coli* electrocompetentes TOP10F' (Invitrogen) e inmediatamente se colocaron en hielo junto con 4 celdas estériles para electroporación. Después, 4 tubos para microcentrífuga de 1.5 mL, se colocaron en hielo y, una vez fríos, se agregaron a cada uno 50  $\mu\text{L}$  de las células TOP10F', junto con 2  $\mu\text{L}$  de los ADN plasmídicos A, B, C o D (un plásmido diferente para cada tubo).

Luego, se mezclaron por inversión cuidadosamente y se dejaron reposar en hielo durante 1 min. El contenido de los tubos se transfirió a las celdas para electroporación frías y de una en una, se colocaron en la cámara del equipo *E. coli* Pulser, programado para generar un pulso eléctrico de 2.5 kV (voltaje necesario cuando se usan cubetas de 0.2 cm). El equipo se accionó una vez por cada celda, para enviar la carga eléctrica a las células. Inmediatamente después, se retiró la celda de la cámara y se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de medio SOC para resuspender las células, rápida pero suavemente. Cada suspensión celular, se transfirió a tubos de 1.5 mL que posteriormente se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 h, agitando a 200 rpm.

De cada cultivo de células transformadas se tomaron 10  $\mu\text{L}$  y se llevaron a un volumen final de 1 mL en medio LB, para obtener una dilución  $10^{-2}$ . De los cultivos diluidos, se tomaron 50  $\mu\text{L}$  para sembrarlos por extensión en placas de LB agar-100  $\mu\text{g/mL}$  ampicilina, que se dejaron incubando 24 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Cuatro cajas nuevas de LB agar-100  $\mu\text{g/mL}$  ampicilina se dividieron en cuadros pequeños numerados y de cada placa de transformantes TOP10F', se tomaron 30 colonias aisladas para sembrar e identificar cada una en la placa cuadrículada, siguiendo el procedimiento que se describe a detalle en la sección 2.3.1.

### **2.4.5 Estandarización del protocolo de expresión del dominio VHH**

Se estableció el protocolo de expresión del gen VHH usando el sistema pComb3XSS-TOP10F', en base a lo reportado por Andris-Widhopf et al. (2000), Ghamghami et al. (2020) y Lim et al. (2004).

De las placas A, B, C y D de transformantes TOP10F' se tomaron diferentes colonias numeradas para cultivar cada una en 5 mL de LB-100 µg/mL ampicilina durante una noche (12-16 h). Después, 1 mL de los pre-cultivos, se transfirió a 10 mL de LB-100 µg/mL ampicilina. Estos cultivos se dejaron incubando a 37 °C, en agitación a 200 rpm y se monitorizaron cada hora hasta que alcanzaron una densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) de entre 0.6 a 1 (que alcanzara la DO adecuada, tomaba un tiempo de entre 3-4 h). Luego, se les añadió Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) hasta alcanzar una concentración final de 3 mM, para inducir la expresión de la proteína incubando el cultivo a 30 °C, en agitación a 200 rpm. De cada placa de transformantes se seleccionaron las primeras 4 colonias; con las colonias de las placas A y B se probó un tiempo de inducción de 5 h y con las de las placas C y D se probó la inducción por 24 h. Pasado el tiempo de incubación indicado, se recolectaron las células por centrifugación a 6000xg por 15 min a Ta. Las pastillas celulares se resuspendieron con 0.5 mL de solución amortiguadora TES (Tris-HCl 50 mM, EDTA 0.53 mM, 20% sacarosa, pH 7.2 y filtrado con 0.2 µm) frío y se agregó fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) para alcanzar una concentración de 1 mM. Las muestras se pasaron a tubos para microcentrífuga de 1.5 mL y se llevaron a ultracongelación a -80 °C durante 1 h. Después, se retiraron del ultracongelador y una vez descongelados volvieron a congelarse 1 h más. Este ciclo de congelación-descongelación se realizó 5 veces (5 h aprox.).

Posteriormente, se centrifugaron a 13000xg durante 30 min a 4°C. Se recuperaron los sobrenadantes, los cuales corresponden al extracto periplásmico (Ex. P.). Se tomaron muestras de 50 µL de cada uno para realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida 15%-SDS y el resto se almacenó a -20 °C.

### **2.4.6 Estandarización del protocolo de extracción de proteínas del espacio periplásmico**

El proceso de extracción de proteínas se realizó de acuerdo a lo descrito por Andris-Widhopf et al. (2000), Ghamghami et al. (2020) y Lim et al. (2004). Para la estandarizar este protocolo, se tomaron las colonias C1 y D4 que mostraron expresión de una proteína de aproximadamente 15 kDa, correspondiente al Nb, con el tiempo de inducción de 24 h. Ambas colonias se cultivaron en 5 mL de LB-100 µg/mL ampicilina

durante una noche a 37 °C agitando a 200 rpm. Luego, 3 mL del pre-cultivo se pasaron a 30 mL de LB-100  $\mu\text{g/mL}$  ampicilina y el nuevo cultivo se incubó a 37 °C a 200 rpm hasta alcanzar la  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0.7-1.0. En este momento, se indujo el cultivo con IPTG 3 mM y se incubó a 30 °C agitando de 200 rpm durante 24 h. Después, se tomaron muestras de 1 mL de cada cultivo para almacenar tubos de microcentrífuga a -20 °C. Todo el volumen restante se centrifugó a 6000xg por 15 min a Ta para recolectar las células. Posteriormente, cada botón celular se resuspendió en 10 mL de solución amortiguadora TES fría y también se añadió PMSF 1 mM. Se tomaron 2 muestras de 1 mL en tubos para microcentrífuga por cada cultivo. Uno de los tubos de cada colonia se colocó en incubación en hielo 5 h. El otro se llevó a congelar a -80 °C por 15 min, luego se descongeló en hielo 15 min y se repitió el ciclo de congelación-descongelación una vez más, para después poner a incubación en hielo 4 h. De ambos tubos por cultivo se tomaron muestras de 100  $\mu\text{L}$  a la primer y tercer hora del proceso de extracción. Cada muestra se iba centrifugando a 13000xg, 30 min a 4 °C, así como el resto de la muestra a las 5 h. Por último, se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de los sobrenadantes para correr electroforesis en gel de poliacrilamida 15%-SDS.

#### **2.4.7 Selección del protocolo de purificación del Nb**

Se probaron las técnicas de cromatografía por afinidad a iones metálicos (IMAC), precipitación con sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) y cromatografía de exclusión molecular (SEC), para obtener la proteína purificada. Para estos ensayos, se escogió la proteína expresada por la colonia D4. Primeramente, se realizó la expresión y extracción a mayor escala, con los protocolos previamente estandarizados. Un cultivo de 500 mL de D4 en medio LB-100  $\mu\text{g/mL}$  ampicilina a  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  0.7-1.0 se indujo con IPTG 3 mM incubando por 24 h a 30 °C y agitando a 200 rpm. A continuación, el cultivo se centrifugó a 6000xg, 15min, se descartó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió con 25 mL de solución amortiguadora TES fría y 1 mM de PMSF. La mezcla se dejó incubando por 1 h en hielo y luego consiguió el extracto periplásmico centrifugando a 13000xg 30 min a 4 °C.

##### **2.4.7.1 Cromatografía por afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC)**

Se utilizó una columna para cromatografía por afinidad níquel HisTrap (Cytiva) de 5 mL, que se lavó con 10 volúmenes de agua Mili-Q, usando la bomba peristáltica a 5 mL/min. Luego, se equilibró con 10 volúmenes de solución amortiguadora de unión ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 2 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol y 10 mM Imidazol) a 2 mL/min. En seguida, también a 2 mL/min, se pasaron por la

columna los 25 mL de extracto periplásmico y después, se hizo un lavado pasando nuevamente 50 mL de solución amortiguadora de unión. Finalmente, la proteína se eluyó con 10 mL de solución amortiguadora de elución ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 2 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol y 500 mM Imidazol) que se recolectaron en dos fracciones de 5 mL cada una. El resultado de la purificación se observó por electroforesis en un gel de poliacrilamida 15%-SDS.

#### 2.4.7.2 Precipitación con sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$

Para probar este método, 5 mL de extracto periplásmico se repartieron en alícuotas de 1 mL en tubos para microcentrífuga. A cada tubo se le agregaron diferentes cantidades de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , para obtener soluciones al 20%, 40%, 60% y dos muestras al 80% de esta sal. Los tubos se centrifugaron a 10000 rpm por 30 min y se separaron las pastillas de los sobrenadantes. Las pastillas se resuspendieron en 100  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora TES y únicamente una de las muestras precipitadas con 80% de la sal, se centrifugó una vez más a 13000 rpm por 20 min para recuperar solo el sobrenadante. Muestras, tanto de las pastillas resuspendidas como de los sobrenadantes, se analizaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida 15%-SDS.

#### 2.4.7.3 Cromatografía de exclusión molecular (SEC)

Primero, los 25 mL de extracto periplásmico se concentraron por ultrafiltración utilizando un filtro Amicon (Merck) de 10 kDa. Posteriormente, se le realizaron 3 lavados con solución amortiguadora TE (Tris-HCl 50 mM, EDTA 0.53 mM, pH 7.2) usando el mismo filtro. La muestra se dejó en un volumen de aproximadamente 1 mL que se llevó a centrifugar a 10000 rpm por 5 min, para eliminar los remanentes de sacarosa. Se recuperó el sobrenadante que correspondía al extracto periplásmico en solución amortiguadora TE.

Para implementar la técnica de purificación, se utilizó el sistema de cromatografía líquida ÄKTA prime plus (GE Healthcare) con una columna HiPrep Sephacryl S-100 HR (Cytiva) equilibrada con solución amortiguadora  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.4, 150 mM NaCl, 15% glicerol y 2 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol. Se inyectaron 5 mL de muestra y posteriormente las proteínas se eluyeron en 120 mL de la misma solución amortiguadora que se recolectaron en fracciones de 1 mL.



Las fracciones de interés correspondientes a los picos de absorción a 280 nm, observados en el cromatograma se analizaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida 15%-SDS. Las que contenían la proteína de  $\approx 15$  kDa pura, es decir el Nb expresado por la colonia D4 (NbD4), se mezclaron y concentraron. La proteína purificada se cuantificó por método de Bradford.

#### **2.4.8 Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)**

La capacidad de la proteína purificada para unirse al EC1-CDH11, se demostró mediante un ensayo de ELISA, usando una placa de fondo plano de 96 pocillos Nunc MaxiSorp (Invitrogen). En uno de los pozos se agregaron 50  $\mu$ L del anticuerpo de detección de anti-hemaglutinina conjugado a peroxidasa de rabano (HRP-anti-HA.11, BioLegend) (0.02  $\mu$ g/ $\mu$ L), en otro 50  $\mu$ L del NbD4 (0.1  $\mu$ g/ $\mu$ L) recién purificado, y otro con 50  $\mu$ L del antígeno EC1-CDH11 (0.1  $\mu$ g/ $\mu$ L, secuencia en el Anexo B). Posteriormente, la placa se dejó incubando a 4 °C por una noche (12-16 h). Al día siguiente, los pozos se lavaron con 200  $\mu$ L de solución PBST (0.05% Tween-20 en PBS, pH 7.4) 3 veces, por 5 min cada vez, en agitación basculante. Después, se agregaron a los pozos con muestra y a uno más vacío, 200  $\mu$ L de solución de bloqueo (1% de albúmina sérica bovina [BSA] en PBST), que se dejaron incubando por 2 h agitando a Ta. Terminado el tiempo de incubación, se repitieron los lavados con PBST (3 veces por 5 min cada uno). Luego, a todos los pozos del ensayo, se les añadieron 50  $\mu$ L del NbD4, 10  $\mu$ M, diluido en solución de bloqueo. Este se dejó incubando por 1 h en agitación a Ta. Se repitieron los lavados y luego se agregaron 50  $\mu$ L de solución 1:5000 de HRP-anti-HA.11, en solución de bloqueo. Una vez más, la placa se incubó por 1 h a Ta, agitando. Se realizó otra ronda de lavados y finalmente, se añadieron 50  $\mu$ L de sustrato quimioluminiscente de peroxidasa a base de luminol (Sigma Aldrich). Después de 15 min, se midió la emisión de quimioluminiscencia (sin fuente de excitación) en el espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse (Agilent), con un tiempo de apertura de 50 s.

## Capítulo 3. Resultados

### 3.1 Caracterización de las VNPs conjugadas con Sd-133\*

#### 3.1.1 Diámetro hidrodinámico y potencial Z

Todas las VNPs bioconjugadas con SD133\* se caracterizaron por DLS para determinar su tamaño promedio en suspensión y su potencial Z a pH de 7.4. En la Tabla 4, se aprecia que el diámetro hidrodinámico de las partículas de BMV-2 SD133\* y BMV-4 SD133\*, se mantuvo similar al control, en cambio, se redujo notablemente en las partículas de BMV-6 SD133\*. Dicho cambio en el tamaño fue significativo de acuerdo con el análisis estadístico que arrojó un valor  $p=0.003$  (Tabla 5). En cuanto al potencial Z, solo hubo pérdida importante de la carga negativa en las BMV-2 SD133\* (Tabla 4) pues en la prueba de Dunnett se encontró diferencia significativa de este con respecto al control ( $p=0.042$ , Tabla 5).

**Tabla 4.** Diámetro hidrodinámico y potencial Z de las partículas de BMV-SD133\*

| Virus        | Diámetro hidrodinámico (nm) | Potencial Z (mV) pH 7.4 |
|--------------|-----------------------------|-------------------------|
| BMV control  | 31.6 ± 4.3                  | -15.1 ± 1.8             |
| BMV-2 SD133* | 32.4 ± 5.9                  | -11.9 ± 1.5             |
| BMV-4 SD133* | 31.5 ± 4.1                  | -13.8 ± 0.8             |
| BMV-6 SD133* | 23.9 ± 3.9                  | -14.9 ± 0.8             |

**Tabla 5.** Pruebas simultáneas de Dunnett para la media del diámetro hidrodinámico y potencial Z de las BMV-SD133\*

| Diferencia de niveles      | Diámetro hidrodinámico   |           | Potencial Z              |           |
|----------------------------|--------------------------|-----------|--------------------------|-----------|
|                            | Diferencia de las medias | Valor $p$ | Diferencia de las medias | Valor $p$ |
| BMV-2 SD133* - BMV control | 0.84                     | 0.894     | 3.20                     | 0.042     |
| BMV-4 SD133* - BMV control | -0.15                    | 0.999     | 1.23                     | 0.547     |
| BMV-6 SD133* - BMV control | -7.46                    | 0.003     | 0.20                     | 0.995     |

Acerca de las partículas de BMV PEGiladas, no se observó cambio en su tamaño en suspensión (Tabla 6) por ende, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas de este parámetro (Tabla 7). Sin embargo, el potencial Z fue considerablemente más negativo en las BMV-PEG-4 SD133\* y BMV-PEG-6

SD133\*, alcanzando una diferencia de medias con respecto al control de -5.07 y -7.53 respectivamente, por lo cual esta modificación en la carga de las partículas si posee significancia estadística (Tabla 7 y Tabla 6 y Tabla 7).

**Tabla 6.** Diámetro hidrodinámico y potencial Z de las partículas de BMV-PEG-SD133\*.

| Virus             | Diámetro hidrodinámico (nm) | Potencial Z (mV) pH 7.4 |
|-------------------|-----------------------------|-------------------------|
| BMV control       | 29.0 ± 5.4                  | -15.1 ± 1.8             |
| BMV- PEG-2 SD133* | 28.8 ± 4.7                  | -12.6 ± 0.9             |
| BMV- PEG-4 SD133* | 28.6 ± 5.3                  | -20.1 ± 1.3             |
| BMV- PEG-6 SD133* | 29.2 ± 4.9                  | -22.6 ± 0.7             |

**Tabla 7.** Pruebas simultáneas de Dunnett para la media del diámetro hidrodinámico y potencial Z de BMV-PEG-SD133\*.

| Diferencia de niveles         | Diámetro hidrodinámico   |                | Potencial Z              |                |
|-------------------------------|--------------------------|----------------|--------------------------|----------------|
|                               | Diferencia de las medias | Valor <i>p</i> | Diferencia de las medias | Valor <i>p</i> |
| BMV-PEG-2 SD133*- BMV control | -0.283                   | 0.810          | 2.43                     | 0.105          |
| BMV-PEG-4 SD133*- BMV control | -0.483                   | 0.497          | -5.07                    | 0.003          |
| BMV-PEG-6 SD133*- BMV control | -0.193                   | 0.924          | -7.53                    | 0.000          |

Por otra parte, se encontró que el diámetro de CCMV aumentó al bioconjugarlo con mayor cantidad de SD133\*, lo que se presenta en la Tabla 8. Además, en la misma tabla se aprecia que el valor de potencial fue menor cuando las partículas fueron funcionalizadas, y este valor se mantuvo cercano (aproximadamente 17 mV) sin importar el número de moléculas por proteína de cápside. Sin embargo, ninguno de los cambios en ambos parámetros fue estadísticamente significativo con base a los resultados de la prueba de Dunnett mostrados en la Tabla 9.

**Tabla 8.** Diámetro hidrodinámico y potencial Z de las partículas de CCMV-SD133\*

| Virus         | Diámetro hidrodinámico (nm) | Potencial Z (mV) pH 7.4 |
|---------------|-----------------------------|-------------------------|
| CCMV control  | 32.6 ± 6.4                  | -19.1 ± 1.2             |
| CCMV-2 SD133* | 32.5 ± 6.4                  | -17.5 ± 0.8             |
| CCMV-4 SD133* | 33.7 ± 6.8                  | -17.1 ± 1.0             |
| CCMV-6 SD133* | 33.9 ± 6.4                  | -17.3 ± 0.3             |

**Tabla 9.** Pruebas simultáneas de Dunnett para la media del diámetro hidrodinámico y potencial Z de CCMV-SD133\*.

| Diferencia de niveles       | Diámetro hidrodinámico   |                | Potencial Z              |                |
|-----------------------------|--------------------------|----------------|--------------------------|----------------|
|                             | Diferencia de las medias | Valor <i>p</i> | Diferencia de las medias | Valor <i>p</i> |
| CCMV-2 SD133*- CCMV control | -0.180                   | 0.972          | 1.667                    | 0.128          |
| CCMV-4 SD133*- CCMV control | 1.100                    | 0.161          | 2.000                    | 0.066          |
| CCMV-6 SD133*- CCMV control | 1.350                    | 0.080          | 1.833                    | 0.092          |

Finalmente, de manera similar a las partículas anteriores, las de CCMV-PEG-SD133\* mostraron un incremento del diámetro al reaccionar con mayor cantidad del polímero y la molécula (Tabla 10). Pero, en este caso el cambio de tamaño en CCMV-PEG-4 SD133\* y CCMV-PEG-6 SD133\* si se consideró estadísticamente significativo (Tabla 11). Además, el potencial Z de CCMV-PEG-4 SD133\* de  $-12.6 \pm 1.2$ , disminuyó notablemente respecto al control ( $-19.1 \pm 1.2$ , Tabla 10). Aunque el potencial de las otras partículas de CCMV PEGiladas solo bajo a aproximadamente -16 mV, también fueron cambios estadísticamente significativos, ya que el valor *p* de la prueba de comparación de medias de estas VNPs está por debajo de 0.05 (Tabla 11).

**Tabla 10.** Diámetro hidrodinámico y potencial Z de las partículas de CCMV-PEG-SD133\*

| Virus             | Diámetro hidrodinámico (nm) | Potencial Z (mV) pH 7.4 |
|-------------------|-----------------------------|-------------------------|
| CCMV control      | $29.8 \pm 5.4$              | $-19.1 \pm 1.2$         |
| CCMV-PEG-2 SD133* | $30.1 \pm 6.9$              | $-16.1 \pm 0.8$         |
| CCMV-PEG-4 SD133* | $31.5 \pm 5.4$              | $-12.6 \pm 1.2$         |
| CCMV-PEG-6 SD133* | $32.6 \pm 6.7$              | $-16.7 \pm 0.7$         |

**Tabla 11.** Pruebas simultáneas de Dunnett para la media del diámetro hidrodinámico y potencial Z de BMV-PEG-SD133\*.

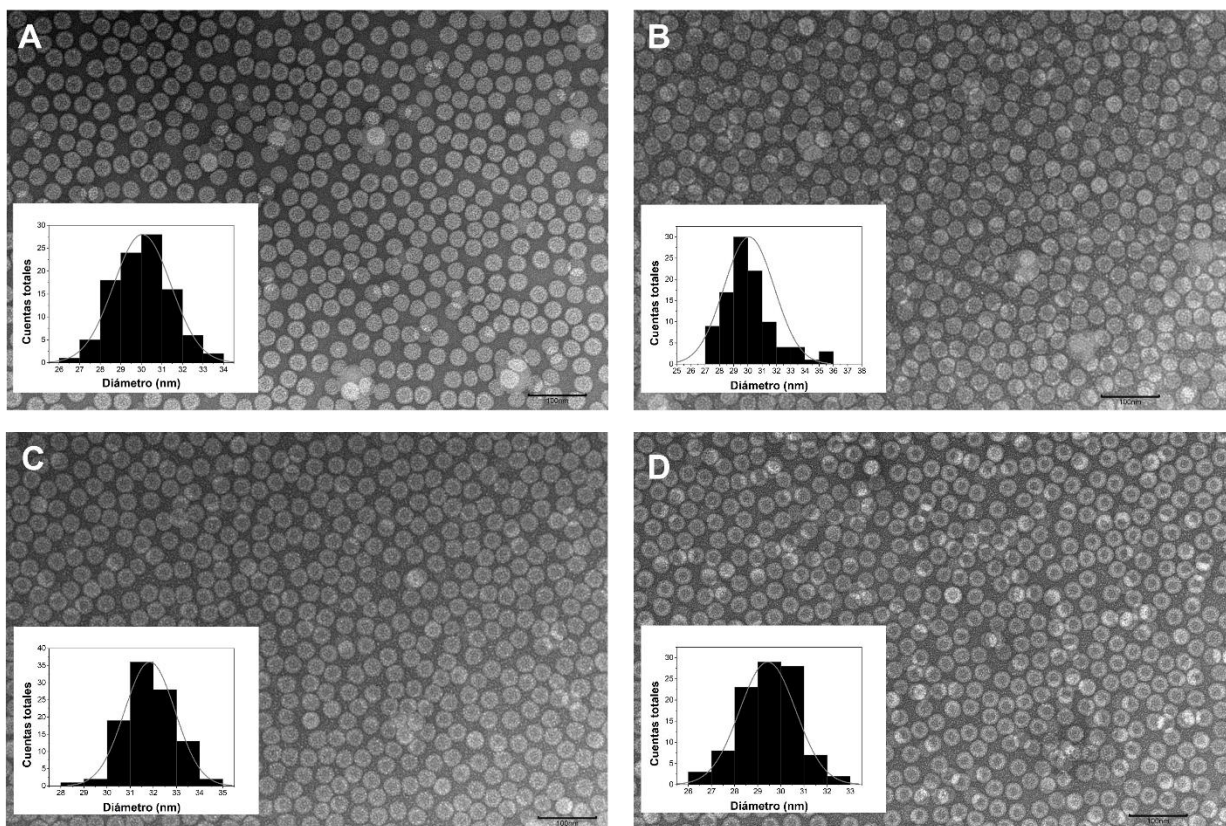
| Diferencia de niveles            | Diámetro hidrodinámico   |                | Potencial Z              |                |
|----------------------------------|--------------------------|----------------|--------------------------|----------------|
|                                  | Diferencia de las medias | Valor <i>p</i> | Diferencia de las medias | Valor <i>p</i> |
| CCMV-PEG-2 SD133* - CCMV control | 0.330                    | 0.906          | 3.033                    | 0.014          |
| CCMV-PEG-4 SD133* - CCMV control | 1.697                    | 0.058          | 6.567                    | 0.000          |
| CCMV-PEG-6 SD133*- CCMV control  | 2.763                    | 0.005          | 2.433                    | 0.042          |

### 3.1.2 Tamaño promedio de las VNPs

Se obtuvieron por TEM las micrografías de los virus control y funcionalizados con las diferentes cantidades de SD133\* y se midieron 100 partículas por imagen. Los viriones de todas las micrografías observadas se

mostraron íntegros y de geometría esférica. Con los datos obtenidos se realizaron las gráficas de distribución de tamaño y se calculó el diámetro promedio de cada virus. Además, se llevó a cabo el ANOVA de una vía con comparación de medias por el método de Dunnett para comparar la media de los virus funcionalizados con la media del virus control.

