



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN BIOPROCESOS

**“EVALUACIÓN EN UN MODELO MURINO DE LA
INMUNOGENICIDAD DE UNA VACUNA
MULTIEPITÓPICA CONTRA EL CANCER DE MAMA”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN
BIOPROCESOS**

PRESENTA:

I.B.P. Andrea Narváez Monsiváis

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Sergio Rosales Mendoza

CO-DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Mildred Quintana Ruiz



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN BIOPROCESOS

“EVALUACIÓN EN UN MODELO MURINO DE LA
INMUNOGENICIDAD DE UNA VACUNA
MULTIEPITÓPICA CONTRA EL CANCER DE MAMA”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

PRESENTA:

I.B.P. Andrea Narváez Monsiváis

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Sergio Rosales Mendoza

SINODALES

PRESIDENTE:

Dr. _____

SECRETARIA:

Dra. _____

VOCAL:

Dra. _____

VOCAL:

Dra. _____

Proyecto realizado en:

Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSaB) con colaboración con el Laboratorio de Microscopia de alta resolución del CICSaB.

Con financiamiento de:

Proyecto CONACYT-Fronteras de la Ciencia No. 848290 y proyecto No. C-146/2021. Beca-Tesis del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT): 190542.

“El programa de Maestría o Doctorado en Ciencias en Bioprosos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí Pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 000588 nivel Maestría, en el Nivel Maestría (Consolidado)

Número de registro de la beca otorgada por CONACyT (CVU/Número de apoyo): 895988/704883



EVALUACION EN UN MODELO MURINO DE LA INMUNOGENICIDAD DE UNA VACUNA MULTIEPOTOPICA CONTRA EL CANCER DE MAMA por Andrea Narvaez Monsivais se distribuye bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-Compartirlgual 4.0 Internacional.

SUBCOMITÉ DE TESIS

Asesora: Dra. Gabriela Navarro Tovar

Asesora: Dra. Alma Gabriela Palestino Escobedo

Asesora: Dra. María del Carmen González Castillo

San Luis Potosí, S.L.P.
Agosto, 2021

**Comité Académico del Posgrado
en Ciencias en Bioprocesos
Facultad de Ciencias Químicas / UASLP
Presente.**

Por medio de la presente comunicamos que la tesis llevada a cabo por la alumna de Maestría PCBP. Andrea Narváez Monsiváis, titulada “Evaluación en un modelo murino de la inmunogenicidad de una vacuna multiepitópica contra el cáncer de mama”, ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para dar inicio a los trámites correspondientes para su titulación, la cual tendrá lugar el próximo día 19 de agosto del 2021 a las 17.00 hrs. en el Auditorio Chico (G203), de la Facultad.

ATENTAMENTE

Dr. Sergio Rosales Mendoza _____
Director de Tesis.

Dra. Mildred Quintana Ruiz _____
Co-Directora.

Dra. Gabriela Navarro Tovar _____
Asesora.

Dra. Alma Gabriela Palestino Escobedo _____
Asesora.

Agradecimientos Académicos

Quiero de manera especial agradecer a mi tutor, el Dr. Sergio Rosales, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo del laboratorio, así como por participar en mis seminarios y estar siempre pendiente de cualquier duda, incluso estando en ocasiones fuera del país y teniendo que conectarse en horarios diferentes. Gracias por seguir estudiando, leyendo y actualizándose para podernos transmitir a sus alumnos su conocimiento.

A la Dra. Mildred Quintana, por permitirme realizar una parte del proyecto en su laboratorio, así como por instruirme en el área de los materiales.

A la Dra. Gabriela Navarro, por ayudarme con todas las dudas que me surgieron, así como apoyarme en la presentación de los seminarios y proporcionarme material para profundizar en algunos temas.

A todos mis compañeros del laboratorio de Biotecnología por su apoyo durante los experimentos y por su buena disposición ante cualquier duda.

Finalmente, gracias a todo los profesores y personal administrativo que hace posible que el Posgrado de Ciencias en Bioprocesos sea de alta calidad.

Agradecimientos Personales

Quiero agradecer a mi esposo, Félix Reverte, por ser siempre mi mayor apoyo en este y otros proyectos. Gracias por motivarme y crecer conmigo. Todo logro mío es logro tuyo.

Gracias a mi hijo Félix porque, aunque es muy joven todavía, es mi mayor motor para mejorar y superarme.

A mi familia, especialmente a mis papás que han sido la base de mi formación y me han forjado como la persona que soy hoy. Todos mis logros se los debo a ustedes.

A mis amigos de la maestría, Fabi y Fernando que hicieron de las clases un lugar más divertido.

A mis compañeras del laboratorio Ale y Andrea, en quienes encontré una amistad muy especial y un gran apoyo no sólo en este proyecto, también en la etapa de convertirme en mamá.

A todos mis amigos y familia, gracias que sin ustedes no lo hubiera logrado.