En la Figura 8, se observan las micrografías del BMV control, y con la molécula conjugada directamente a la cápside, es decir, BMV-2 SD133\*, BMV-4 SD133\* y BMV-6 SD133\*.



**Figura 8.** Micrografías de las partículas de BMV conjugadas con SD133\* obtenidas por TEM: (A) BMV control; (B) BMV-2 SD133\*, (C) BMV-4 SD133\* y D) BMV-6 SD133\*. Las gráficas de distribución de tamaño se muestran en la esquina inferior izquierda de cada micrografía. Barras de escala de 100 nm.

Los valores de diámetro promedio correspondientes se presentan en la Tabla 12, donde se puede apreciar, primero, como incrementó el tamaño de las partículas de  $30.0 \pm 1.4$  nm del BMV nativo a  $31.8 \pm 1.1$  nm del BMV-4 SD133\* y después disminuye 24% a  $29.4 \pm 1.2$  nm al recibir la mayor cantidad de SD133\*. La

Tabla 13 contiene los resultados de la prueba de Dunnett, en esta se observa que tanto BMV-4 SD133\* como BMV-6 SD133\* tuvieron un diámetro significativamente diferente al BMV control, indicado por los valores  $p=0.000$  y  $p=0.005$ , respectivamente.

**Tabla 12.** Tamaño de las BMV-SD133\*

| Virus        | Diámetro promedio (nm) |
|--------------|------------------------|
| BMV control  | $30.0 \pm 1.4$         |
| BMV-2 SD133* | $30.1 \pm 1.8$         |
| BMV-4 SD133* | $31.8 \pm 1.1$         |
| BMV-6 SD133* | $29.4 \pm 1.2$         |

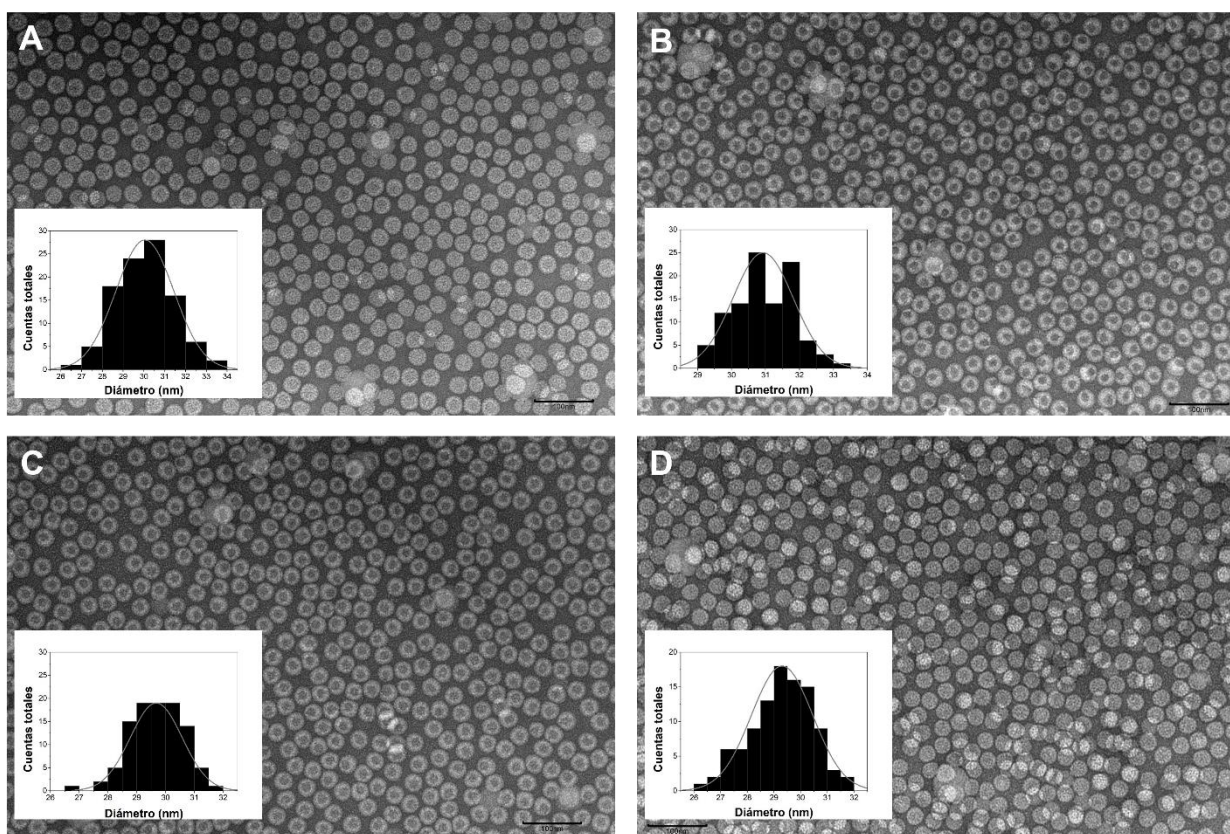
**Tabla 13.** Pruebas simultáneas de Dunnett para la media de tamaño de BMV-SD133\*

| Diferencia de niveles      | Diferencia de las medias | Valor $p$ |
|----------------------------|--------------------------|-----------|
| BMV-2 SD133* - BMV control | 0.037                    | 0.995     |
| BMV-4 SD133* - BMV control | 1.803                    | 0.000     |
| BMV-6 SD133* - BMV control | -0.613                   | 0.005     |

La Figura 9 es de las micrografías del BMV control y los tres tipos de BMV-PEG-SD133\* obtenidos. La Tabla 14 muestra los diámetros promedio de cada una de estas VNPs. En este caso, las partículas tendieron a reducir de tamaño conforme más PEG y farmacóforo fue dispuesto en la reacción. Pasaron de  $30.0 \pm 1.4$  nm en el control a  $29.30 \pm 1.1$  nm del BMV-PEG-6 SD133\*. Esta disminución en el tamaño resultó estadísticamente significativa al compararse con el BMV nativo (Tabla 15).

**Tabla 14.** Tamaño de las BMV-PEG-SD133\*

| Virus             | Diámetro promedio (nm) |
|-------------------|------------------------|
| BMV control       | $30.0 \pm 1.4$         |
| BMV- PEG-2 SD133* | $30.9 \pm 0.9$         |
| BMV- PEG-4 SD133* | $29.7 \pm 0.9$         |
| BMV- PEG-6 SD133* | $29.30 \pm 1.1$        |



**Figura 9.** Micrografías de las partículas de BMV PEGiladas y conjugadas con SD133\* obtenidas por TEM: A) BMV control; B) BMV-PEG-2 SD133\*; C) BMV-PEG-4 SD133\* y D) BMV-PEG-6 SD133\*. Las gráficas de distribución de tamaño se muestran en la esquina inferior izquierda de cada micrografía. Barras de escala de 100 nm.

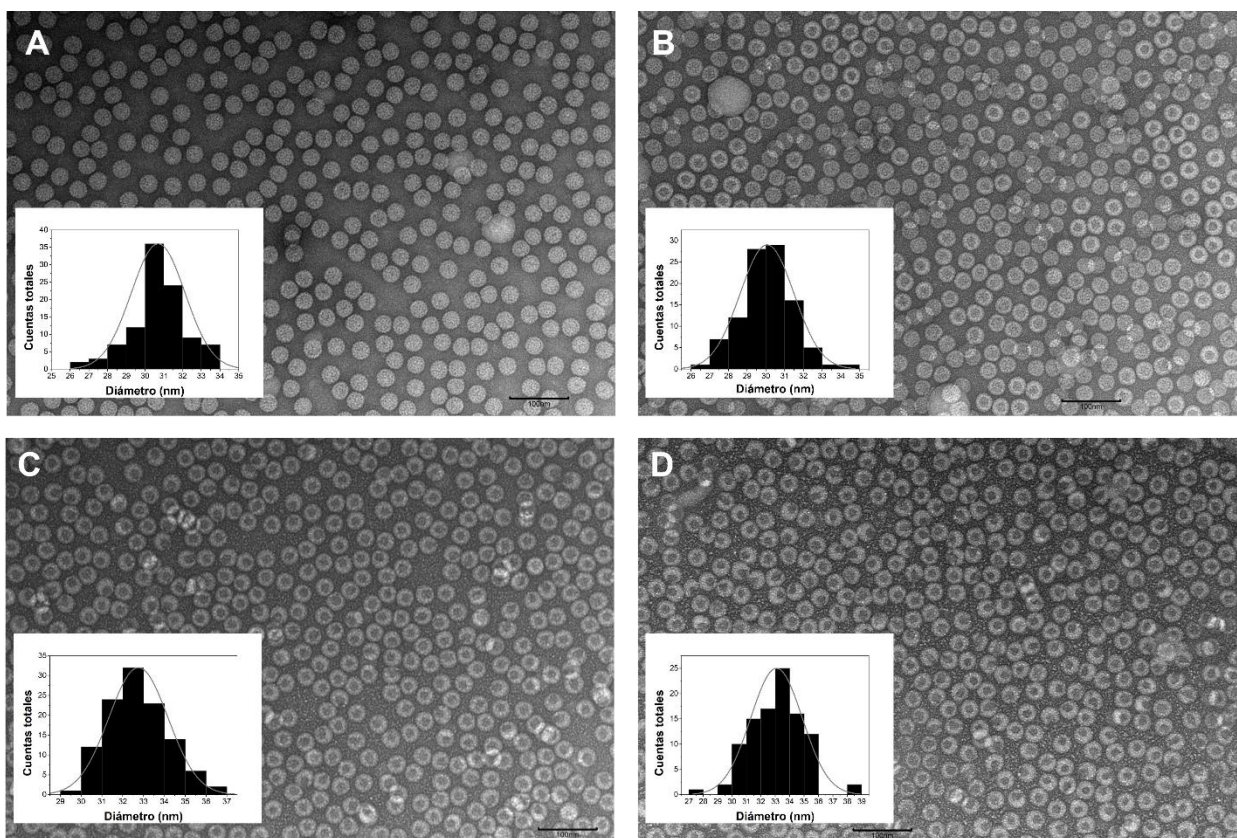
**Tabla 15.** Pruebas simultáneas de Dunnett para la media del tamaño de BMV PEG-SD133\*

| Diferencia de niveles         | Diferencia de las medias | Valor <i>p</i> |
|-------------------------------|--------------------------|----------------|
| BMV-PEG-2 SD133*- BMV control | 0.884                    | 0.000          |
| BMV-PEG-4 SD133*- BMV control | -0.367                   | 0.049          |
| BMV-PEG-6 SD133*- BMV control | -0.741                   | 0.000          |

Tal como se mostró anteriormente para el BMV, la Figura 10 corresponde a las micrografías del CCMV control, y las diferentes partículas de CCMV-SD133\*. La Tabla 16 presenta el diámetro promedio de cada uno el cual va en aumento junto con la cantidad de la molécula bioconjugada. El control tuvo un tamaño promedio de  $30.7 \pm 1.4$  nm, el CCMV-2 SD133\* permaneció prácticamente igual con  $30.1 \pm 1.4$  nm, el incremento comenzó en el CCMV-4 SD133\* con  $32.8 \pm 1.4$  nm, un 6.8% mayor, y llegó hasta 7.8% con  $33.1 \pm 1.8$  nm del CCMV-6 SD133\*. Dicho aumento de tamaño fue estadísticamente significativo guiándonos por los valores *p* de la prueba de Dunnett mostrados en la

Tabla 17.





**Figura 10.** Micrografías de las partículas de CCMV conjugadas con SD133\* obtenidas por TEM: A) CCMV control; B) CCMV-2 SD133\*; C) CCMV-4 SD133\* y D) CCMV-6 SD133\*. Las gráficas de distribución de tamaño se muestran en la esquina inferior izquierda de cada micrografía. Barras de escala de 100 nm.

**Tabla 16.** Tamaño de las CCMV-SD133\*.

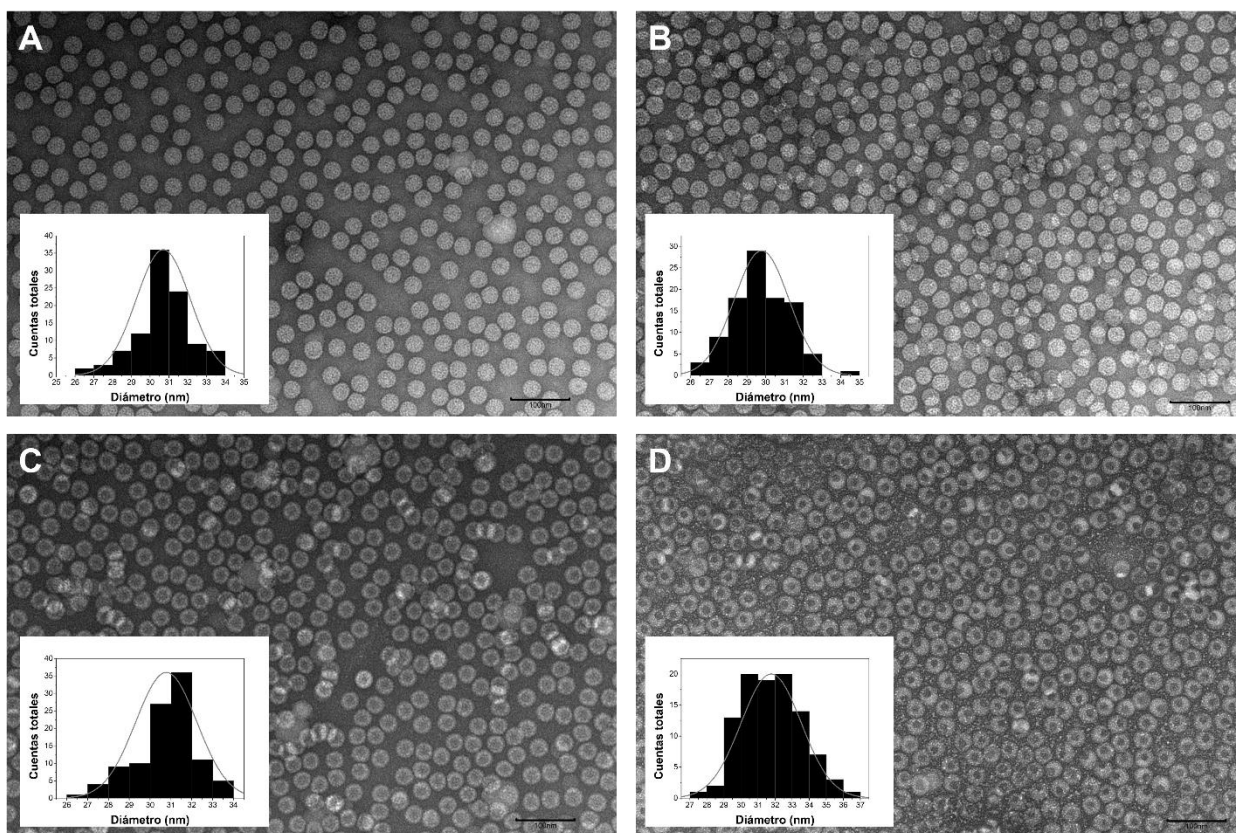
| Virus         | Diámetro promedio (nm) |
|---------------|------------------------|
| CCMV-CONTROL  | 30.7 ± 1.4             |
| CCMV-2 SD133* | 30.1 ± 1.4             |
| CCMV-4 SD133* | 32.8 ± 1.4             |
| CCMV-6 SD133* | 33.1 ± 1.8             |

**Tabla 17.** Pruebas simultáneas de Dunnett para la media del tamaño de CCMV-SD133\*.

| Diferencia de niveles        | Diferencia de las medias | Valor <i>p</i> |
|------------------------------|--------------------------|----------------|
| CCMV-2 SD133* – CCMV control | -0.639                   | 0.009          |
| CCMV-4 SD133* – CCMV control | 2.051                    | 0.000          |
| CCMV-6 SD133* – CCMV control | 2.386                    | 0.000          |



Finalmente, la Figura 11 corresponde a las micrográficas de TEM del CCMV control y las diferentes condiciones de CCMV-PEG-SD133\*. Como se presenta en la Tabla 18, CCMV-PEG-2 SD133\* tuvo un tamaño de  $29.8 \pm 1.5$  nm, significativamente menor al control, el CCMV-PEG-4 SD133\* permaneció igual al virus nativo, mientras que CCMV-PEG-6 SD133\* tuvo un tamaño de  $31.8 \pm 1.8$  nm significativamente mayor al control. La significancia entre estas diferencias de tamaño por medio de las pruebas de Dunnett, se presenta en la Tabla 19.



**Figura 11.** Micrográficas de las partículas de CCMV PEGiladas y conjugadas con SD133\* obtenidas por TEM: A) CCMV control; B) CCMV-PEG-2 SD133\*; C) CCMV-PEG-4 SD133\* y D) CCMV-PEG-6 SD133\*. Las gráficas de distribución de tamaño se muestran en la esquina inferior izquierda de cada micrografía. Barras de escala de 100 nm.

**Tabla 18.** Tamaño de las CCMV-PEG-SD133\*

| Virus               | Diámetro promedio (nm) |
|---------------------|------------------------|
| CCMV control        | $30.7 \pm 1.4$         |
| CCMV- PEG- 2 SD133* | $29.8 \pm 1.5$         |
| CCMV- PEG- 4 SD133* | $30.8 \pm 1.5$         |
| CCMV- PEG- 6 SD133* | $31.8 \pm 1.8$         |

**Tabla 19.** Pruebas simultáneas de Dunnett para la media del tamaño de CCMV-PEG-SD133\*.

| Diferencia de niveles           | Diferencia de las medias | Valor <i>p</i> |
|---------------------------------|--------------------------|----------------|
| CCMV-PEG-2 SD133*– CCMV control | -0.919                   | 0.000          |
| CCMV-PEG-4 SD133*– CCMV control | 0.074                    | 0.973          |
| CCMV-PEG-6 SD133*– CCMV control | 1.070                    | 0.000          |

En las micrograffías de la Figura 8. C y D, Figura 9. B y C., Figura 10. B, C y D y Figura 11. B, C y D, los viriones presentan el centro oscuro, lo que les da una apariencia de dona. Durante el análisis de las muestras se descubrió que, en inicio, las partículas virales se mostraban íntegras, como en las micrografías de ambos virus nativos, pero, a mayor tiempo de exposición al haz de electrones, las partículas adquirirían el aspecto de dona. Este fenómeno ocurrió más rápido y fue más evidente en las VNPs que reaccionaron con mayor cantidad de SD133\* (BMV- 6 SD133\*, BMV-PEG-6 SD133\*, CCMV-6 SD133\* y CCMV-PEG-6 SD133\*) lo que impidió tomar imágenes antes de que cambiaran su apariencia. Aun así se logró observar que los viriones no mostraron daño por las reacciones químicas, pero fueron más susceptibles al haz en relación con la modificación química de su superficie.

### **3.2 Evaluación de las VNPs bioconjugadas en cultivos celulares de MDA-MB-231 y 4T1**

Tras analizar los resultados de las caracterizaciones de todas las VNPs, se decidió utilizar las VNPs obtenidas al funcionalizar los virus con la mayor cantidad de molécula SD133\*, o sea, las BMV-6 SD133\*, BMV-PEG-6 SD133\*, CCMV-6 SD133\* y CCMV-PEG-6 SD133\*. Las VNPs etiquetadas con el número 6 corresponden a las condiciones de reacción en la que se tienen 6 moléculas SD133\* por proteína de cápside, en lo que sigue del escrito de tesis solo se hará referencia a ellas como BMV-SD133\*, BMV-PEG-SD133\*, CCMV-SD133\* y CCMV-PEG-SD133\*.

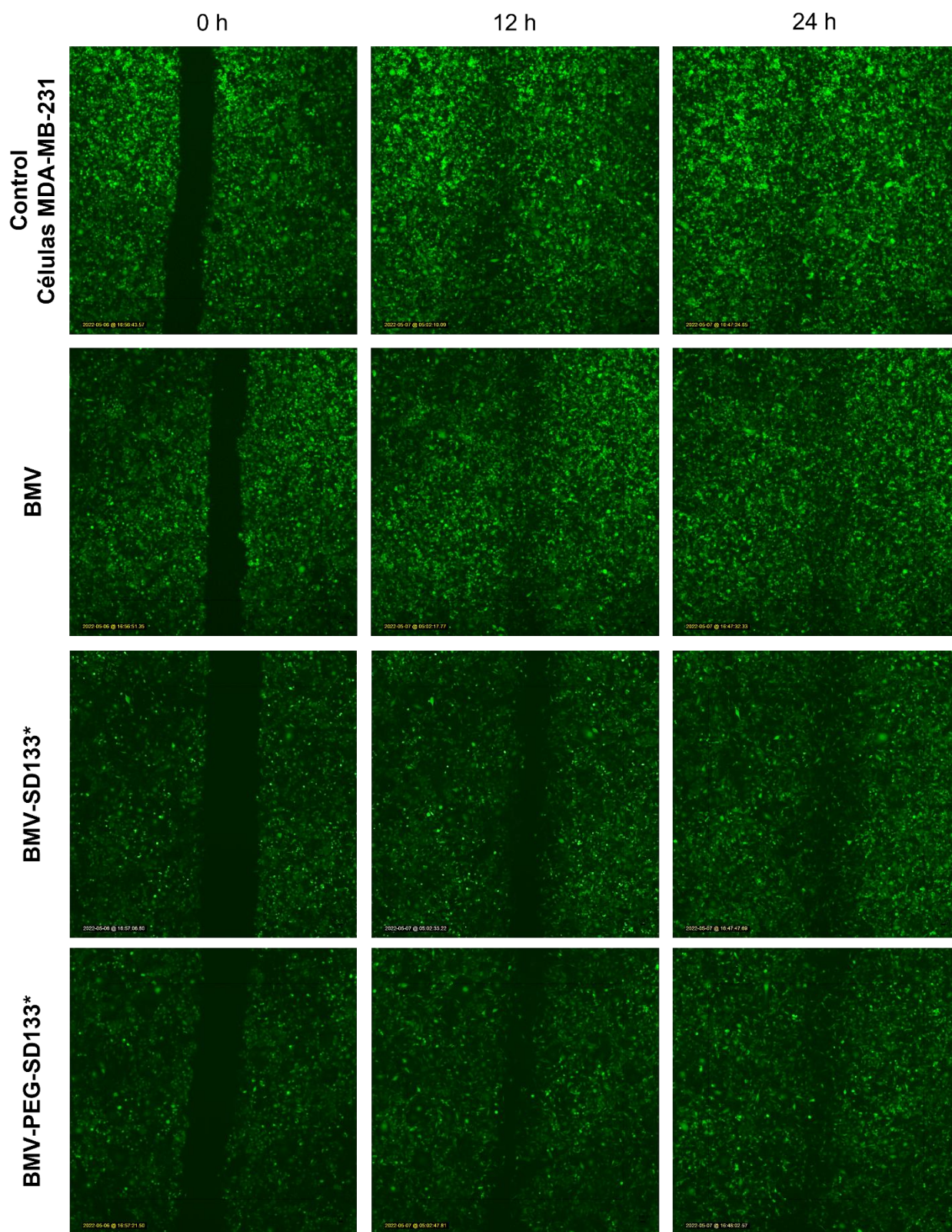
Para evaluar si las VNPs escogidas, retardaban la migración de células metastásicas, se realizaron ensayos de cierre de herida, utilizando la línea celular de cáncer humano MDA-MB-231 y de cáncer de ratón 4T1. Como se describió previamente en la metodología, se tomaron imágenes del cierre de la herida durante 24 h después de los tratamientos con las VNPs correspondientes. En la Figura 12 y Figura 13 se muestra la evolución del cierre de la herida en las células MDA-MB-231 a las 0, 12 y 24 h después del tratamiento; en las imágenes del control a las 12 h el área de la herida se observa completamente cerrada. El resultado fue

similar con cuando se agregó el BMV (Figura 12) y el CCMV nativos (Figura 13). En cambio, al añadir las partículas BMV-SD133\* Y BMV-PEG-SD133\* aún se observó área abierta a las 12 h de ensayo (Figura 12). Es hasta las 24 h que las células alcanzaron al centro de la herida, pero aún es posible observar áreas carentes de células.

En las imágenes correspondientes al CCMV-SD133\* a las 12 h, las células cubrieron la mitad superior del campo observado de la herida y, al final del ensayo, estuvo cubierta casi por completo (Figura 13). En seguida, en las células tratadas con CCMV-PEG-SD133\* después de 24 h, se puede observar que la herida no ha cerrado completamente (Figura 13).

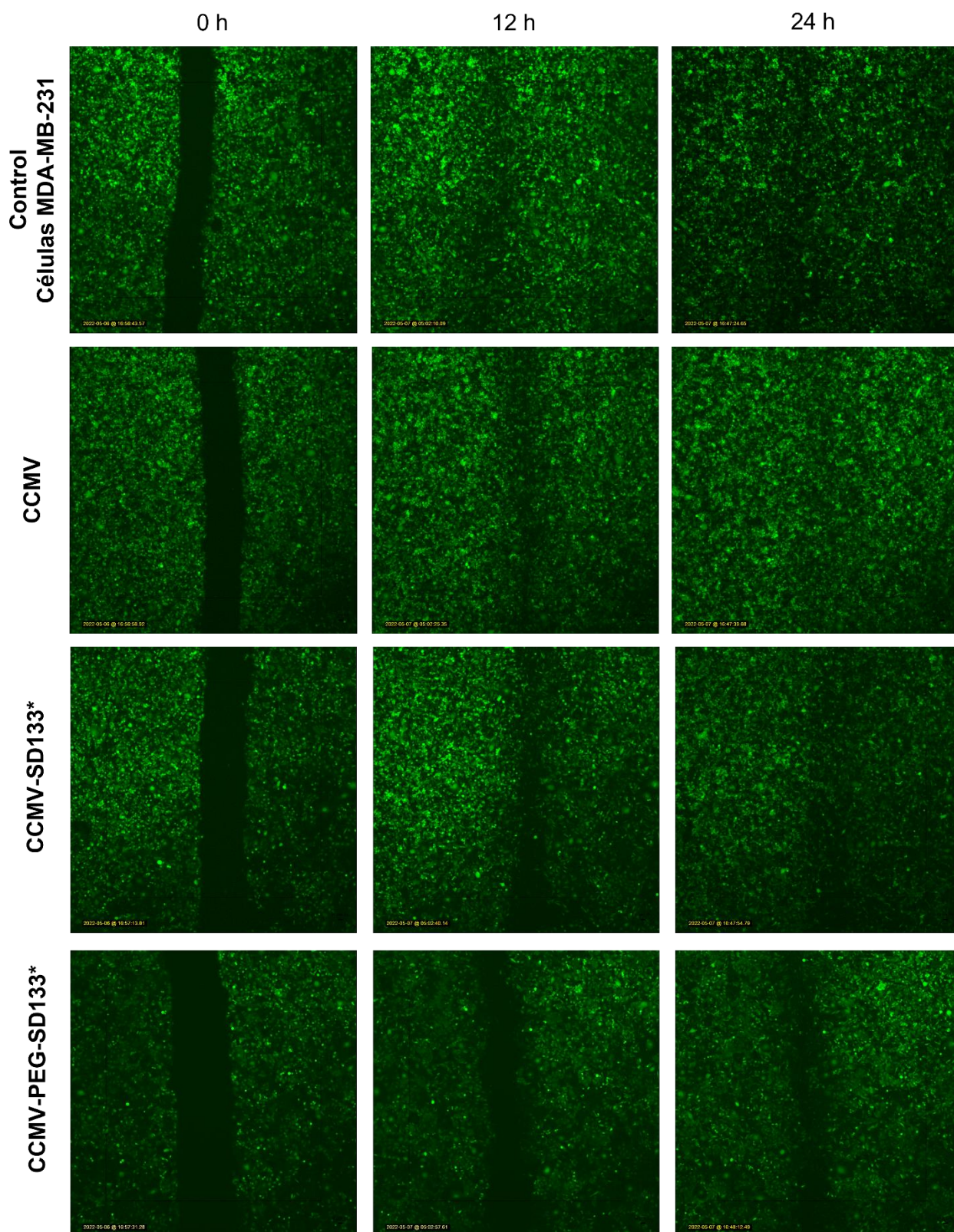
Por último, en la Figura 14 se muestran los ensayos de herida con la molécula libre y DMSO. Con SD133\* 5  $\mu$ M, las células migran para cubrir totalmente el espacio libre de células después de las 12 h de ensayo. Las micrografías en los tiempos mostrados son muy parecidas a las del control. Al añadir SD133\* 10  $\mu$ M, la línea de la herida es más notoria a mitad del ensayo que la del control y la misma molécula a menor concentración. En las imágenes correspondientes a las células con DMSO, la herida aún se observa abierta a final de la prueba. En esta Figura destaca que los tamaños iniciales de las heridas son diferentes. Por ejemplo, la del tratamiento con DMSO es casi el doble de ancha (1409  $\mu$ m) que la del control (827  $\mu$ m).

Aunque en las micrografías se pudieron observar diferencias en el movimiento de las células con los tratamientos, la velocidad de migración celular debe cuantificarse a través de alguna métrica. Se utilizaron las imágenes capturadas a las 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas de cada tratamiento para calcular el cierre del área de la herida expresada como porcentaje. Los tamaños de la herida no son iguales al inicio del ensayo, por lo que, para obtener valores fiables y comparables, se escaló en función del área menor y normalizó el área de cada una, esto con el fin de poder comparar cada uno de los ensayos de las heridas en función del área de cobertura por las células para descartar o eliminar resultados erróneos debido a los diferentes anchos de las heridas. Los porcentajes obtenidos en los tiempos mencionados se colocaron en el plano y se les aplicó ajuste polinomial. En el Anexo C, Tabla 22, se encuentran las ecuaciones y los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) de cada ajuste realizado. En la Figura 15 se observó el ajuste sobre los datos del control, la curva indica la velocidad de migración de las células sin tratamiento. A las 8 horas la herida cerró en un 100% y fue la más rápida en hacerlo. También, se evaluó la SD133\* a concentración de 10  $\mu$ M, que fue la que causó más retraso en la migración celular, y el área se cubrió por completo hasta las 20 h. En la Figura 15.A se comparó la migración de las células que recibieron BMV y las VNPs de BMV. Los resultados de los tratamientos con BMV nativo fueron muy cercana al control, aunque en este caso se retrasa la migración y la herida se cierra completamente hasta las 12 h.



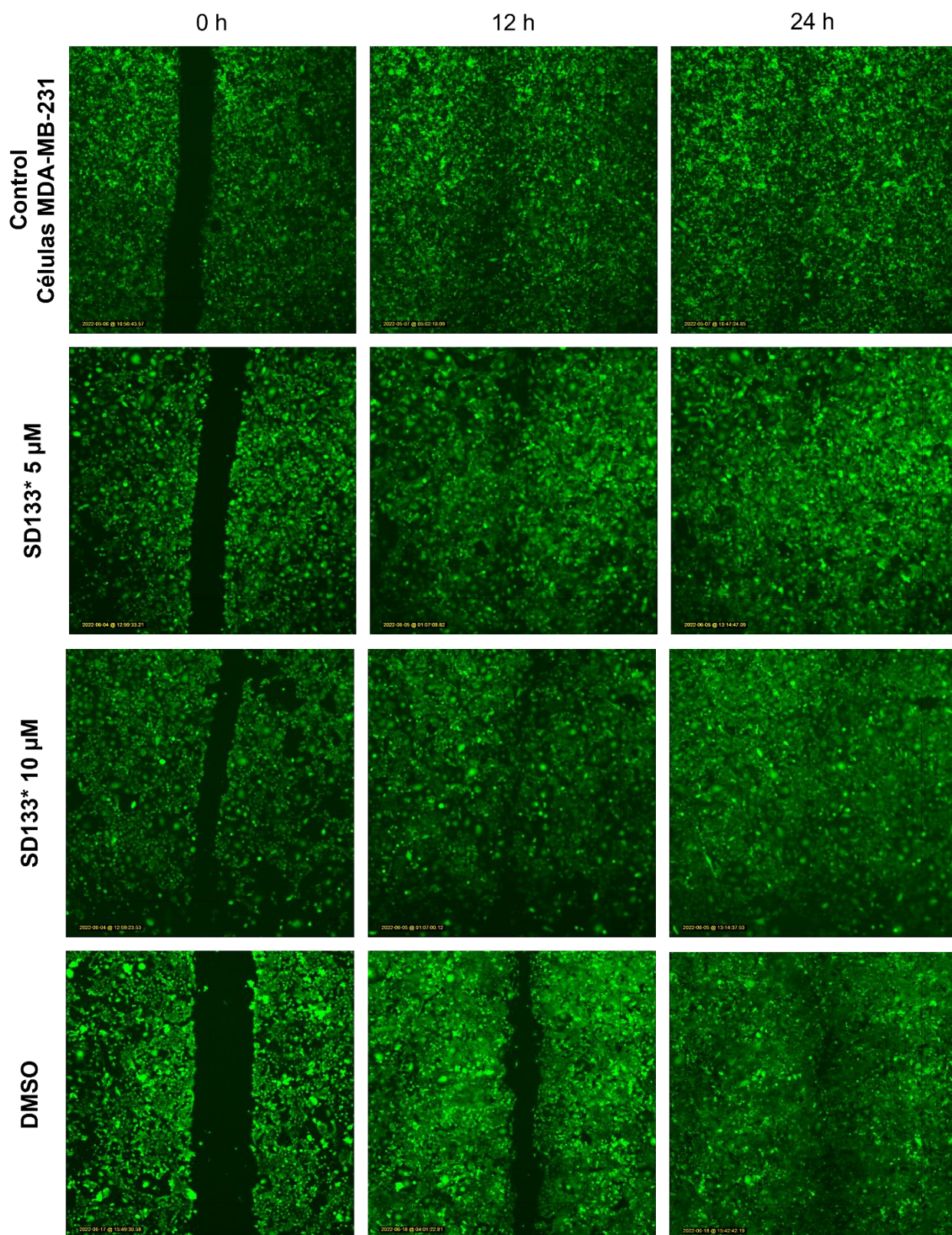
**Figura 12.** Heridas realizadas en la línea celular MDA-MB-231 a las 0, 12 y 24 horas de ensayo; control, tratadas con BMV, BMV-SD133\* y BMV-PEG-SD133\*.





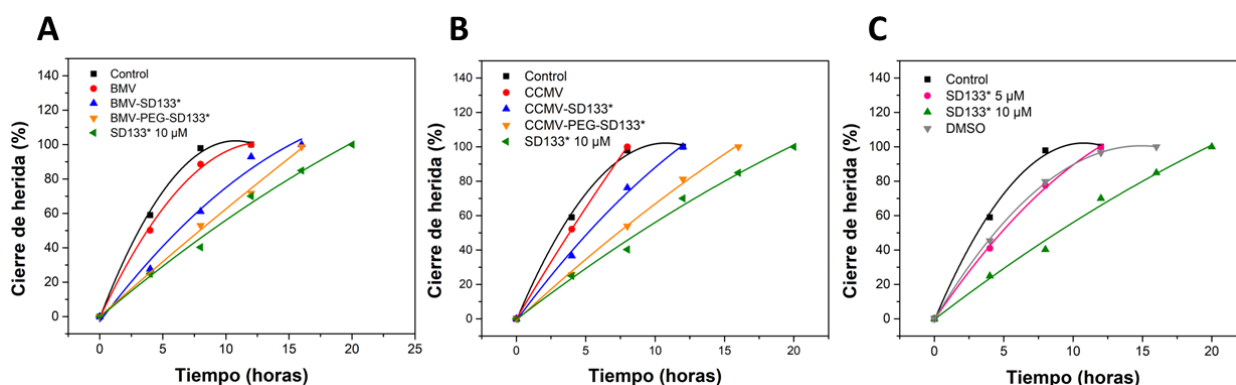
**Figura 13.** Heridas realizadas en la línea celular MDA-MB-231 a las 0, 12 y 24 horas de ensayo; control, tratadas con CCMV, CCMV-SD133\* y CCMV-PEG-SD133\*.





**Figura 14.** Heridas realizadas en la línea celular MDA-MB-231 a las 0, 12 y 24 horas de ensayo; control, tratadas con SD133\* 5  $\mu$ M, SD133\* 10  $\mu$ M y DMSO.

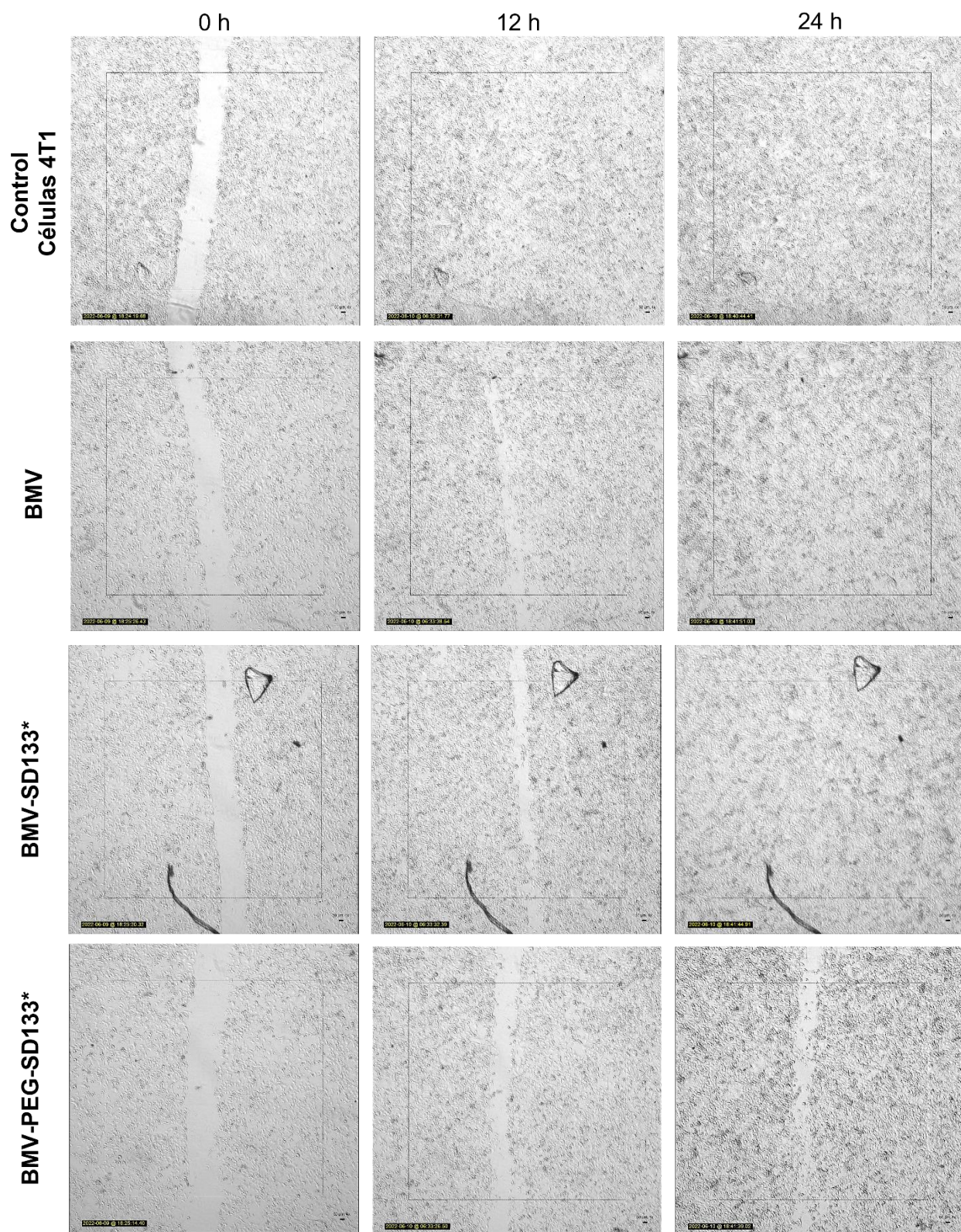
En el caso de las VNPs BMV-SD133\* el cierre de la herida es más lento, se cerró por completo a las 16 h., similar al BMV-PEG-SD133\* que había cubierto el 99% a la misma hora. Sin embargo, el BMV-SD133\* ya había alcanzado el 99% a las 12 h, cuando las de BMV-PEG-SD133\* solo el 72%. En la Figura 15.B se compararon los resultados de las células con CCMV y VNPs de CCMV. Aunque en las células con CCMV el cierre de herida es ligeramente menor que el control a las 4 h, después alcanzan el 100% a las 8 horas, por lo que su velocidad de migración es prácticamente equivalente a las células sin tratamiento. El CCMV-SD133\* retrasó la migración las primeras 8 h de ensayo, sin embargo, logran cubrir la franja debido a la herida a las 12 h. Con el CCMV-PEG-SD133\* las células tuvieron un comportamiento similar a las de BMV-PEG-SD133\*, pero las primeras llegaron al 81% a las 12 h y a las 16 h al 100% de cierre. Por último, en la Figura 15.C, se comparó la migración con SD133\* a concentración de 5  $\mu$ M y, debido a que la molécula esta disuelta en DMSO, se hizo un control de este agregando el mismo volumen que el de SD133\* 10  $\mu$ M. Tanto la SD133\* 5  $\mu$ M como el DMSO disminuyen el porcentaje de cierre durante las primeras 12 h de ensayo. Al llegar a esta hora, con SD133\* 5  $\mu$ M alcanzaron el 100% y con DMSO el 97%, es decir, el efecto fue prácticamente el mismo.



**Figura 15.** Porcentaje de cierre de herida en MDA-MB-231 con ajuste polinomial: reducción del área de herida a través del tiempo de las células control y tratadas con SD133\* 10  $\mu$ M en comparación con (A) las tratadas con BMV nativo, BMV-SD133\* y BMV-PEG-SD133\*; (B) tratadas con CCMV nativo, CCMV-SD133\* y CCMV-PEG-SD133\*; (C) tratadas con SD133\* 5  $\mu$ M y control de DMSO.

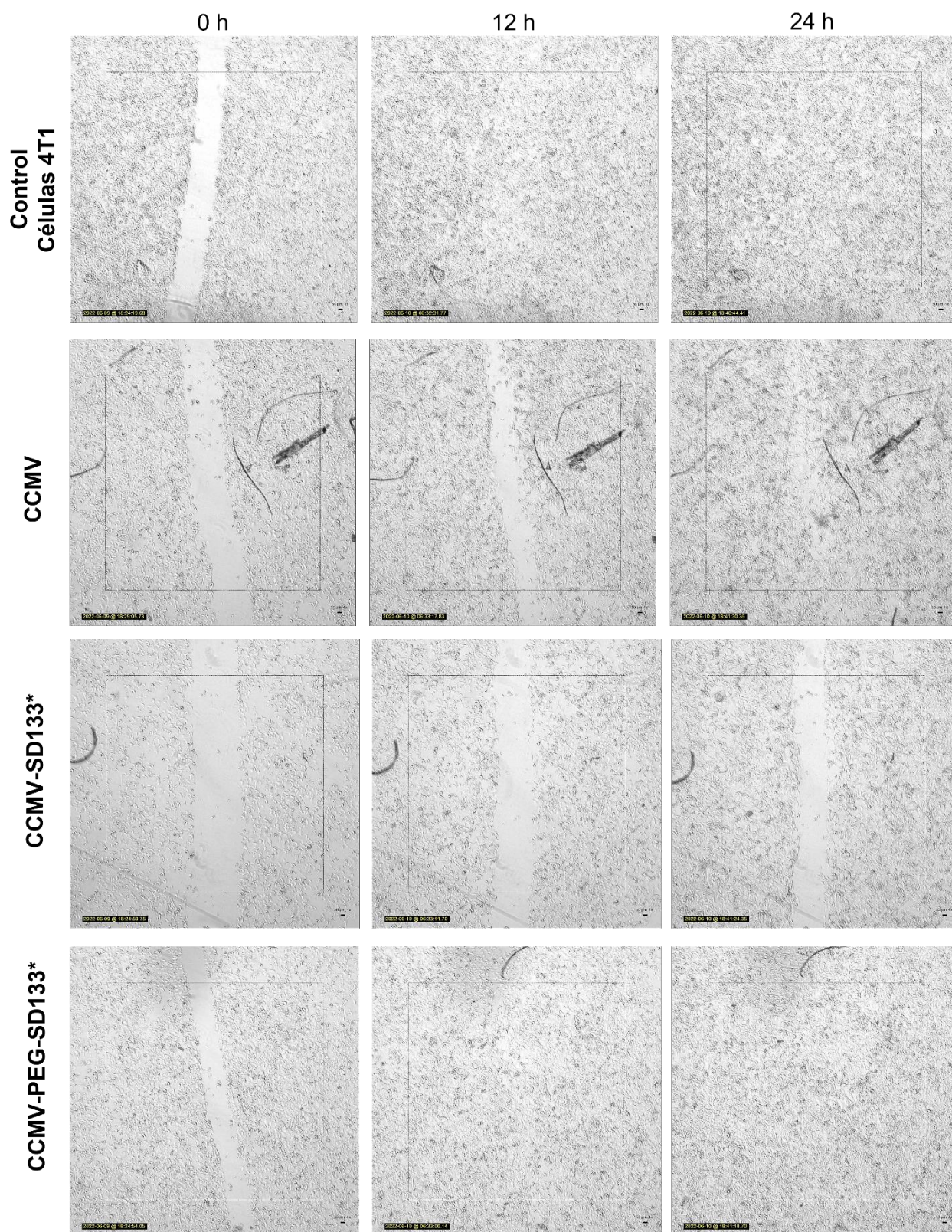
Al igual que para las células MDA-MB-231, se muestran imágenes representativas a las 0, 12 y 24 h de los ensayos de herida en células 4T1. La herida en el caso de las células control, estuvo totalmente cerrada para las 12 h de la prueba (Figura 16 y Figura 17). Lo mismo se observó en la prueba del CCMV-PEG-SD133\* (Figura 17). Al agregar BMV y BMV-SD133\* aun había una delgada franja abierta a mitad del ensayo (Figura 16), mientras que con CCMV apenas cerró aproximadamente la mitad del área en la segunda imagen (Figura 17). En el caso de la evaluación de las VNPs BMV-PEG-SD133\* (Figura 16) y CCMV-SD133\* (Figura 17) a las 24 h presentaron una destacable zona libre de células.





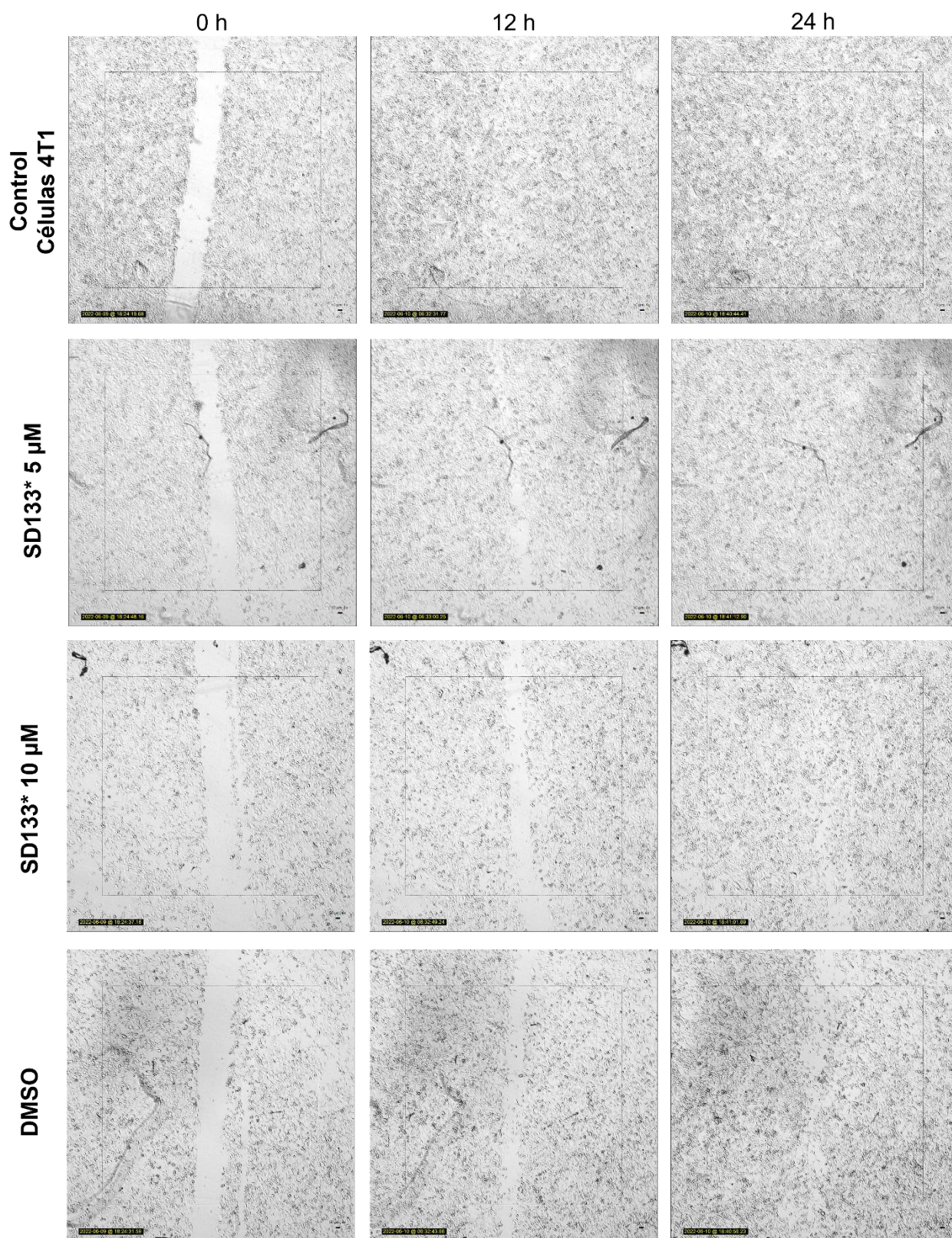
**Figura 16.** Heridas realizadas en la línea celular 4T1 a las 0, 12 y 24 horas de ensayo; control, tratadas con BMV, BMV-SD133\* y BMV-PEG-SD133\*.





**Figura 17.** Heridas realizadas en la línea celular 4T1 a las 0, 12 y 24 horas de ensayo; control, tratadas con CCMV, CCMV-SD133\* y CCM-PEG-SD133\*.

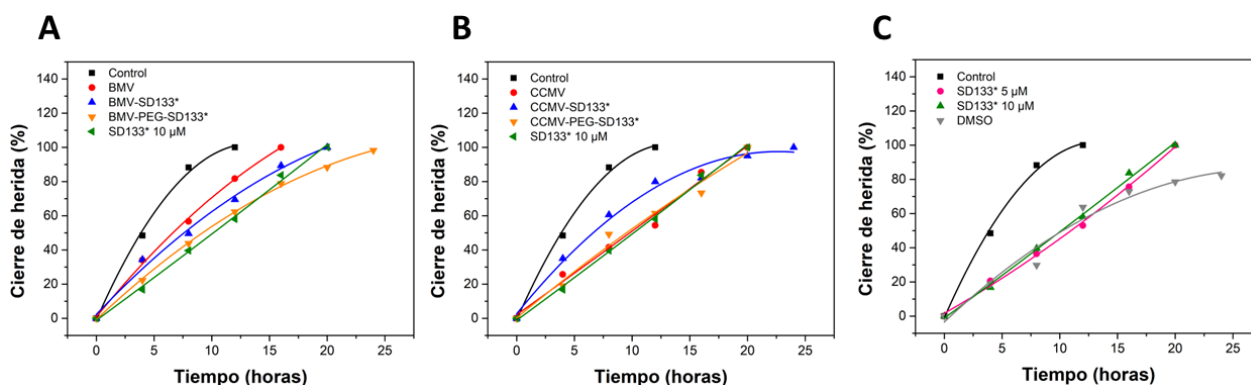




**Figura 18.** Heridas realizadas en la línea celular 4T1 a las 0, 12 y 24 horas de ensayo; control, tratadas con SD133\* 5  $\mu$ M, SD133\* 10  $\mu$ M y DMSO

En cuanto a los ensayos con la molécula libre, en la Figura 18 se aprecia que con ambas concentraciones de SD133\* y con DMSO, la línea de la herida está abierta a las 12 h, a diferencia del control donde ya está completamente cubierta. Aunque al término de la prueba las zonas de las heridas son casi imperceptibles, en las que recibieron DMSO se observan más espacios libres de células al centro de la imagen y hacia arriba del campo.

Igualmente se calcularon los porcentajes de cierre de herida para los ensayos con la línea 4T1, tomando imágenes cada 4 h durante un día y se realizó el ajuste polinomial de los datos. En la Anexo C, Tabla 23 se presentan las ecuaciones y valores de  $R^2$  de cada ajuste. El control de estas células abarco toda el área de rayado a las 12 h de la prueba, como se aprecia en las gráficas de la Figura 19.



**Figura 19.** Porcentaje de cierre de herida en 4T1 con ajuste polinomial: reducción del área de herida a través del tiempo de las células control y tratadas con SD133\* 10 µM en comparación con (A) las tratadas con BMV nativo, BMV-SD133\* y BMV-PEG-SD133\*; (B) tratadas con CCMV nativo, CCMV-SD133\* y CCMV-PEG-SD133\*; (C) tratadas con SD133\* 5 µM y control de DMSO.

Los resultados también se presentan en 3 grupos; la gráfica A para las células tratadas con VNPs de BMV, la B para las de VNPs de CCMV y la C, para las concentraciones probadas de SD133\* y el control de DMSO. El BMV logró retrasar la migración celular, pues estas alcanzan el 100% de cierre a las 16 h. El BMV-SD133\* detiene un poco más la migración y cierra completamente la herida las 20 h al igual que la SD133\* 10 µM. El mayor efecto se alcanzó con BMV-PEG-SD133\* pues las células tratadas con ellas cerraron un 98% de la zona rayada a las 24 h. La migración de las células con CCMV, CCMV-PEG-SD133\* y SD133\* 10 µM mostró la misma tendencia y coincidieron a las 20 h de prueba. Aunque el porcentaje de cierre de herida es mayor al de los últimos tres tratamientos mencionados cuando se agregó el CCMV-SD133\*, fue el que interfirió por más tiempo, ya que la herida sanó completamente hasta las 24 h. Por último, en la Figura 19.C se muestra que la tendencia en el cierre de herida fue la misma con SD133\* 5 µM y 10 µM. Las células tardaron más en cubrir la zona libre cuando se les añadió DMSO, lo que indica que el solvente puede

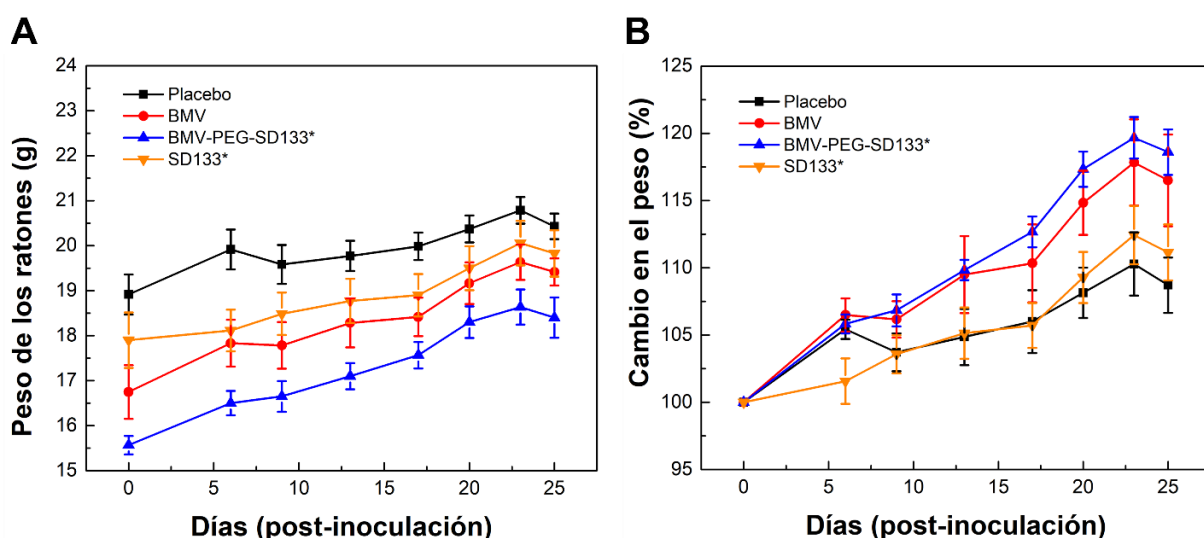


afectar la migración de la línea 4T1 a las concentraciones evaluadas. Con los resultados observados en las micrografías y los porcentajes de cierre de herida, se llegó a la conclusión de que las partículas de BMV-PEG-SD133\* retrasaron la migración celular tanto en la línea MDA-MB-231 como en las 4T1.

### 3.3 Evaluación las VNPs biocojugadas en un modelo murino de cáncer de mama

Después de haber analizado los resultados obtenidos de las VNPs en cultivos celulares, se realizó la evaluación de estas *in vivo*. Para realizar el estudio *in vivo* se utilizaron las VNPs derivadas del virus BMV y conjugadas con PEG y SD133\*, esto de acuerdo con lo obtenido del estudio de ambas líneas celulares. Los ratones BALB/cAnNCrI se mantuvieron y se monitorearon por 11 días antes de realizar la inoculación con las células 4T1, durante los cuales se integraron a su colonia, presentaron una conducta de alerta, aspecto nutrido e hidratado, pelaje brillante, buen tono muscular, conducta vivaz y aumentó de peso.

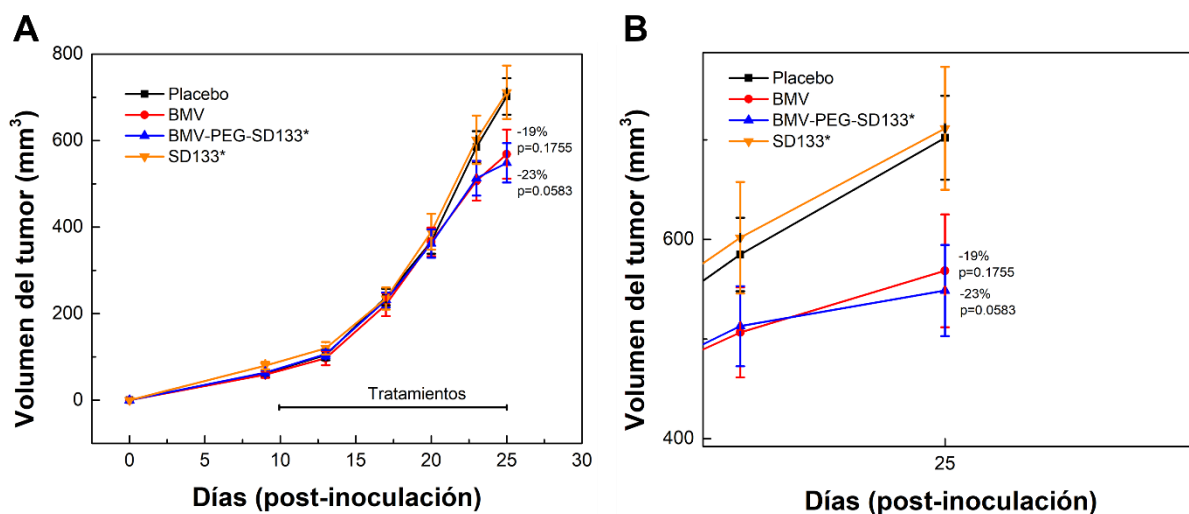
El estado de salud de los ratones se siguió monitoreando después de la inoculación de las células 4T1 y hasta un día antes de la eutanasia. Durante casi todo el experimento, el peso promedio de cada grupo fue incrementando, a excepción del noveno día post-inoculación, para los grupos que recibirían el placebo y el BMV, y el último día de medición, cuando la media disminuyó de forma similar en todos los grupos (Figura 20.A).



**Figura 20.** Monitoreo del peso de los ratones: (A) pesos promedios de los ratones por cada grupo ( $\pm$ EEM); (B) porcentaje promedio de cambio en el peso de los ratones ( $\pm$  EEM). EEM: Error estándar de la media.

Además, se calcularon los porcentajes de ganancia de peso que se muestran en la Figura 20.B, donde el peso promedio inicial, al día de la inoculación (día 0) fue considerado como el 100%. En este gráfico es más notable la caída en el peso de los grupos del placebo y BMV, después del cual el porcentaje incrementó gradualmente hasta el día 23, lo que concuerda con lo ocurrido en la gráfica A. Es destacable que el grupo de ratones con menor peso promedio fue el que recibió las VNPs de BMV-PEG-SD133\*, pero a su vez, fue el grupo con mayor ganancia de peso, (curvas de color azul en las gráficas de la Figura 20).

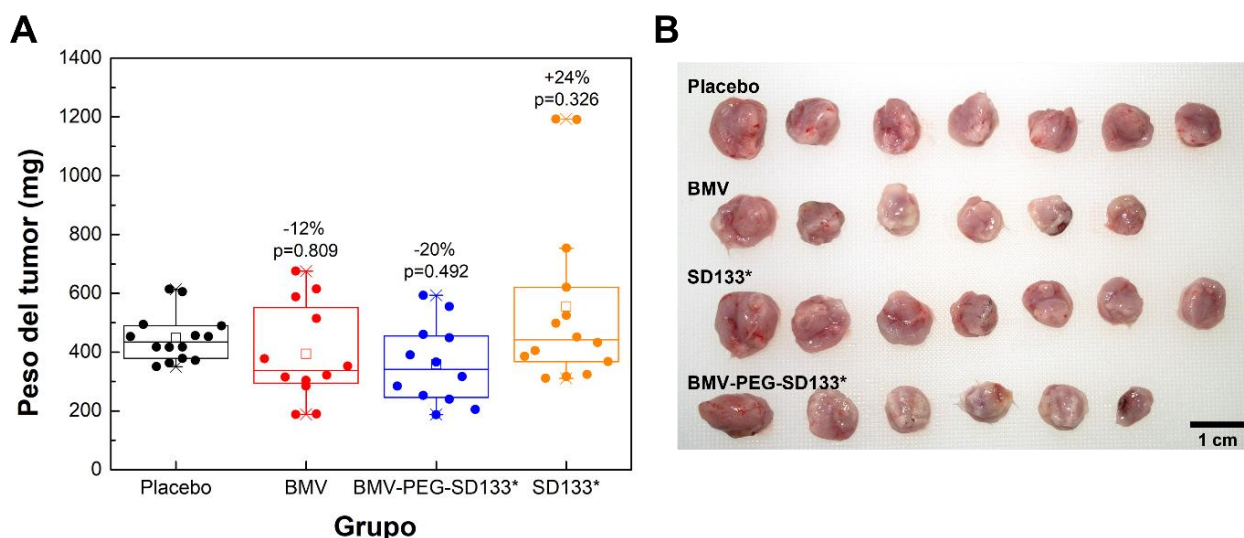
El volumen promedio de los tumores incrementó durante el periodo del experimento en todos los grupos (Figura 21.A). Sin embargo, el promedio final del grupo que recibió BMV y BMV-PEG-SD133\* fue menor en un 19% y 23% respectivamente (Figura 21.B). Al realizar la prueba ANOVA de dos vías con método de Dunnett (IC de 95%), para comparar la media de los grupos que recibieron tratamientos con respecto al que recibió el placebo, no se encontró ninguna diferencia significativa. A pesar de esto, es notable la comparación entre BMV-PEG-SD133\* y el grupo control que arrojó un valor  $p=0.0583$ , el cual podría considerarse significativo ampliando el nivel de significancia.



**Figura 21.** Cambio en el volumen de los tumores: (A) volúmenes promedio de cada grupo ( $\pm$ EEM); (B) acercamiento a los promedios del día 25. Se realizó un ANOVA de dos vías con método de Dunnett (valor  $p \leq 0.05$  indica significancia estadística). EEM: Error estándar de la media.

Después de la eutanasia de los ratones, se extirparon todos los tumores y se pesaron. Se encontró que el peso promedio de los tumores tratados con BMV y BMV-PEG-SD133\*, fue menor al del grupo placebo en un 12% y 20% respectivamente. Se realizó una prueba ANOVA de una vía con método de Dunnett (IC 95%), para determinar si la diferencia entre la media de los dos grupos mencionados era significativa con respecto al control. Dado que los valores  $p$  de todas las comparaciones fueron superiores a 0.05, no se

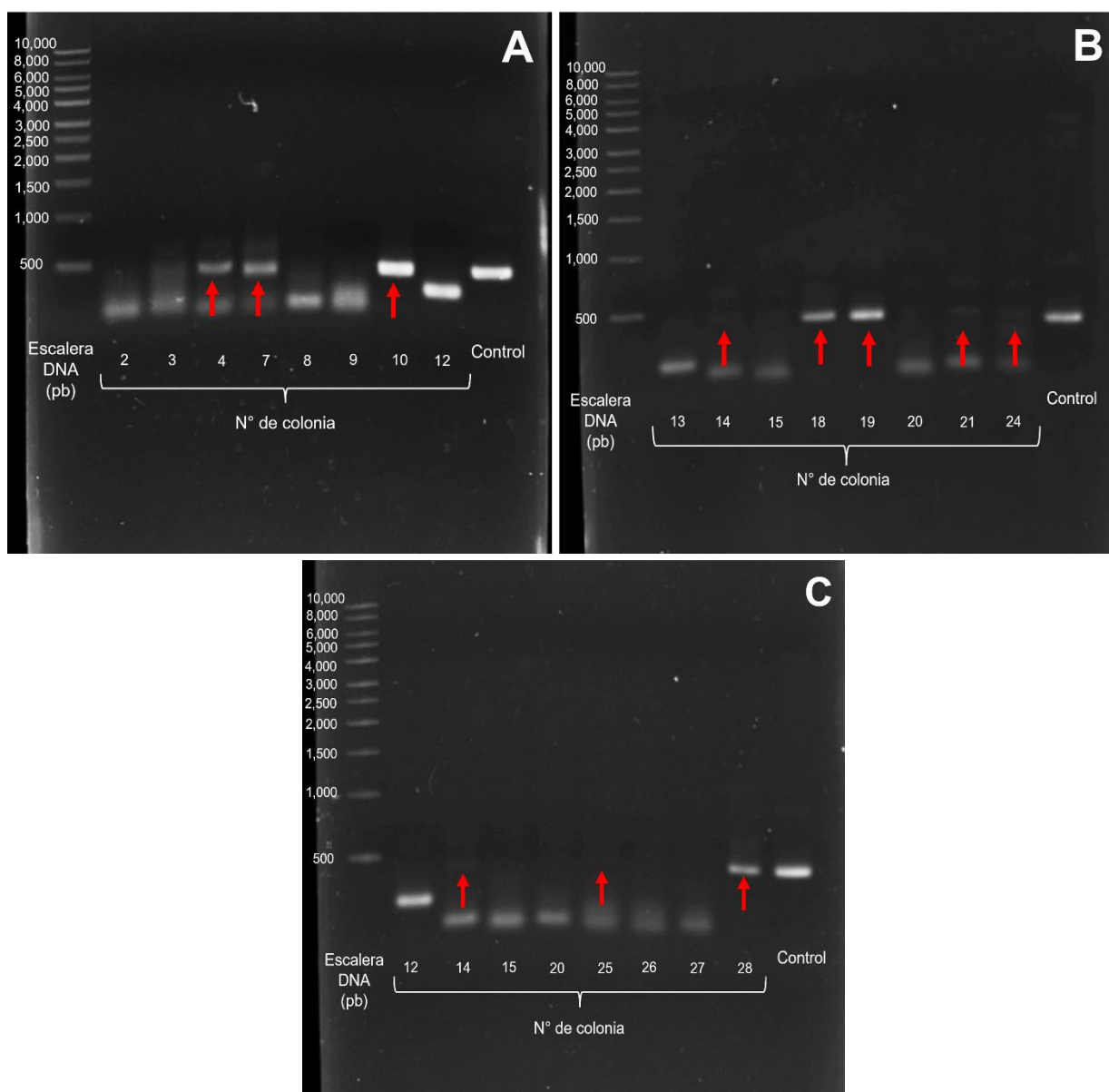
encontró diferencia estadísticamente significativa (Figura 22.A). No obstante, tanto el volumen como el peso de los tumores que recibieron BMV-PEG-SD133\* fueron consistentemente menores. Además, las imágenes de los tumores izquierdos, de los grupos de ratones tratados con BMV y BMV-PEG-SD133\* (Figura 22.B), muestran que estos son más pequeños en comparación con los del grupo control y los tratados con la molécula SD133\* libre.



**Figura 22.** Tumores izquierdos extirpados: (A) peso de los tumores de cada grupo; (B) imágenes de los tumores izquierdos de cada. Se realizó un ANOVA de una vía con método de Dunnett (valor  $p \leq 0.05$  indica significancia estadística).

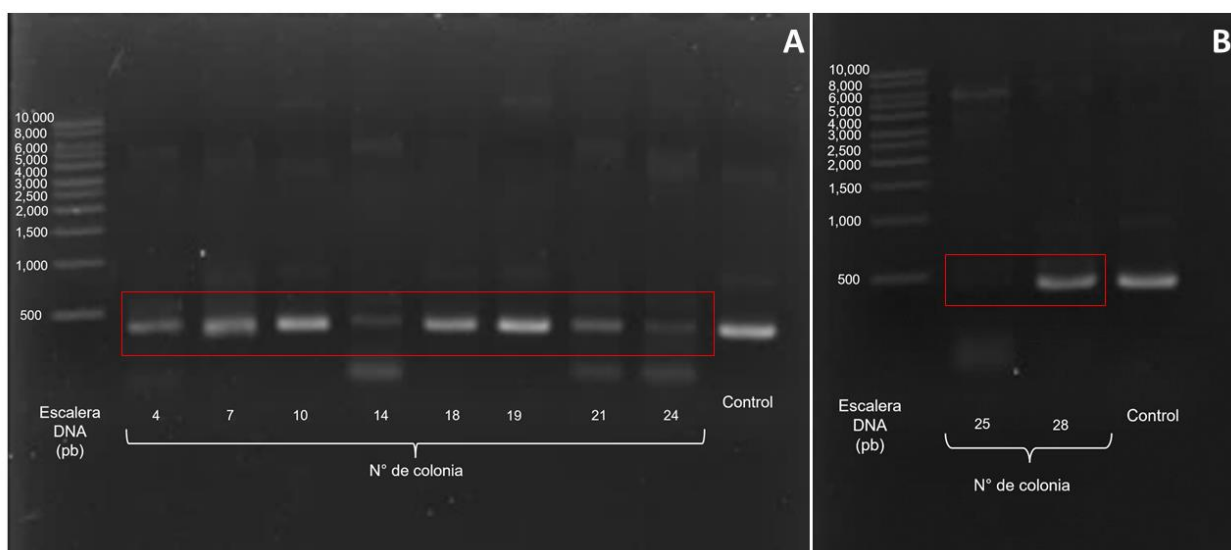
### 3.4 Amplificación y secuenciación de los fragmentos VHH

Como se mencionó anteriormente, otra de las estrategias para bloquear la CDH-11 es por medio de los Nbs. A continuación, se muestran los resultados obtenidos partiendo de células 5αF' infectadas con los bacteriófagos recombinantes M13 anti-CDH11 previamente recuperados después de tres rondas de selección (Rosales-Fuerte, 2020). Al realizar la PCR de diferentes colonias 5αF' numeradas, se amplificaron los fragmentos VHH de las colonias positivas. En la Figura 23 se señalan con flechas rojas los fragmentos de aproximadamente 400 pb que corresponden a las secuencias de los Nbs anti-CDH11. En la misma Figura letra C, se aprecia que las PCR de algunas colonias se repitieron (12, 14, 15, 20), para asegurar o descartar completamente la presencia de la secuencia de interés.



**Figura 23.** Geles de agarosa (1%): amplificación de los fragmentos VHH; (A) del primer grupo de transformantes 5 $\alpha$ F'; (B) del segundo grupo de transformantes 5 $\alpha$ F'; (C) tercer grupo de transformantes 5 $\alpha$ F' elegidas al azar.

Dado el resultado anterior, se seleccionaron las colonias 4, 7, 10, 14, 18, 19, 21, 24, 25 y 28 para la purificación de su ADN plasmídico. Después de la purificación, se realizaron PCRs de los 10 ADN, para amplificar y comprobar la presencia de los fragmentos VHH. En la Figura 24, se muestran los geles de agarosa obtenidos tras la electroforesis, donde se destaca con recuadros rojos que todas las muestras seleccionadas contenían el fragmento de 400 pb. Por ello, estos fueron los 10 ADN que se enviaron a secuenciar.



**Figura 24.** Geles de agarosa (1%): amplificación del fragmento VHH a partir de los ADN plasmídicos purificados; (A) de las primeras 8 colonias; (B) últimas dos colonias positivas.

Las secuencias de ADN de las colonias elegidas (4, 7, 10, 14, 18, 19, 21, 24, 25 y 28) mostraron varias incertidumbres, lo que impidió continuar con el modelado molecular para la selección del Nb anti- CDH11 con mejor afinidad por su antígeno. Sin embargo, secciones de aproximadamente 400 pb de cada ADN (las partes con menor número de incertidumbres), pudieron ser analizadas utilizando el software en línea Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y verificar la presencia de regiones conservadas en Nbs derivados de Camélidos.

En la Tabla 20, se muestran los números de colonia de las que procedían los ADN que arrojaron coincidencias en la alineación. En la segunda columna, está la letra asignada para identificar a cada uno de estos ADN. Después, se muestra la longitud de la sección de la secuencia ingresada al BLAST®. Posteriormente, se presenta entre paréntesis el número de resultados que coincidieron con la secuencia ingresada y el Nb previamente reportado que tuvo mayor similitud, lo que se refleja en la última columna como porcentaje de identidad. Ya que los ADN, ahora nombrados A, B, C y D, mostraron mayor probabilidad de ser secuencias de Nb anti-CDH11, se utilizaron para seguir la nueva estrategia de expresar y obtener las proteínas.

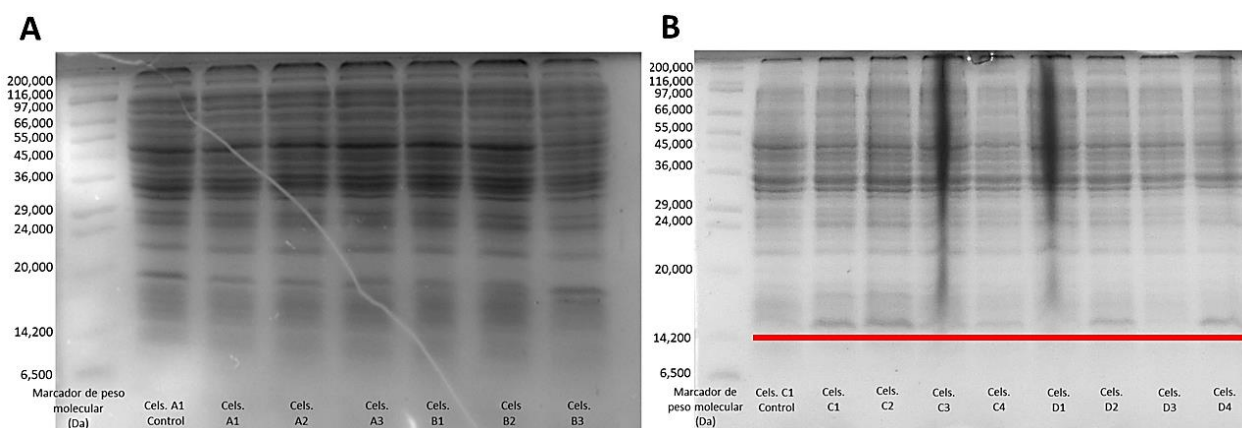


**Tabla 20.** Resultados de alineación de segmentos de ADN plasmídicos con secuencias de Nbs de camélidos.

| N° de colonia | ADN | Longitud (pb)  | Resultados de la alineación                                  | Porcentaje de identidad |
|---------------|-----|----------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 10            | A   | 354 (53 - 406) | (6) Cadena A, Nanoanticuerpo Nb26 [Lama glama]               | 54.0                    |
| 18            | B   | 401 (1 - 401)  | (18) Cadena A, Nanoanticuerpo Nb26 [Lama glama]              | 56.5                    |
| 19            | C   | 405 (3 - 407)  | (16) Cadena A, Nanoanticuerpo Nb26 [Lama glama]              | 58.6                    |
| 26            | D   | 361 (1—361)    | (1) NbBCII10 humanizado (FGLA mutante) [Camelus dromedarius] | 60.0                    |

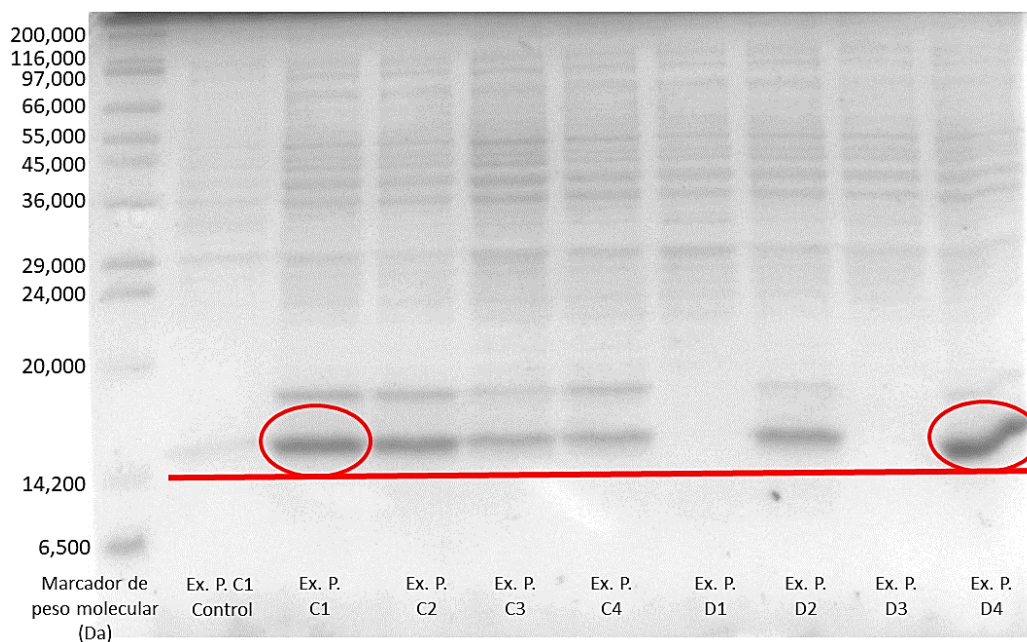
### 3.5 Expresión del fragmento VHH y extracción de la proteína del espacio periplásmico.

Primero los 4 fagémidos seleccionados, se utilizaron para electrotransformar la cepa de expresión TOP10F'. Como se mencionó, 30 colonias de transformantes de cada ADN se aislaron e identificaron. Posteriormente, para estandarizar los protocolos de expresión, se probaron dos tiempos de inducción a diferentes temperaturas de incubación. 3 colonias del ADN A y B, se indujeron por 5 h a 37 °C, mientras que 4 colonias del ADN C y D, se sometieron a temperatura de 30 °C por 24 h. Las proteínas de las células inducidas (Cels.) se analizaron por electroforesis en los geles de poliacrilamida que se presentan en la Figura 25.



**Figura 25.** Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS al 15%: proteínas celulares (Cels.) de diferentes transformantes; (A) con el ADN A (A1 - A3) y ADN B (B1 - B3); (B) con el ADN C (C1 - C4) y ADN D (D1 - D4). Los controles corresponden a las colonias no inducidas.

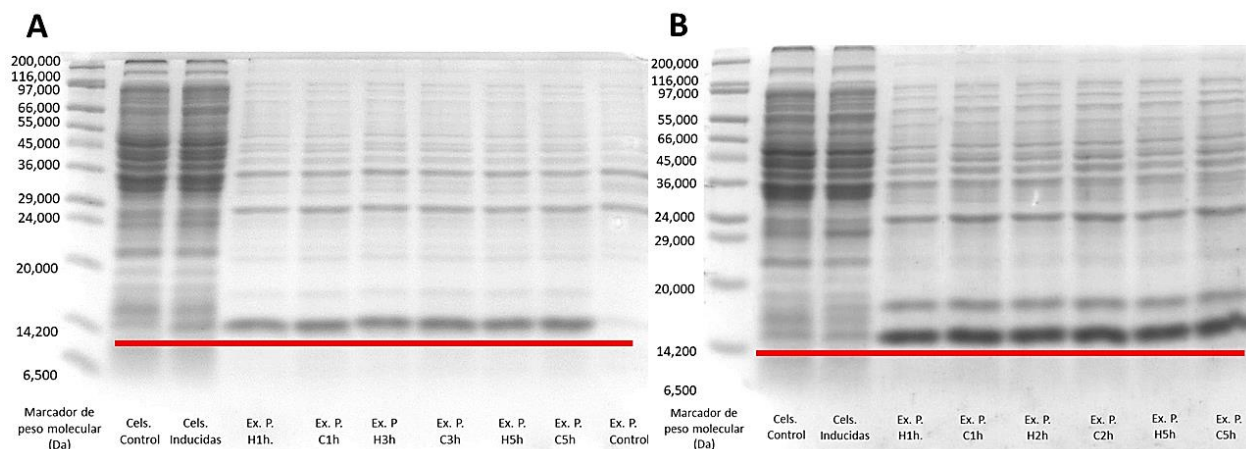
Por una parte, ninguna de las transformantes A y B (Figura 25.A) poseía la proteína de interés que debería de ser de aproximadamente 15 kDa, al contrario de las células inducidas C1, C2, C3, C4, D2 y D4 (Figura 25.B), pues se observó claramente una banda del peso molecular esperado, resaltado por la línea roja. También, se destacó la diferencia con el control de C1 (colonia sin inducir), que muestra una banda mucho más tenue que la de las mismas células que pasaron por la inducción.



**Figura 26.** Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS al 15%: proteínas en extracto periplásmico (Ex. P.) de diferentes colonias con el ADN C (C1 - C4) y ADN D (D1 - D4).

Después, se tomaron las células a las que se les logro inducir la expresión, para probar la extracción de periplasma utilizando la solución amortiguadora TES y ciclos de congelación-descongelación. Las proteínas del Extracto periplásmico. se analizaron en el gel desnaturizante de poliacrilamida (Figura 26), el cual presenta las bandas de interés resaltadas por la línea roja. El resultado concuerda con lo observado en la Figura 25.B, pues solo las colonias que habían presentado estas bandas, las mostraron también en periplasma.

Con la finalidad de optimizar el tiempo de extracción de la proteína y tratar de disminuir la cantidad de proteínas celulares descartables, se escogieron las colonias C1 y D4, que fueron las más destacadas en último gel (Figura 26), para ensayar diferentes tiempos de extracción y en diferentes condiciones.



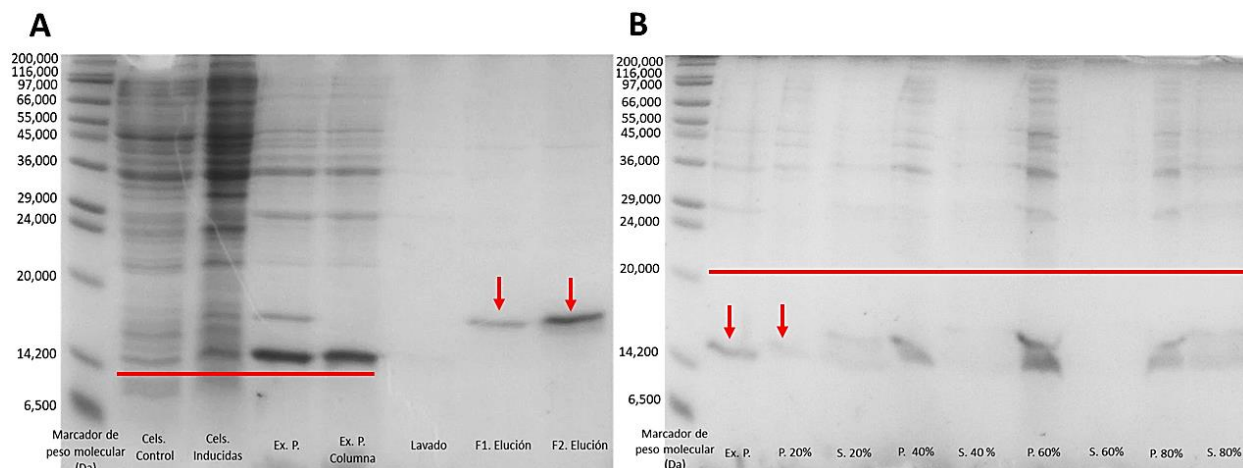
**Figura 27.** Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS al 15%: proteínas celulares (Cels.) y de extracto periplásmico (Ex. P.) a diferentes horas de incubación en hielo (H núm. horas) o en ciclos de congelamiento-descongelamiento (C núm. de horas); (A) transformantes C1; (B) transformantes D4.

Se encontró que las proteínas en periplasma fueron las mismas tanto incubando en hielo durante 1, 3 y 5 h, como congelando-descongelando las células en los diferentes tiempos, lo cual se aprecia en la Figura 27. En la misma figura, la línea roja resalta las bandas de  $\approx 15$  kDa, propias de los Nbs anti-CDH11. Las proteínas de las células sin inducción (Cels. Control), muestran una banda tenue, en tanto las inducidas, una más notoria (Cels. Inducidas). En cuanto a las bandas de los extractos periplásmicos, si bien todas tuvieron una intensidad y grosor similar, según la colonia de donde procedían, las proteínas obtenidas de las transformantes D4 fueron particularmente más intensas (Figura 27.B).

### 3.6 Purificación del NbD4

La selección del método de purificación de la proteína se realizó con el Extracto periplásmico de las transformantes D4, pues aparentemente se extrajo mayor cantidad de proteína a partir de estas. Primero, se intentó la purificación por cromatografía de afinidad a níquel, aprovechando la etiqueta de 6 histidinas (6xHis) que contiene la proteína de interés. El resultado de esta técnica se analizó por electroforesis en el gel de poliacrilamida de la Figura 28.A. Se corrieron muestras de las proteínas de las células D4 sin inducir e inducidas, así como del Extracto periplásmico D4 antes de pasar por la columna de níquel, en las cuales se distingue claramente el Nb (resaltado con la línea roja). En la quinta columna se observó que el extracto periplásmico D4 después de pasar por la columna, siguió conteniendo la proteína de interés, es decir, no fue retenida al interactuar con el níquel como se esperaba. En la columna del lavado se distinguen unas bandas tenues del restante de proteínas que no fueron atrapadas y finalmente, están las fracciones de la

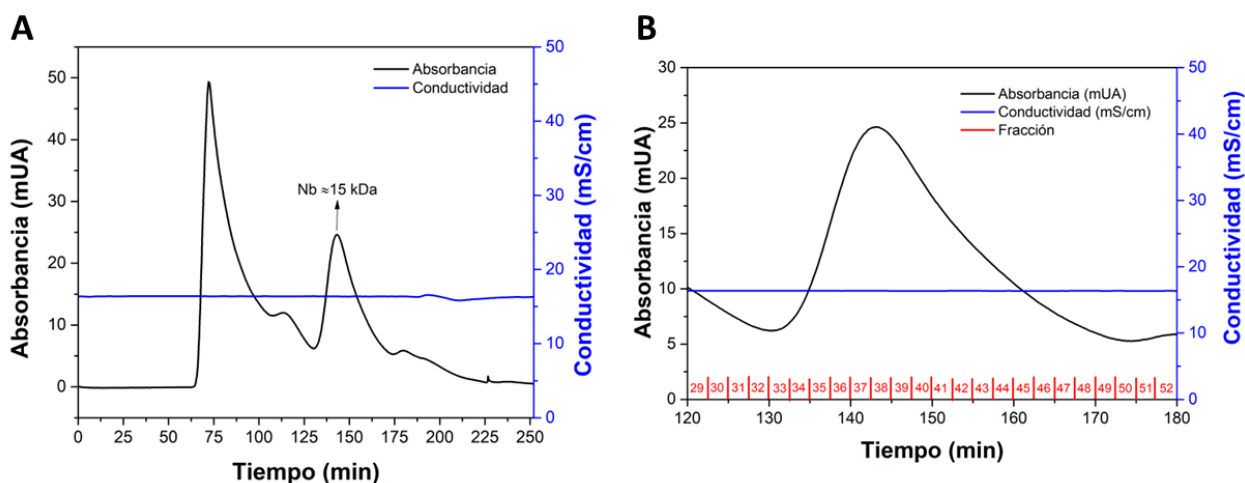
elución, donde se aprecia que la proteína separada por la cromatografía fue una de aproximadamente 18 kDa (señalada por flechas rojas) que no resultó de interés particular.



**Figura 28.** Electroforesis en gel de poliacrilamida 15%-SDS: (A) cromatografía de afinidad a níquel; (B) precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

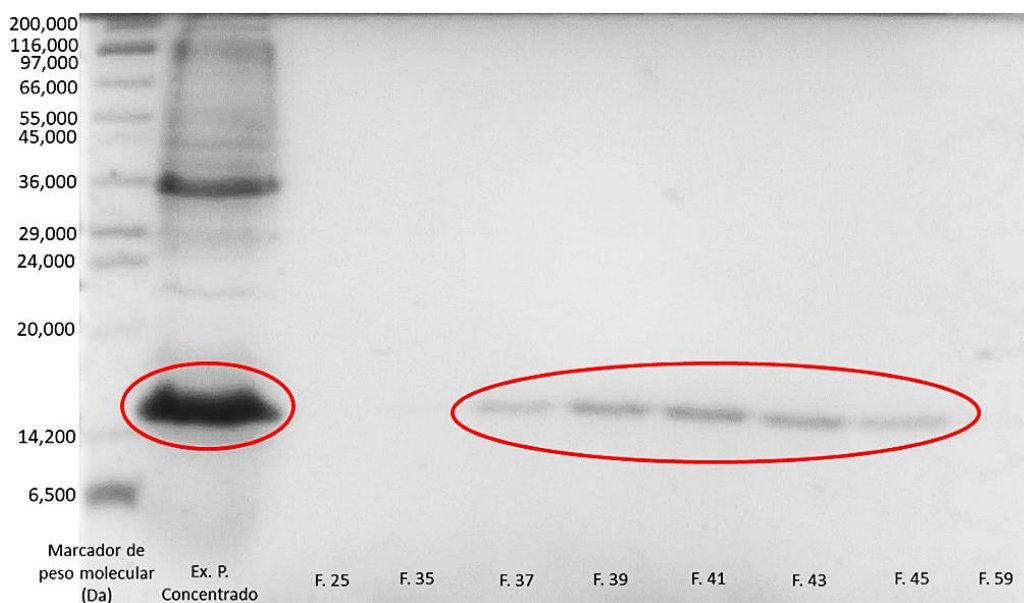
En la Figura 28.B, se presentan los resultados de la prueba de purificación con sulfato, para la cual se utilizó como control el Extracto periplásmico D4 (primera flecha roja), que se puede comparar con el precipitado de 20% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (segunda flecha roja), lo que indica que la proteína de interés precipitó desde el menor porcentaje de sal añadida. Sin embargo, se nota que las demás proteínas de la muestra, que corresponden a las bandas por encima de la línea roja, también están precipitando, es decir, no se logró aislar ni mejorar la pureza de la proteína deseada utilizando este método. Cabe aclarar que el aspecto inconcreto de las bandas en el gel, es debido a los residuos de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , el cual, para fines prácticos, no se eliminó de las muestras analizadas.

El último método de purificación probado fue el de cromatografía de exclusión molecular, a través del cual se obtuvo el cromatograma de la Figura 29. En este, el pico que apareció a los 150 min es propio de las proteínas menores a 30 kDa, por lo que las fracciones de la 35 a la 45 podían contener la proteína de interés (Figura 29.B). Esto se comprobó por medio de la electroforesis en gel de poliacrilamida (Figura 30) realizada con las muestras de fracciones dentro del intervalo mencionado y muestras de un poco antes (fracción 25) y un poco después del pico (fracción 59).



**Figura 29.** Cromatograma de la purificación por cromatografía de exclusión molecular: (A) El cromatograma completo muestra un pico a los 150 min que concuerda con la elución de proteínas menores a 30 kDa; (B) Acercamiento al pico de interés, donde se señalan en rojo el número de las fracciones que le corresponden.

También, se corrió el extracto periplásmico D4 concentrado, en el cual se localizó notablemente la banda deseada (a la izquierda encerrada con rojo, Figura 30) y se puede comparar con las bandas de las fracciones. Se observó que efectivamente en las fracciones (F.) del pico seleccionado, contenían la proteína del NbD4 purificado, dado que se eliminó completamente la presencia de las demás proteínas celulares. Es por ello, que esta técnica se seleccionó como método de purificación en un solo paso.



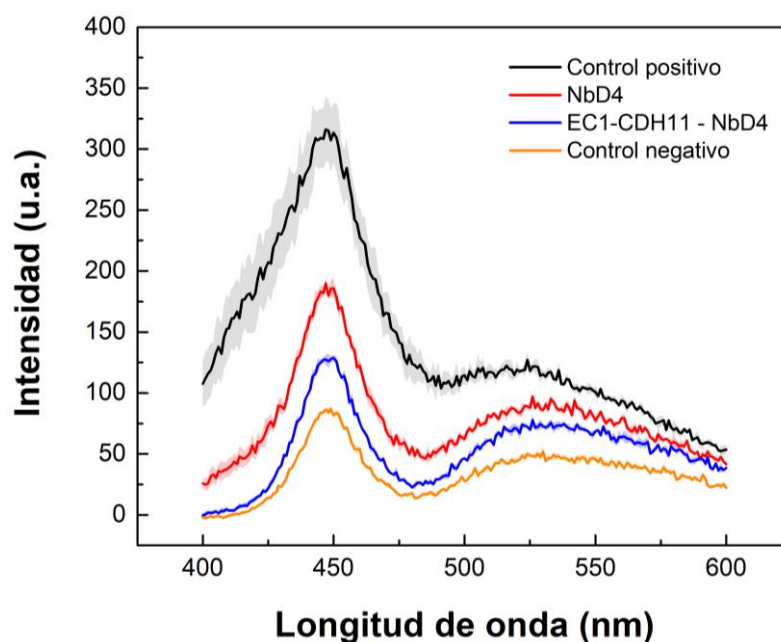
**Figura 30.** Electroforesis en gel de poliacrilamida 15%-SD: cromatografía de exclusión molecular; fracciones (F. núm. de fracción). Encerradas con rojo las bandas de la proteína NbD4.



Una vez identificadas las fracciones de la proteína purificada (de la 37 a la 45), estas se mezclaron y concentraron para realizar la cuantificación por método de Bradford. La cantidad de proteína obtenida del cultivo de 500 mL fue 8.53 mg, por lo tanto, el rendimiento de producción fue de aproximadamente 17 mg/L de cultivo inducido.

### 3.7 Identificación del NbD4 a través de ELISA

Con en el ensayo de ELISA, se probó la capacidad de unión de la proteína purificada al antígeno EC1-CDH11. Para analizar el resultado se midió, por triplicado, la emisión de quimioluminiscencia en cada pozo. En la Figura 31, se muestran los espectros construidos con los valores de intensidad promedio, en los cuales se observó el pico de máxima emisión a 450 nm. El control positivo, que fue únicamente el anticuerpo de detección conjugado a peroxidasa HRP-anti-HA.11, tuvo el espectro de mayor intensidad promedio (curva negra), seguido de la muestra del NbD4 detectado por el HRP-anti-HA.11 (curva roja). En tercer lugar, apareció la señal debida al anticuerpo de detección ligado a la etiqueta de HA del NbD4, a su vez unido a su antígeno (curva azul). Por último, el espectro del control negativo corresponde a la quimioluminiscencia basal emitida por el reactivo revelador (curva naranja).



**Figura 31.** Espectros de emisión promedio de quimioluminiscencia (el área sombreada representa las barras de  $\pm$ EEM). prueba de ELISA; control positivo: pozo con HRP-anti-HA.11; control negativo: pozo bloqueado con BSA. EEM: Error estándar de la media.

## Capítulo 4. Discusión

---

### 4.1 VNPs bioconjugadas con SD133\*

En este trabajo de investigación se obtuvieron de partículas de BMV y CCMV conjugadas con el farmacóforo SD133\*, a través de la funcionalización de la superficie externa de la cápside viral. Se realizaron dos tipos de reacción de funcionalización; una para promover la unión directa de SD133\* a la partícula y otra utilizando PEG como ligando entre el virus y la molécula en cuestión. Para estandarizar los protocolos de ambos tipos de reacción, cada una se hizo en diferentes condiciones, agregando 3 cantidades distintas de reactivos y de SD133\*. Posteriormente, todas las VNPs producidas se caracterizaron por DLS y TEM. De las reacciones de funcionalización directa se obtuvieron: BMV-2 SD133\*, BMV-4 SD133\*, BMV-6 SD133\*, CCMV-2 SD133\*, CCMV-4 SD133\*, CCMV-6 SD133\* y de las reacciones de funcionalización con PEG, se obtuvieron: BMV-PEG-2 SD133\*, BMV-PEG-4 SD133\*, BMV-PEG-6 SD133\*, CCMV-PEG-2 SD133\*, CCMV-PEG-4 SD133\*, CCMV-PEG-6 SD133\*. Es importante tener en cuenta que los números 2, 4 y 6, se refieren al número de moléculas por proteína de cápside que estuvieron disponibles durante la reacción.

La reacción de funcionalización directa va dirigida a los sitios carboxilo de la cápside, que son en total 3060 en el BMV y 1980 en el CCMV (Gillitzer et al., 2002; Running et al., 2012; Yildiz et al., 2012). Las condiciones de reacción utilizadas fueron para activar como máximo 1080 sitios carboxilo y evitar la agregación de las partículas por la activación de demasiados grupos disponibles (Gillitzer et al., 2002). En cambio, para unir a la cápside el ligando PEG, fueron activados los sitios sulfhidrilo de los virus, que únicamente son 180 en el BMV y 360 en el CCMV. Como, evidentemente, el número de sitios es mucho menor, en este caso las cantidades de reactivos y de SD133\* se mantuvieron con altos excesos molares, para asegurar la activación de la mayor cantidad de sitios presentes en la cápside (Wen et al., 2012; Yildiz et al., 2012). En el caso de las VNPs de BVM con PEG-SD133\* pueden contener 6 veces menos moléculas en comparación con las VNPs con SD133, en el caso de que todos los grupos carboxilos del exterior de la cápside fueran funcionalizados. En contraste, para el caso del CCMV se tienen 3 veces menos moléculas de PEG-SD133\*.

Se ha comprobado que las partículas virales son estructuras dinámicas y flexibles que pueden adoptar diferentes conformaciones dependiendo del tamaño de su núcleo (por ejemplo, al ser cargados con algún nanomaterial) y/o de las modificaciones en su superficie (Z. Chen et al., 2016; Running et al., 2012; Strugała



et al., 2017). Los cambios en el tamaño y forma se han podido medir a través de DLS y por imágenes de TEM de los virus, así como los cambios en la carga superficial pueden identificarse por mediciones de movilidad electroforética y potencial Z (Z. Chen et al., 2016; Duran-Meza et al., 2021). Por ello, al caracterizar las VNPs conjugadas con SD133\*, se buscaron diferencias significativas entre estas y los virus nativos, para lo cual se realizaron pruebas ANOVA de una vía con método de Dunnett, para comparar la media de cada uno de los parámetros medidos (diámetro hidrodinámico, tamaño y potencial Z), con la media del control correspondiente.

**Los valores de diámetro hidrodinámico de las partículas de BMV-SD133\* fueron un 24% menores cuando hubo mayor cantidad de molécula durante la reacción (Tabla 4), es decir, las BMV-6 SD133\* se redujeron significativamente (Tabla 5). Este comportamiento coincide con los cambios de tamaño medidos a partir de las micrografías de TEM (Tabla 12). Aunque la disminución fue solo del 2%, el análisis estadístico demostró que fue una diferencia significativa (**

Tabla 13). El diámetro hidrodinámico de las diferentes partículas de BMV conjugadas a PEG y SD133\*, fue prácticamente el mismo que el del control (Tabla 6). Solo en los resultados obtenidos por TEM del BMV-PEG-6 SD133\* fue significativa la disminución del 2.3% del tamaño del virus (Tabla 14).

**Por otra parte, los virus de CCMV conjugados con SD133\* incrementaron su tamaño por DLS un 3.9% cuando se agregó más SD133\* a la reacción (Tabla 8). Sin embargo, el análisis estadístico indicó que este cambio no fue significativo, al contrario de los tamaños de TEM (Tabla 16), que también aumentaron 6.8% el CCMV-4 SD133\* y 7.8% el CCMV-6 SD133\*, pero el incremento si resultó significativo (**

Tabla 17). Por último, las VNPs de CCMV-PEG-SD133\* mostraron incremento importante tanto en el diámetro hidrodinámico de 9.4% (Tabla 10 y Tabla 11), como en el tamaño medido con las micrografías de TEM de 3.6% (Tabla 18 y Tabla 19).

Anteriormente, se observó que partículas de CCMV al ser funcionalizadas con fluoróforos o PEGiladas, pueden sufrir aumento de tamaño por la presencia de las estructuras añadidas a la superficie viral (Comellas-Aragonès et al., 2009; Gillitzer et al., 2002), lo que se constató con los resultados de las distintas VNPs de CCMV. Sin embargo, esto no ocurre de la misma forma en todos los casos ni en todos los virus, pues también influyen las condiciones de reacción en el fenómeno de “hinchamiento” del virus y, siendo el caso, es importante la conformación que adopte el PEG unido al virus (Z. Chen et al., 2016; Gillitzer et al., 2002; Steinmetz y Manchester, 2009). Además, se ha descubierto que el mismo tipo de VNPs puede

mostrar diferencias significativas en radio hidrodinámico con respecto a su control, pero no en el tamaño medido a partir de TEM, o viceversa (Steinmetz y Manchester, 2009). Como se vio, los resultados indicaron que las conjugaciones sobre el BMV provocan la reducción de su tamaño, aun cuando se funcionalizó con el polímero. Por lo anterior, fue importante considerar todos los cambios encontrados en estos parámetros, no solo el aumento de tamaño.

En cuanto al potencial Z, los valores de las BMV-SD133\* permanecieron muy similares, excepto las de BMV-2 SD133\* que perdieron carga negativa. Sin embargo, estas VNPs en particular no mostraron otro cambio importante de tamaño en DLS ni en micrografías. Referente a las BMV-PEG-SD133\*, es evidente y significativo el aumento del potencial Z, que paso de  $-15.1 \pm 1.8$  del control a  $-22.6 \pm 0.7$  de las BMV-PEG-6 SD133\* (Tabla 6). En cuanto a las partículas de CCMV funcionalizado, en ambos tipos disminuyó su potencial negativo (Tabla 8 y Tabla 10), pero solamente el cambio en la carga de las de CCMV-PEG-SD133\* fue estadísticamente importante (Tabla 11).

Debido a la presencia del anillo piridínico en la SD133\* es razonable que exista un aporte de carga negativa a la superficie de las cápsides virales. Si bien, todas las VNPs mantuvieron un potencial Z negativo, bastante alejado del 0, que a su vez les confiere estabilidad a pH de 7.4, el comportamiento de las cargas sigue dependiendo en gran medida de los residuos de aminoácidos de las cápsides, así como de cuáles y cuantos residuos son atacados en las reacciones de funcionalización (Duran-Meza et al., 2021). Por lo que, para explicar la forma en que cambia el potencial en cada virus, habría que hacer un balance de todas las cargas participantes. Lo que resulta notable es que cuando está presente el PEG en la cápside viral, los cambios en el potencial Z son más significativos, pues puede ser que el ligando este exponiendo más las cargas de la SD133\*.

Analizando los resultados anteriores, se encontró que las VNPs que tuvieron más diferencias significativas en los tres parámetros medidos, fueron BMV-6 SD133\*, BMV-PEG- 4 SD133\*, BMV-PEG-6 SD133\* y CCMV-PEG-6 SD133\*. Considerando esto y las tendencias observadas en cada tipo de VNP, se determinó que la probabilidad de que los virus se hayan funcionalizado con mayor número de moléculas, es más alta cuando la reacción se hizo a razón de 6 moléculas de SD133\* por proteína de cápside. Por ello, a partir de este punto solo se produjeron las VNPs bajo dicha condición y se hará referencia a ellas como BMV-SD133\*, BMV-PEG-SD133\*, CCMV-SD133\* y CCMV-PEG-SD133\*, en los siguientes experimentos.

Posteriormente, para evaluar si las VNPs con SD133\* obtenidas, pueden impedir la migración celular, se realizaron ensayos de herida con la línea celular MDA-MB-231. El ensayo de herida es un método sencillo

y útil para evaluar la migración celular colectiva la cual es distintiva de los procesos de invasión y metástasis del cáncer (Grada et al., 2017). Assefnia et al. (2014), demostraron que al bloquear la CDH11 con SD133, es posible inhibir la progresión del cáncer porque interfiere con la migración celular. Además, comprobaron que dicho farmacóforo tenía actividad *in vitro* sobre MDA-MB-231 en un rango de concentraciones desde 1 a 10  $\mu\text{M}$ , por lo que se escogieron las concentraciones 5 y 10  $\mu\text{M}$  de SD133\*, que en este caso es la molécula SD133 modificada con PEG, para también evaluarlas a través de ensayos de herida. Posteriormente, se propuso probar las VNPs con mejores resultados en modelo murino, también se realizaron los ensayos de herida en la línea celular de cáncer de mama triple negativo de ratón 4T1. En las Figuras 11 y 12, se observó que las heridas tratadas con BMV-PEG-SD133\* y con CCMV-PEG-SD133\* respectivamente, aún estaban abiertas al final del ensayo, por lo que, aparentemente, impidieron más la migración celular. Esto último se comprobó al estudiar la evolución del cierre de herida con respecto al tiempo. En las gráficas de la Figura 15.A y B, las tendencias en la migración, tanto con BMV-PEG-SD133\* como con CCMV-PEG-SD133\*, fueron muy similares ya que en ambos casos la zona libre de células cerró al 100% aproximadamente a las 16 h. A su vez, fueron las curvas más cercanas a la de SD133\* 10  $\mu\text{M}$ , que abarcaron el área de la herida 4 horas después, siendo el tratamiento de mayor efecto. Cuando se agregó la SD133\* a 5  $\mu\text{M}$  el cierre de la herida fue igual que con el DMSO, por lo tanto, no se pudo distinguir la actividad de la molécula a esta concentración (Figura 15.C).

Por otra parte, en las micrografías de las células 4T1, se encontró que las zonas rayadas que permanecieron abiertas a las 24 h del ensayo fueron las tratadas con BMV-PEG-SD133\* y CCMV-SD133\*. En la Figura 19.A se comprueba que las partículas que más disminuyeron el porcentaje de cierre fueron las de BMV-PEG-SD133\* incluso más que la molécula libre. También, destacó que el BMV nativo tuvo cierto efecto sobre la migración de estas células. En la Figura 19.B, el tiempo más prolongado de cierre fue de 24 h. correspondiente al de las células con CCMV-SD133\*, el doble de tiempo que le tomo al control. Sin embargo, la curva cruzó con las de CCMV nativo, CCMV-PEG-SD133\* y SD133 10  $\mu\text{M}$ , que mantuvieron porcentajes menores durante 20 h. de ensayo, por lo cual no se pudo distinguir una diferencia clara entre estas VNPs. Además, se corroboró la toxicidad del DMSO, este afecta considerablemente la migración celular de las 4T1, ver Figura 19.C, las células que recibieron este solvente no cubrieron la zona de rayado durante el tiempo monitoreado. Debido a esto, no se pudo observar la actividad de la SD133\* libre en esta línea celular.

La implantación de carcinoma mamario 4T1 en ratones BALB/c es un modelo muy utilizado para estudiar el cáncer de mama humano triple negativo, ya que imita de forma muy cercana la progresión de este (Kang et al., 2020; Pulaski y Ostrand-Rosenberg, 2000). Sin embargo, existen diferencias entre las células 4T1 y

las MDA-MB-231; primero, porque hay un porcentaje de diferencia de 3% entre la CDH11 de ratón y la humana (tienen un porcentaje de identidad del 97%) (Okazaki et al., 1994). Además, a pesar de ser células invasivas, las 4T1 expresan altos niveles de E-cadherina, mientras que la misma es suprimida en las MDA-MB-231 (Kang et al., 2020; Yang et al., 2007). Es por esto por lo que las VNPs, así como la molécula libre y el DMSO no actuaron de la misma manera en ambas líneas celulares. Aun así, es importante destacar que tanto en MDA-MB-231 como en 4T1, el BMV tenía un efecto menor en sobre la migración, después el BMV-SD133\* redujo un poco más el porcentaje de cierre de herida y BMV-PEG-SD133\* fue el que más interfirió con la migración celular.

Tras analizar los resultados obtenidos de cultivos celulares, se escogieron las VNPs de BMV-PEG-SD133\* para los ensayos en modelo murino. Al día 11 de la llegada los ratones hembra de la cepa BALB/c, fueron inoculados con las células 4T1 para provocar la formación de tumores. Durante todo el experimento se registró su peso. Ahmadabadi et al., 2020, observaron que ratones BALB/c tendieron a aumentar de peso durante las primeras dos semanas después de haberles inducido tumores con células 4T1, pero durante la tercera y cuarta semana sufrieron decremento significativo de este, síntoma característico del síndrome conocido como caquexia (K. C. H. Fearon et al., 2012). En la Figura 20.A de los resultados aquí obtenidos, se muestra que los ratones que recibirían el placebo y el BMV perdieron peso el día 9 post-inoculación. Posterior a eso, continuó el incremento en el peso como en los otros dos grupos hasta el día 25 post-inoculación, cuando se registró una disminución pronunciada, pero en todos los grupos. Es probable que la pronta caída en el peso de los grupos del placebo y BMV solo haya sido una depleción por la reciente inoculación de las células 4T1 y que la reducción conjunta en la cuarta semana, fuera el indicio de la caquexia, como se ha reportado antes (Ahmadabadi et al., 2020; K. Fearon et al., 2011). Es destacable que después de iniciar la administración de los tratamientos, el grupo del vehículo no pudo recuperar ni superar el peso que había alcanzado el día 6 post-inoculación, a diferencia de los que recibieron el virus nativo. Esto último se aprecia mejor en la gráfica de ganancia de peso de la Figura 20.B. También, es de interés que a pesar de que aleatoriamente el grupo que recibió las partículas de BMV-PEG-SD133\* fue el de menor peso promedio, es el que mayor porcentaje de ganancia de peso tuvo. Esto significa ganancia de masa muscular y tejido adiposo que se traduce a que poseen mayor resistencia ante el deterioro general de sus funciones, a la progresión del cáncer y a las lesiones metastásicas (Ahmadabadi et al., 2020; Bowen et al., 2015; K. C. H. Fearon et al., 2012). Por lo tanto, existe un aporte de las VNPs en el mantenimiento de la salud de los ratones.

Previamente, Peran et al., 2021 administraron dosis de 40 mg/Kg y 10 mg/Kg de SD133 por vía intraperitoneal a ratones con tumores pre-inducidos de cáncer pancreático mT3 y lograron disminución

significativa del tamaño de los tumores dependiendo de la dosis, es decir, a mayor cantidad de la molécula, mayor fue la decrecimiento de los tumores. Los resultados de los experimentos donde se probaron las BMV-PEG-SD133\*, mostraron que los tumores de cáncer de mama que recibieron las VNPs, disminuyeron de volumen (Figura 21) y peso promedio (Figura 22.A) en un 23% y 20% respectivamente, en comparación con el grupo control, sin alcanzar una diferencia significativa. En este sentido, hay que considerar que 100 µg de VNPs, pueden cargar como máximo 1.3 µg de SD133\*, cantidad drásticamente más baja que las dosis administradas por Peran et al., 2021. A pesar de esto, se observó un efecto negativo sobre el crecimiento de los tumores, relacionado con las VNPs. Es factible, que la disposición de la SD133\* sobre la partícula viral y la exposición que le da el PEG, favorezca la interacción con las células cancerosas, por lo cual, aunque sea necesario ajustar la cantidad de VNPs administradas para llegar a resultados estadísticamente significativos, hay indicios de que es una ventaja usar al BMV PEGilado como vehículo.

También, se observó que las curvas del análisis del peso de los ratones y el volumen de los tumores, que recibieron BMV y BMV-PEG-SD133\* tuvieron un comportamiento similar (Figura 20 y Figura 21). De la misma manera el peso de los tumores fue menor en estos dos grupos (Figura 22). Por lo anterior, se puede inferir que el BMV nativo forma parte del efecto negativo descubierto, pero, consistentemente, los mejores resultados fueron con BMV-PEG-SD133\* manteniendo la distinción entre ambas partículas.

## 4.2 Obtención del Nb anti-CDH11

Como se mencionó, para la obtención del Nb anti-CDH11 se partió de las células transformantes 5αF', las cuales contenían el fagémido pComb3XSS (ADN plasmídico) con el fragmento VHH insertado (Rosales, 2020). Al amplificar este fragmento de aproximadamente 400 pb (ver sección 3.4), se demostró que las colonias 4, 7, 10, 14, 18, 19, 21, 24, 25 y 28 contenían la secuencia de interés, por ello, su ADN plasmídico purificado se envió a secuenciar. Sin embargo, aunque se trataba del ADN de colonias aisladas e identificadas, se obtuvieron electroferogramas con señal ruidosa y picos superpuestos, lo que provocó que existieran datos de la secuencia ilegibles y varias incertidumbres, es decir, no indicaban con exactitud cuáles eran las bases nitrogenadas en ciertos puntos. Este tipo de problemas en la secuenciación están relacionados con la presencia de dos o más moléculas de ADN durante la reacción, debido, entre otras cosas, a preparar muestras de ADN con impurezas, o mezclas de plásmidos (AB, 2009; Nucleics, 2022). Lo anterior puede ocurrir debido a la selección de dos colonias muy cercanas en una placa de agar, o la colonia seleccionada puede contener dos o más plásmidos (AB, 2009; Nucleics, 2022; AE, 2014). La incertidumbre de los resultados de secuenciación pudo ser debido al último caso descrito previamente. Aun cuando las

células 5αF' utilizadas, provenían de la tercera ronda de selección por la técnica de despliegue de fagos (Rosales, 2020), es posible que estas bacterias alberguen múltiples plásmidos diferentes debido a la infección por más de un tipo de fago (Goldsmith et al., 2007). Particularmente la infección con el fago M13 puede conducir a la generación de dobles transformantes (Mohan y Weiss, 2014). Este fenómeno, es esencial para el despliegue de fagos, pero también concuerda y puede explicar las incertidumbres en los datos de secuenciación.

A pesar de que, con las secuencias obtenidas no se pudo realizar el modelado molecular de la proteína, al ingresarlas al BLAST® nos permitieron comprobar la presencia de regiones conservadas de Nbs de camélidos en los ADN plasmídicos de las colonias 10, 18, 19 y 26 (Tabla 20). A estos ADN se les asignó una letra y con ellos se trabajó la estrategia de expresar el fragmento VHH y obtener la proteína purificada de un Nb anti-CDH11.

El vector original utilizado, pComb3XSS, permite la expresión inducible del Nb soluble en el espacio periplásmico, a través de una cepa no supresora, como la TOP10F', por lo cual se utilizaron los 4 ADN plasmídicos seleccionados para transformar células electrocompetentes de esta cepa (Andris-Widhopf et al., 2000; Pardon et al., 2014). Una vez que se obtuvieron 30 colonias transformantes TOP10F' para cada ADN A, B, C y D, se probaron dos condiciones de inducción con IPTG; la primera incubando a 37°C por 5 h y la segunda a 30°C por 24 h.

El fagémido pComb3XSS, es una modificación del pComb3X, el cual anteriormente se empleó para la expresión de fragmentos solubles scFv induciendo por 5 h a 37 °C (Lim et al., 2004), en tanto, con el pComb3XSS, se indujo la expresión de fragmentos Fab solo 3 h después de añadir el IPTG (C. Li et al., 2011). Con base en estos antecedentes se probó el tiempo de 5 h para la inducción del fragmento VHH, sin embargo, como se analizó con las transformantes de los ADN A y B, en estas condiciones no se consiguió expresar la proteína del tamaño esperado (Figura 25.A ). Por otra parte, también se ha usado el sistema pComb3XSS-TOPF', para la expresión de fragmentos scFv, Fab y Nb a través de tiempos de inducción más prolongados (Andris-Widhopf et al., 2000; Lao et al., 2022; Ma y O'Kennedy, 2017), lo que coincide con el resultado observado, pues al aumentar considerablemente el tiempo y ajustar la temperatura, se logró observar la banda de interés en el gel de poliacrilamida presentado en la Figura 25.B.

Posteriormente, se realizó la extracción de la proteína expresada en el espacio periplásmico. La producción en periplasma ofrece importantes ventajas, pues facilita el plegamiento de la proteína de interés y permite liberarla selectivamente con bajas cantidades de proteínas celulares y contaminantes. Sin embargo, la

cantidad de proteína que puede expresarse es limitada debido al pequeño volumen que representa este espacio en las células *E. coli*. Es por tanto importante la elección de un método adecuado de extracción, que permita recuperar la mayor cantidad de proteína y mantener el extracto lo más limpio posible (Ghamghami et al., 2020). Diferentes técnicas se han empleado con este propósito, por ejemplo, Quan et al., 2013 descubrieron que los procedimientos de choque osmótico, tratamientos con lisozima-EDTA, digestión con polimixina y extracción con cloroformo, producen fracciones periplásmicas con cantidades sustanciales de proteínas citoplasmáticas solubles. A su vez, demostraron que la extracción con solución amortiguadora TES (tris-HCl, EDTA, sacarosa), es un método que genera extractos mucho más limpios, al compararlos con los de los otros protocolos mencionados. Por su parte, Ghamghami et al., 2020, determinaron que las condiciones óptimas de la solución amortiguadora para la extracción con TES eran tris-HCl 50 mM, EDTA 0.53 mM a pH 7.2 y un tiempo de incubación de 60 min.

Otra forma de disrumpir la membrana celular y liberar el contenido periplásmico, es por ciclos de congelación-descongelación, que se realizan con las células suspendidas en alguna solución amortiguadora salina (Lim et al., 2004; Ma y O'Kennedy, 2017) o incluso en combinación con TES (Olichon et al., 2007). En este caso, para asegurar el éxito de la extracción del Nb, primero se realizaron ciclos de congelación-descongelación en TES, lo que se comprobó por electroforesis de los extractos de colonias transformantes con los ADN C y D. Se observó que se obtuvo mayor cantidad de la proteína de interés a partir de dos colonias en especial; C1 y D4 (Figura 26), por ello se seleccionaron los extractos de ambas colonias, para volver a realizar extracciones, y poder comparar el resultado de los ciclos de congelación-descongelación en TES, con la extracción en las condiciones propuestas por Ghamghami et al., 2020. Ambos métodos fueron analizados en tiempos de incubación de 1, 3 y 5 h, con el objetivo de determinar si en algún punto se podría obtener la mayor cantidad de la proteína de interés y mejorar la pureza del extracto. Lo que se encontró fue que, en todos los extractos periplásmicos obtenidos de C1, la banda de la proteína de aproximadamente 15 kDa, era de intensidad y grosor similar, lo mismo se observó en los extractos de D4. Así también, fue similar el contenido de otras proteínas, es decir, no hubo gran diferencia entre las condiciones de extracción probadas (Figura 27). Es apenas perceptible que las muestras a las que no se les aplicó el tratamiento de congelación-descongelación resultaron ligeramente más limpias, especialmente cuando solo se incubaron por 1 h. Dicho lo anterior, se verificó que las condiciones propuestas por Ghamghami et al., 2020 son las más adecuadas, pues es un método simple con el cual no se sacrifica la cantidad de proteína de interés que puede recuperarse, ni la pureza de la fracción periplásmica.

En los resultados de las electroforesis observadas en las Figuras 24, 25 y 26 destaco la banda del NbD4, por lo cual se utilizó el Extracto periplásmico obtenido de 500 mL de cultivo de la colonia D4, para



estandarizar el protocolo de purificación de la proteína de interés. El fagémido pComb3XSS permite que los Nbs se expresen con una etiqueta 6xHis para facilitar la purificación a través de IMAC, gracias a lo cual es la técnica regularmente aplicada para anticuerpos, fragmentos scFv, Fab y Nbs que han utilizado el mismo sistema de expresión. En el presente trabajo, el Extracto periplásmico de la colonia D4, se pasó por una columna HisTrap para cromatografía por afinidad a Ni, esperando aislar la proteína de interés al menos en un 95%. Sin embargo, al analizar por electroforesis las fracciones eluidas, se encontró que solo contenían una proteína de aproximadamente 18 kDa (Figura 28). Existen diversos factores que pudieron estar relacionados con el fracaso en la purificación del NbD4 con este método. Uno de los problemas del uso de etiquetas de polihistidina es la unión inespecífica de proteínas no etiquetadas, como ocurrió en este caso. A pesar de que los residuos de histidina son relativamente poco frecuentes, algunas proteínas celulares contienen dos o más de estos residuos adyacentes que son suficientes para que tengan afinidad por la matriz de las columnas para IMAC (Bornhorst y Falke, 2000; Loughran et al., 2017). Además, se sabe que algunas proteínas etiquetadas con 6xHis muestran una unión débil a la resina de las columnas, que puede deberse al ocultamiento de la etiqueta (Loughran et al., 2017). También, se sabe que, en condiciones de estrés, *E. coli* puede producir quelantes de metales altamente específicos llamados metaloforos, a los cuales la técnica de IMAC es muy sensible. Se comprobó que estos metaloforos, cuando se producen, están principalmente asociados al espacio periplásmico. Por tanto, existen componentes de bajo peso molecular en el periplasma, que reducen la capacidad de unión de las proteínas etiquetadas con 6xHis a la columna HisTrap (Magnusdottir et al., 2009)(Loughran et al., 2017; Magnusdottir et al., 2009).

Las interferencias por uniones inespecíficas y metaloforos podrían solucionarse disminuyendo la cantidad de contaminantes del Extracto periplásmico. antes de pasarlo por la HisTrap. Precisamente, con la finalidad de mejorar la pureza o en el mejor de los casos, aislar casi por completo la proteína de interés, se probó la precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Sin embargo, no se obtuvo ninguna ventaja de esta, ya que todas las proteínas que contenía el Extracto periplásmico., comenzaron a precipitar en el mismo punto (Figura 28.B).

En vista de los resultados de los intentos de purificación, se recurrió a la SEC, que se recomienda para obtener Nbs de calidad cristalográfica (Pardon et al., 2014). Si bien IMAC es la técnica usualmente utilizada y es posible continuar analizando y solucionando cada uno de los factores que pudieron afectar esta, la SEC ofrece mejor grado de pureza y, en este caso, funcionó sin dificultades como método de purificación en un solo paso. Tras observar el gel mostrado en la Figura 30, se comprobó que las fracciones correspondientes a las del NbD4, no contenían ninguna otra proteína contaminante.

Después de la cuantificación de la proteína purificada, se calculó el rendimiento de producción de 17 mg/L de cultivo inducido. Aunque no se cuenta con un valor de rendimiento de referencia en el que se haya utilizado el mismo sistema de expresión para Nbs y comparar las técnicas de extracción y purificación, se ha descubierto que los rendimientos de producción de fragmentos VHH periplásmicos comúnmente oscilan entre 0.2-10 mg/L, y en pocos casos alcanzan los 50-70 mg/L (De Meyer et al., 2014; Kariuki y Magez, 2021; Olichon et al., 2007; Salema y Fernández, 2013). Por lo tanto, con los protocolos aquí utilizados se alcanzó un rendimiento superior a lo usual.

Finalmente, para probar que la proteína purificada es un Nb capaz de unirse al EC1-CDH11, se realizó una ELISA indirecta. Esta prueba fue revelada con un sustrato para HRP a base de luminol, compuesto químico que emite quimioluminiscencia y al oxidarse produce 3-aminofalato en estado excitado que emite luz entre 380 - 470 nm (B. Li et al., 2006). Para observar el resultado, se obtuvieron los espectros de emisión de cada uno de los pozos, tanto el luminol como el producto de su oxidación suelen ser espectralmente idénticos (Merényi et al., 1990) (Figura 31). Para el control negativo, un pozo fue bloqueado desde el inicio con BSA, por tanto, no ocurre la adhesión de ninguna de las proteínas añadidas posteriormente, así que al añadir el agente revelador no hay oxidación y el espectro observado es el que corresponde a la quimioluminiscencia del reactivo. En otro de los pozos, el HRP-anti-HA .11 se dejó incubando al principio por lo que al agregar el revelador debió ocurrir la reacción, y el espectro de emisión de esta funcionó como control positivo. Además de la etiqueta 6xHis, el vector pComb3XSS (Lao et al., 2022), provee al Nb una etiqueta de HA , de esta manera, en el pozo donde se colocó el NbD4, la emisión mayor al control negativo demostró que el HRP-anti-HA.11 pudo reconocer la etiqueta de HA. Por tanto, al colocar el antígeno EC1-CDH11, se esperaba que el NbD4 pudiera a unirse a este y en consecuencia la emisión después del revelado también fuera mayor que la del control negativo, tal como se observó en la Figura 31. Por tanto, se constató que la proteína de aproximadamente 15 kDa expresada y purificada, nombrada NbD4 es capaz de unirse al antígeno.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

Se trabajó en dos estrategias para bloquear la proteína CDH11 con el objetivo de inhibir la progresión del cáncer de mama. La primera de ellas utilizando el farmacóforo SD133\* y la segunda buscando la obtención de un Nb anti-CDH11.

A través de reacciones de funcionalización, se realizó la bioconjugación de BMV y CCMV con la molécula SD133\* y PEG-SD133\* a diferentes razones de moléculas por proteína de cápside. Mediante la caracterización de estas VNPs, se observó que el BMV, en ambos tipos de conjugación, tiende a disminuir de tamaño, mientras que el CCMV tiende a aumentar. También, se encontró que la funcionalización con PEG tuvo mayor influencia en el cambio del potencial Z, debido a que le da mayor exposición a la SD133\* sobre la superficie viral externa. Además, se realizaron análisis de varianza y comparaciones de medias de los tamaños, diámetros hidrodinámicos y potenciales Z, para determinar cuáles fueron los estadísticamente diferentes a los controles correspondientes. Con base en estos resultados se determinó que las VNPs mejor funcionalizadas fueron con la condición inicial de 6 moléculas por proteína de cápside.

Posteriormente, las VNPs seleccionadas fueron evaluadas en cultivo celular. A través de los ensayos de herida se demostró que el BMV-PEG-SD133\* retrasó 8 h la migración de células MDA-MB-231 y 12 h la de las 4T1 con respecto al control, razón por la cual se evaluaron *in vivo*.

Las partículas de BMV-PEG-SD133\* no lograron reducir significativamente el crecimiento en los tumores desarrollados por células 4T1 inoculadas en ratones BALB/c. Sin embargo, los ratones que recibieron este tratamiento tuvieron mayor ganancia de peso, lo cual contribuye al mantenimiento de sus funciones normales. A su vez, los tumores tratados con las VNPs tuvieron un 23% menos volumen y un 20% menos peso, así como una apariencia más pequeña que los del grupo placebo. Se determinó que BMV-PEG-SD133\* facilita la interacción de la SD133\* con la CDH11 de las células de tumorales y producen un efecto negativo sobre la progresión del cáncer.

Por otra parte, para la obtención del Nb anti-CDH11 se purificaron los ADN plasmídicos con el fragmento VHH, a partir de células 5αF', infectadas con bacteriófagos recombinantes M13, seleccionados por despliegue de fagos. Las secuencias de 4 de los ADN purificados demostraron tener regiones conservadas de Nbs derivados de llamas por lo cual se utilizaron para electrotransformar células TOP10F'. Después, se aislaron e identificaron colonias de transformantes de cada ADN.

La expresión de Nbs, se consiguió induciendo por 24 h a 30°C con IPTG 3 mM, el sistema pComb3XSS-TOP10F' en cultivos de colonias transformantes identificadas. Se logró que expresaran la proteína de aproximadamente 15 kDa y se estandarizó el método de extracción de periplasma con solución amortiguadora TES. El extracto periplásmico de mejor calidad se obtuvo incubando las células inducidas durante 1 h según lo propuesto por Ghamghami et al., 2020. Los protocolos de expresión y extracción establecidos se aplicaron en un cultivo más grande y la proteína soluble se logró purificar a través de una columna HiPrep Sephacryl S-100 HR para SEC, con un rendimiento alto de 17 mg/L de cultivo inducido. Finalmente, en el revelado del ensayo de ELISA indirecta, demostró que la proteína purificada fue capaz de unirse al dominio EC1 de la cadherina 11 (CDH11).

## Literatura citada

---

- AB Applied Biosystems. (2009, mayo). DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis Applied Biosystems Chemistry Guide. 2a ed. Consultado el 22 de diciembre de 2022 de [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms\\_041003.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_041003.pdf)
- AE Amplicon express. (2014, Abril). Troubleshooting DNA Sequencing: Evaluating Sanger DNA Sequencing Chromatogram Data. Consultado el 22 de diciembre de 2022 de <https://ampliconexpress.com/troubleshooting-dna-sequencing-evaluating-sanger-dna-sequencing-chromatogram-data/>
- ACS American Cancer Society. (2019). Tipos de cáncer de seno. Consultado el 09 de junio de 2021, de: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/compreension-de-un-diagnostico-de-cancer-de-seno/tipos-de-cancer-de-seno.html>
- Ackaert, C., Smiejowska, N., Xavier, C., Sterckx, Y. G. J., Denies, S., Stijlemans, B., Elkrin, Y., Devoogdt, N., Caveliers, V., Lahoutte, T., Muyldermans, S., Breckpot, K., y Keyaerts, M. (2021). Immunogenicity Risk Profile of Nanobodies. *Frontiers in Immunology*, 12. doi: 10.3389/fimmu.2021.632687
- Ahmadabadi, F., Saghebjo, M., Huang, C.-J., Saffari, I., y Zardast, M. (2020). The effects of high-intensity interval training and saffron aqueous extract supplementation on alterations of body weight and apoptotic indices in skeletal muscle of 4T1 breast cancer-bearing mice with cachexia. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 45(5), 555–563. doi: 10.1139/apnm-2019-0352
- Andris-Widhopf, J., Rader, C., Steinberger, P., Fuller, R., y Barbas, C. F. (2000). Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display. *Journal of Immunological Methods*, 242(1–2), 159–181. doi: 10.1016/S0022-1759(00)00221-0
- Assefnia, S., Dakshanamurthy, S., Guidry Auvil, J. M., Hampel, C., Anastasiadis, P. Z., Kallakury, B., Uren, A., Foley, D. W., Brown, M. L., Shapiro, L., Brenner, M., Haigh, D., y Byers, S. W. (2014). Cadherin-11 in poor prognosis malignancies and rheumatoid arthritis: common target, common therapies. *Oncotarget*, 5(6), 1458–1474. doi: 10.18632/oncotarget.1538
- Behdani, M., Zeinali, S., Khanahmad, H., Karimipour, M., Asadzadeh, N., Azadmanesh, K., Khabiri, A., Schoonooghe, S., Habibi Anbouhi, M., Hassanzadeh-Ghassabeh, G., y Muyldermans, S. (2012). Generation and characterization of a functional Nanobody against the vascular endothelial growth factor receptor-2; angiogenesis cell receptor. *Molecular Immunology*, 50(1), 35–41. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.11.013>
- Bornhorst, J. A. y Falke, J. J. B. T.-M. in E. (2000). [16] Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. En *Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins Part A: Gene Expression and Protein Purification* (Vol. 326). Academic Press. doi: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)26058-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)26058-8)
- Bowen, T. S., Schuler, G., y Adams, V. (2015). Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. Springer Nature, 6(3), 197–207. doi: <https://doi.org/10.1002/jcsm.12043>
- Bruckman, M. A. y Steinmetz, N. F. (2014). Chemical modification of the inner and outer surfaces of Tobacco Mosaic Virus (TMV). *Methods in Molecular Biology*, 1108, 173–185. doi: 10.1007/978-1-62703-751-8\_13

- Carlisle, R. y Coussios, C.-C. (2013). Mechanical approaches to oncological drug delivery. *Therapeutic Delivery. Future Science*, 4(10), 1213–1215. doi: 10.4155/tde.13.94
- Chakraborty, S. y Rahman, T. (2012). The difficulties in cancer treatment. *Ecancermedicalsecience. Cancer Intelligence*, 6, ed16–ed16. doi: 10.3332/ecancer.2012.ed16
- Charmsaz, S., Prencipe, M., Kiely, M., Pidgeon, G. P., y Collins, D. M. (2018). Innovative Technologies Changing Cancer Treatment. *Cancers. MDPI*, 10(6), 208. doi: 10.3390/cancers10060208
- Chen, J. H., Huang, W. C., Bamodu, O. A., Chang, P. M. H., Chao, T. Y., y Huang, T. H. (2019). Monospecific antibody targeting of CDH11 inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and represses cancer stem cell-like phenotype by up-regulating miR-335 in metastatic breast cancer, in vitro and in vivo. *BMC Cancer*, 19(1), 634. doi: 10.1186/s12885-019-5811-1
- Chen, X., Xiang, H., Yu, S., Lu, Y., y Wu, T. (2021). Research progress in the role and mechanism of Cadherin-11 in different diseases. *Journal of Cancer*, 12(4), 1190–1199. doi: 10.7150/jca.52720
- Chen, Z., Li, N., Li, S., Dharmarwardana, M., Schlimme, A., y Gassensmith, J. J. (2016). Viral chemistry: the chemical functionalization of viral architectures to create new technology. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 8(4), 512–534. doi: 10.1002/wnan.1379
- Chung, Y. H., Cai, H., y Steinmetz, N. F. (2020). Viral nanoparticles for drug delivery, imaging, immunotherapy, and theranostic applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 156, 214–235. doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.024>
- Comellas-Aragonès, M., de la Escosura, A., Dirks, A. (Ton) J., van der Ham, A., Fusté-Cuñé, A., Cornelissen, J. J. L. M., y Nolte, R. J. M. (2009). Controlled Integration of Polymers into Viral Capsids. *Biomacromolecules. American Chemical Society*, 10(11), 3141–3147. doi: 10.1021/bm9007953
- Dalle, A., Falchi, F., Donini, S., Dobric, A., Germain, S., Di Martino, G. P., Prosdociimi, T., Vettraiño, C., Torretta, A., Cavalli, A., Rigot, V., André, F., y Parisini, E. (2019). Structure-Based Virtual Screening Allows the Identification of Efficient Modulators of E-Cadherin-Mediated Cell–Cell Adhesion. *En International Journal of Molecular Sciences*, 20(14). doi: 10.3390/ijms20143404
- De Meyer, T., Muyldermans, S., y Depicker, A. (2014). Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends in Biotechnology*, 32(5), 263–270. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.03.001>
- Duran-Meza, A. L., Villagrana-Escareño, M. V, Ruiz-García, J., Knobler, C. M., y Gelbart, W. M. (2021). Controlling the surface charge of simple viruses. *PLOS ONE. Public Library of Science*, 16(9), e0255820. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255820>
- Fearon, K. C. H., Glass, D. J., y Guttridge, D. C. (2012). Cancer Cachexia: Mediators, Signaling, and Metabolic Pathways. *Cell Metabolism*, 16(2), 153–166. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.06.011>
- Fearon, K., Strasser, F., Anker, S. D., Bosaeus, I., Bruera, E., Fainsinger, R. L., Jatoi, A., Loprinzi, C., MacDonald, N., Mantovani, G., Davis, M., Muscaritoli, M., Ottery, F., Radbruch, L., Ravasco, P., Walsh, D., Wilcock, A., Kaasa, S., y Baracos, V. E. (2011). Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *The Lancet Oncology*, 12(5), 489–495. doi: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70218-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70218-7)

- Ghamghami, E., Abri Aghdam, M., Tohidkia, M. R., Ahmadikhah, A., Khanmohammadi, M., Mehdipour, T., Mokhtarzadeh, A., y Baradaran, B. (2020). Optimization of Tris/EDTA/Sucrose (TES) periplasmic extraction for the recovery of functional scFv antibodies. *AMB Express*. Springer Berlin Heidelberg, 10(1). doi: 10.1186/s13568-020-01063-x
- Gillitzer, E., Willits, D., Young, M., y Douglas, T. (2002). Chemical modification of a viral cage for multivalent presentation. *Chemical Communications*, 2(20), 2390–2391. doi: 10.1039/b207853h
- Goldsmith, M., Kiss, C., Bradbury, A. R. M., y Tawfik, D. S. (2007). Avoiding and controlling double transformation artifacts. *Protein Engineering, Design and Selection*, 20(7), 315–318. doi: 10.1093/protein/gzm026
- Grada, A., Otero-Vinas, M., Prieto-Castrillo, F., Obagi, Z., y Falanga, V. (2017). Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *Journal of Investigative Dermatology*. Elsevier, 137(2), e11–e16. doi: 10.1016/j.jid.2016.11.020
- Grun, M. K., Suberi, A., Shin, K., Lee, T., Gomerding, V., Moscato, Z. M., Piotrowski-Daspi, A. S., y Saltzman, W. M. (2021). PEGylation of poly(amine-co-ester) polyplexes for tunable gene delivery. *Biomaterials*, 272, 120780. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.120780>
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hammers, C., Songa, E. B., Bendahman, N., y Hammers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 363(6428), 446–448. doi: 10.1038/363446a0
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059
- Hanahan, D. y Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*. Elsevier, 100(1), 57–70. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9
- Hanahan, D. y Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. Elsevier Inc., 144(5), 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hema, M., Vishnu Vardhan, G. P., Savithri, H. S., y Murthy, M. R. N. (2019). Chapter 6 - Emerging Trends in the Development of Plant Virus-Based Nanoparticles and Their Biomedical Applications. V. B. T.-R. D. in A. M. and B. Buddolla (ed.). Academic Press. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816328-3.00006-4>
- INEGI Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2014). Estadísticas a propósito del día internacional contra el cáncer de mama. Consultado el 16 de mayo de 2021, de: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2014/mama0.pdf>
- INEGI Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2020). Estadísticas a propósito del día Mundial de la lucha contra el cáncer de mama. Consultado el 17 de mayo del 2021, de: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2020/Cancermama20.pdf>
- INEGI Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2021). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Consultado el 17 de mayo de 2021, de: [https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021\\_Nal.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_Nal.pdf)
- Kaiser, C. R., Flenniken, M. L., Gillitzer, E., Harmsen, A. L., Harmsen, A. G., Jutila, M. A., Douglas, T., y Young,



- M. J. (2007). Biodistribution studies of protein cage nanoparticles demonstrate broad tissue distribution and rapid clearance in vivo. *International Journal of Nanomedicine*. Dove Medical Press, 2(4), 715–733. doi: 10.2147/IJN.S2.4.715
- Kang, W., Ding, C., Zheng, D., Ma, X., Yi, L., Tong, X., Wu, C., Xue, C., Yu, Y., y Zhou, Q. (2021). Nanobody Conjugates for Targeted Cancer Therapy and Imaging. *Technology in Cancer Research & Treatment*. SAGE Publications Inc, 20. doi: 10.1177/15330338211010117
- Kang, W., Fan, Y., Du, Y., Tonkova, E. A., Hsu, Y.-H., Tan, K. V., Alexander, S., Wong, B. S., Yang, H., Luo, J., Yao, K., Yang, J., Hu, X., Liu, T., Gan, Y., Zhang, J., Zhao, J. J., Konstantopoulos, K., Friedl, P., Khong, P. L., Lu, A., Hung, M.-C., Brenner, M. B., Segall, J. E., y Gu, Z. (2020). Post-EMT: Cadherin-11 mediates cancer hijacking fibroblasts. *bioRxiv*, 729491. doi: 10.1101/729491
- Karig, G., Spencer, J. A., y Gallagher, T. (2001). Directed Deprotonation–Transmetalation as a Route to Substituted Pyridines. *Organic Letters*. American Chemical Society, 3(6), 835–838. doi: 10.1021/ol006986z
- Kariuki, C. K. y Magez, S. (2021). Improving the yield of recalcitrant Nanobodies® by simple modifications to the standard protocol. *Protein Expression and Purification*, 185, 105906. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105906>
- Kovacs, E. W., Hooker, J. M., Romanini, D. W., Holder, P. G., Berry, K. E., y Francis, M. B. (2007). Dual-surface-modified bacteriophage MS2 as an ideal scaffold for a viral capsid-based drug delivery system. *Bioconjugate Chemistry*, 18(4), 1140–1147. doi: 10.1021/bc070006e
- Kyung Chang, S., Gu, Z., y Brenner, M. B. (2010). Fibroblast-like synoviocytes in inflammatory arthritis pathology: the emerging role of cadherin-11. *Immunological Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd, 233(1), 256–266. doi: <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00854.x>
- Lao, Z., Li, S., Liang, J., Su, J., Gong, X., Cui, X., y Zhao, S. (2022). Production and characterization of GPC3-N protein and its nanobody. *Protein Expression and Purification*, 195–196. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2022.106094>
- Li, B., Zhang, X., y Zhang, C. (2006). The second chemiluminescence emission of luminol–periodate–menadione sodium bisulfite system and its analytical application. *Analytica Chimica Acta*, 575(2), 212–216. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.05.095>
- Li, C., Zhang, F., Lin, H., Wang, Z., Liu, X., Feng, Z., Zhu, J., y Guan, X. (2011). Generation and characterization of the human neutralizing antibody fragment Fab091 against rabies virus. *Acta Pharmacologica Sinica*, 32(3), 329–337. doi: 10.1038/aps.2010.209
- Lim, K. P., Li, H. Bin, y Nathan, S. (2004). Expression and purification of a recombinant scFv towards the exotoxin of the pathogen, *Burkholderia pseudomallei*. *Journal of Microbiology*, 42(2), 126–132.
- Loughran, S. T., Bree, R. T., y Walls, D. (2017). Purification of Polyhistidine-Tagged Proteins BT - Protein Chromatography: Methods and Protocols.D. Walls y S. T. Loughran (eds.). Springer New York, New York, NY. doi: 10.1007/978-1-4939-6412-3\_14
- Ma, H. y O’Kennedy, R. (2017). Recombinant antibody fragment production. *Methods*, 116, 23–33. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.11.008>

- Magnusdottir, A., Johansson, I., Dahlgren, L.-G., Nordlund, P., y Berglund, H. (2009). Enabling IMAC purification of low abundance recombinant proteins from *E. coli* lysates. *Nature Methods*, 6(7), 477–478. doi: 10.1038/nmeth0709-477
- Merényi, G., Lind, J., y Eriksen, T. E. (1990). Luminol chemiluminescence: Chemistry, excitation, emitter. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*. John Wiley & Sons, Ltd, 5(1), 53–56. doi: <https://doi.org/10.1002/bio.1170050111>
- Mohan, K. y Weiss, G. A. (2014). Dual genetically encoded phage-displayed ligands. *Analytical Biochemistry*, 453, 1–3. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.02.025>
- Nucleics. (2022, Octubre). DNA Sequencing Troubleshooting: Mixed DNA Templates. Consultado el 22 de diciembre de 2022 de [https://www.nucleics.com/DNA\\_sequencing\\_support/DNA-sequencing-mixed-template.html](https://www.nucleics.com/DNA_sequencing_support/DNA-sequencing-mixed-template.html)
- Núñez-Rivera, A. (2020). CCMV y BMV como potenciales nanovehículos en tratamientos contra el cáncer de mama. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 77
- Okazaki, M., Takeshita, S., Kawai, S., Kikuno, R., Tsujimura, A., Kudo, A., y Amann, E. (1994). Molecular cloning and characterization of OB-cadherin, a new member of cadherin family expressed in osteoblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(16), 12092–12098.
- Olichon, A., Schweizer, D., Muyldermans, S., y de Marco, A. (2007). Heating as a rapid purification method for recovering correctly-folded thermotolerant VH and VHH domains. *BMC Biotechnology*, 7(1), doi: 10.1186/1472-6750-7-7
- OMS Organización Mundial de la Salud. (2021). Cáncer. Consultado el 17 de mayo del 2021, de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- OMS Organización Mundial de la Salud. (2021). Cáncer de mama. Consultado el 17 de mayo de 2021, de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
- OSU Oregon state University. (2009). Sequencing Troubleshooting. Consultado el 22 de diciembre de 2022 de <https://cqls.oregonstate.edu/core/sequencing/sanger-sequencing/sequencing-troubleshooting>.
- Pardon, E., Laeremans, T., Triest, S., Rasmussen, S. G. F., Wohlkönig, A., Ruf, A., Muyldermans, S., Hol, W. G. J., Kobilka, B. K., y Steyaert, J. (2014). A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nature Protocols*, 9(3), 674–693. doi: 10.1038/nprot.2014.039
- Peran, I., Dakshanamurthy, S., McCoy, M. D., Mavropoulos, A., Allo, B., Sebastian, A., Hum, N. R., Sprague, S. C., Martin, K. A., Pishvaian, M. J., Vietsch, E. E., Wellstein, A., Atkins, M. B., Weiner, L. M., Quong, A. A., Loots, G. G., Yoo, S. S., Assefnia, S., y Byers, S. W. (2021). Cadherin 11 Promotes Immunosuppression and Extracellular Matrix Deposition to Support Growth of Pancreatic Tumors and Resistance to Gemcitabine in Mice. *Gastroenterology*. Elsevier, Inc, 160(4), 1359- 1372.e13. doi: 10.1053/j.gastro.2020.11.044
- Pishvaian, M. J., Feltes, C. M., Thompson, P., Bussemakers, M. J., Schalken, J. A., y Byers, S. W. (1999). Cadherin-11 is expressed in invasive breast cancer cell lines. *Cancer Research*, 59(4), 947–952.

- Pohlodek, K., Tan, Y. Y., Singer, C. F., y Gschwantler-Kaulich, D. (2016). Cadherin-11 expression is upregulated in invasive human breast cancer. *Oncology Letters*. D.A. Spandidos, 12(6), 4393–4398. doi: 10.3892/ol.2016.5236
- Pucci, C., Martinelli, C., y Ciofani, G. (2019). Innovative approaches for cancer treatment: Current perspectives and new challenges. *Ecancermedalscience*, 13, pp. 1–26. doi: 10.3332/ecancer.2019.961
- Pulaski, B. A. y Ostrand-Rosenberg, S. (2000). Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Current Protocols in Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd, 39(1), 20.2.1-20.2.16. doi: <https://doi.org/10.1002/0471142735.im2002s39>
- Quan, S., Hiniker, A., Collet, J.-F., y Bardwell, J. C. A. (2013). Isolation of Bacteria Envelope Proteins BT - Bacterial Cell Surfaces: Methods and Protocols. A. H. Delcour (ed.). Humana Press, Totowa, NJ. doi: 10.1007/978-1-62703-245-2\_22
- Román, C. (1999). El proceso metastásico I: Invasión local de la matriz extracelular. *Actas Dermo-Sifiliográficas*.  
file:///00017310/0000009000000004/v0\_201507151129/13003470/v0\_201507151129/es/main.assets ER
- Roovers, R. C., Laeremans, T., Huang, L., De Taeye, S., Verkleij, A. J., Revets, H., de Haard, H. J., y van Bergen en Henegouwen, P. M. P. (2007). Efficient inhibition of EGFR signalling and of tumour growth by antagonistic anti-EGFR Nanobodies. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 56(3), 303–317. doi: 10.1007/s00262-006-0180-4
- Rosales-Fuerte, I.A. (2020). Selección y caracterización de nanoanticuerpos de camélidos Anti-CDH. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 80.
- Row, S., Liu, Y., Alimperti, S., Agarwal, S. K., y Andreadis, S. T. (2016). Cadherin-11 is a novel regulator of extracellular matrix synthesis and tissue mechanics. *Journal of Cell Science*. The Company of Biologists Ltd, 129(15), 2950–2961. doi: 10.1242/jcs.183772
- Running, W. E., Ni, P., Kao, C. C., y Reilly, J. P. (2012). Chemical Reactivity of Brome Mosaic Virus Capsid Protein. *Journal of Molecular Biology*, 423(1), 79–95. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.06.031>
- Salema, V. y Fernández, L. Á. (2013). High yield purification of nanobodies from the periplasm of E. coli as fusions with the maltose binding protein. *Protein Expression and Purification*, 91(1), 42–48. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.07.001>
- Steinmetz, N. F. y Manchester, M. (2009). PEGylated viral nanoparticles for biomedicine: the impact of PEG chain length on VNP cell interactions in vitro and ex vivo. *Biomacromolecules*, 10(4), 784–792. doi: 10.1021/bm8012742
- Strugała, A., Kręcis, M., Rybka, J. D., Urbanowicz, A., Szpotkowski, K., Bierwagen, P., Figlerowicz, M., Kozak, M., Böttcher, C., y Giersig, M. (2017). Biophysical analysis of BMV virions purified using a novel method. *Journal of Chromatography B*, 1068–1069, 157–163. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.10.022>

- Suarez-Arnedo, A., Figueroa, F. T., Clavijo, C., Arbeláez, P., Cruz, J. C., y Muñoz-Camargo, C. (2020). An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PLoS ONE. Public Library of Science*, 15(7 July), e0232565. doi: 10.1371/journal.pone.0232565
- Thurber, G. M., Schmidt, M. M., y Wittrup, K. D. (2008). Factors determining antibody distribution in tumors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(2), 57–61. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.11.004>
- Thurber, G. M., Zajic, S. C., y Wittrup, K. D. (2007). Theoretic Criteria for Antibody Penetration into Solid Tumors and Micrometastases. *Journal of Nuclear Medicine*, 48(6), 995 – 999. doi: 10.2967/jnumed.106.037069
- Tillib, S. V. (2011). “Camel nanoantibody” is an efficient tool for research, diagnostics and therapy. *Molecular Biology*, 45(1), 66–73. doi: 10.1134/S0026893311010134
- Tran, S., DeGiovanni, P., Piel, B., y Rai, P. (2017). Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery. *Clinical and Translational Medicine. Springer Berlin Heidelberg*, 6(1). doi: 10.1186/s40169-017-0175-0
- Van Audenhove, I. y Gettemans, J. (2016). Nanobodies as Versatile Tools to Understand, Diagnose, Visualize and Treat Cancer. *EBioMedicine*, 8, 40–48. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.04.028>
- Verhaar, E. R., Woodham, A. W., y Ploegh, H. L. (2021). Nanobodies in cancer. *Seminars in Immunology*, 52, 101425. doi: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2020.101425>
- Wen, A. M., Lee, K. L., Yildiz, I., Bruckman, M. A., Shukla, S., y Steinmetz, N. F. (2012). Viral nanoparticles for in vivo tumor imaging. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 69. doi: 10.3791/4352
- Xiang, D., Zheng, C., Zhou, S.-F., Qiao, S., Tran, P. H.-L., Pu, C., Li, Y., Kong, L., Kouzani, A. Z., Lin, J., Liu, K., Li, L., Shigdar, S., y Duan, W. (2015). Superior Performance of Aptamer in Tumor Penetration over Antibody: Implication of Aptamer-Based Theranostics in Solid Tumors. *Theranostics*, 5(10), 1083–1097. doi: 10.7150/thno.11711
- Yang, S., Du, J., Wang, Z., Yuan, W., Qiao, Y., Zhang, M., Zhang, J., Gao, S., Yin, J., Sun, B., y Zhu, T. (2007). BMP-6 promotes E-cadherin expression through repressing  $\delta$ EF1 in breast cancer cells. *BMC Cancer*, 7(1), 211. doi: 10.1186/1471-2407-7-211
- Yildiz, I., Shukla, S., y Steinmetz, N. F. (2011). Applications of viral nanoparticles in medicine. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(6), 901–908. doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.04.020>
- Yildiz, I., Tsvetkova, I., Wen, A. M., Shukla, S., Masarapu, M. H., Dragnea, B., y Steinmetz, N. F. (2012). Engineering of Brome mosaic virus for biomedical applications. *RSC Advances*, 2(9), 3670–3677. doi: 10.1039/C2RA01376B
- Yu, W., Yang, L., Li, T., y Zhang, Y. (2019). Cadherin Signaling in Cancer: Its Functions and Role as a Therapeutic Target. *Frontiers in Oncology*, 9, 989. doi: 10.3389/fonc.2019.00989
- Zare, H., Aghamollaei, H., Hosseindokht, M., Heiat, M., Razei, A., y Bakherad, H. (2021). Nanobodies, the potent agents to detect and treat the Coronavirus infections: A systematic review. *Molecular and Cellular Probes*, 55, 101692. doi: 10.1016/j.mcp.2020.101692

## Anexos

---

### Anexo A

**Tabla 21.** Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen VHH.

| Oligonucleótidos      | Secuencia                                     |
|-----------------------|-----------------------------------------------|
| VHHBACK- <i>Sfi</i> I | 5'-TAAGTAGGCCAGGCGGCCGATGTGCAGCTGCAGGAGTCT-3' |
| VHHFOR- <i>Sfi</i> I  | 5'-TAAGTAGGCCGGCCTGGCCGCTGGAGACGGTGACCT-3'    |

**Anexo B**

Secuencia aminoacídica del péptido sintético ectodominio 1 de cadherina-11 (EC1-CDH11), utilizado para el ensayo de ELISA.

*GWVWNQFFVIEEYTGPDVVLVGRHSDIDSGDGN*

## Anexo C

**Tabla 22.** Ecuaciones y coeficientes de determinación ( $R^2$ ) del ajuste polinomial aplicado a los datos de cada tratamiento en células MDA-MB-231.

| Tratamiento      | Ecuación                        | $R^2$ | Tratamiento       | Ecuación                                       | $R^2$ |
|------------------|---------------------------------|-------|-------------------|------------------------------------------------|-------|
| Control          | $y = -0.84 + 19.14x + 0.89x^2$  | 0.994 |                   |                                                |       |
| BMV              | $y = -0.766 + 15.73x - 0.60x^2$ | 0.994 | CCMV              | $y = -1.64 \times 10^{-14} + 13.56x - 0.13x^2$ | 0.997 |
| BMV-SD133*       | $y = -2.822 + 9.69x - 0.19x^2$  | 0.974 | CCMV-SD133*       | $y = -0.94 + 10.90x - 0.20x^2$                 | 0.990 |
| BMV-PEG-SD133*   | $y = -2.09 + 8.02x - 0.14x^2$   | 0.995 | CCMV-PEG-SD133*   | $y = -1.02 + 7.45x - 0.07x^2$                  | 0.996 |
| SD133* 5 $\mu$ M | $y = -0.48 + 11.90x - 0.29x^2$  | 0.998 | SD133* 10 $\mu$ M | $y = -0.37 + 6.21x - 0.06x^2$                  | 0.989 |

**Tabla 23.** Ecuaciones y coeficientes de determinación ( $R^2$ ) del ajuste polinomial aplicado a los datos de cada tratamiento en células 4T1.

| Tratamiento      | Ecuación                       | $R^2$ | Tratamiento       | Ecuación                         | $R^2$ |
|------------------|--------------------------------|-------|-------------------|----------------------------------|-------|
| Control          | $y = -0.96 + 15.38x - 0.57x^2$ | 0.991 |                   |                                  |       |
| BMV              | $y = 0.79 + 8.28x - 0.13x^2$   | 0.997 | CCMV              | $y = 2.06 + 4.84x - 0.005x^2$    | 0.979 |
| BMV-SD133*       | $y = 2.26 + 7.12x - 0.11x^2$   | 0.988 | CCMV-SD133*       | $y = 2.60 + 8.37x - 0.18x^2$     | 0.983 |
| BMV-PEG-SD133*   | $y = -0.74 + 6.38x - 0.09x^2$  | 0.999 | CCMV-PEG-SD133*   | $y = 0.23 + 5.60x - 0.04x^2$     | 0.973 |
| SD133* 5 $\mu$ M | $y = 1.67 + 3.84x - 0.05x^2$   | 0.996 | SD133* 10 $\mu$ M | $y = -1.18025 + 4.95x - 0.01x^2$ | 0.995 |