TABLA DE CONTENIDO

SUBCOMITÉ DE TESIS	iv
RESUMEN	1
1. Introducción	1
Palabras claves.....	2
2. Objetivos.....	2
3. Material y métodos.....	2
3.1 Diseño de péptidos.....	2
3.2 Preparación de los MWCNTs.....	2
3.2.1 Purificación de los MWCNT (p-MWCNT)	3
3.2.2 Oxidación y corte de nanotubos (ox-MWCNT)	3
3.2.3 Aminación (f-MWCNT)	3
3.2.3.1 Reactividad a la Ninhidrina	3
3.3 Bioconjugación	4
3.3.1 HPLC	4
3.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	4
3.5 Estudios de citotoxicidad.....	5
3.5.1 Células HEK-293T	5
3.5.2 Esplenocitos	5
3.5.3 In vivo	5
4. Resultados y discusión	6
5. Conclusiones	7
Bibliografía	8
ANEXO	9
Anexo manuscrito enviado	10

RESUMEN

1. Introducción

De acuerdo con la OMS (2021), el cáncer puede afectar cualquier parte del organismo y se caracteriza por células anormales que se multiplican rápidamente y pueden invadir otras partes del cuerpo [1].

La inmunoterapia es una opción de tratamiento eficaz y prometedora contra el cáncer debido a su selectividad y sus efectos de larga duración; ha demostrado mejorar la supervivencia y la tolerancia, ya que utiliza componentes del propio sistema inmune del paciente, mitigando muchos de los efectos secundarios asociados con las opciones de tratamiento tradicionales [2].

Los antígenos tumorales que también se expresan en las células normales se denominan Antígenos Asociados a Tumores (AAT); en la mayoría de los casos estos antígenos son constituyentes celulares normales cuya expresión es aberrante o está regulada de forma anómala en los tumores [3]. Entre estos antígenos es de relevancia la proteína p53, la cual participa en la transcripción de genes inhibidores del crecimiento, apoptosis, arresto del ciclo celular y reparación del ADN. Un p53 defectuoso podría permitir que las células anormales proliferen dando por resultado cáncer; alrededor de un 50 % de todos los tumores humanos contienen mutaciones en p53 [4].

En la inmunoterapia del cáncer, uno de los principales requerimientos es la identificación de los péptidos inmunogénicos (epítopes), que estimulan a los CTL y CD4+, para usarlos en la vacunación de pacientes con cáncer. Las vacunas basadas en péptidos inmunogénicos pueden presentar baja respuesta inmune y en el intento de potenciar la respuesta inmune de las vacunas basadas en péptidos se ha recurrido al desarrollo de adyuvantes que superen esta limitante. En este contexto, los nanomateriales de carbono y en particular los nanotubos de carbono (CNT) son prometedores debido a su capacidad para ser internalizados en una amplia variedad de tipos celulares con una citotoxicidad mínima cuando son funcionalizados. Por lo tanto, los CNT pueden aplicarse como vehículos para administrar vacunas, con la ventaja de que aumentan la eficacia de los antígenos que no pueden inducir una respuesta suficiente y adecuada cuando se

administran individualmente [5]. Por lo tanto, este estudio ofrece perspectivas de futuro atractivas para el uso de los CNT como una nueva clase de adyuvante en la inmunoterapia antitumoral.

Palabras claves: cáncer, inmunoterapia, Antígenos Asociados a Tumores (ATT), p53, nanotubos de carbono (CNT).

2. Objetivos

- Diseñar péptidos que porten epítomos del antígeno p53 asociado a tumores de mama.
- Purificar, cortar, y funcionalizar los MWCNTs con aminas y carboxilos.
- Obtener nanovacunas dirigidas contra P53 empleando nanotubos de carbono como vehículo de entrega.
- Determinar la citotoxicidad de los nanotubos en cultivos de esplenocitos de ratón, cultivo de células HEK293T, in vivo en ratón BALB/c.

3. Material y métodos

3.1 Diseño de péptidos.

Se realizó el diseño de dos péptidos p53; p53b, con la secuencia PPLSQETFSDLWKLL y p53c, con la secuencia GSRAHSSHLKSKKGQSTSRHKK; ambos se mandaron sintetizar a Synpeptide Inc. (China).

3.2 Preparación de los MWCNTs.

Los MWCNT fueron sintetizados por Nanocyl SA con un diámetro:20-30 nm, largo: 10-30 μ m, pureza: 90%, #CAS 99685-96-8.

3.2.1 Purificación de los MWCNT (p-MWCNT)

Para la eliminación de las trazas de metal en los MWCNT, se tomaron 300 mg de MWCNT prístinos y se sonicaron 5 minutos en 300 ml de una solución de ácido nítrico 2.6 M. Se sometieron a reflujo 48 h a 125°C con agitación magnética. La solución se neutralizó, y los nanotubos se recuperaron mediante filtración. Se lavaron con H₂O desionizada y fueron secados al vacío por 10 h.

3.2.2 Oxidación y corte de nanotubos (ox-MWCNT)

La oxidación de los MWCNT se realizó con 100 mg de p-MWCNTs los cuales se sonicaron 5 h en 100 ml de solución 3:1 de H₂SO₄ y HNO₃; se recuperaron por filtración y se lavaron hasta alcanzar un pH neutro. Los ox-MWCNT de menor tamaño se colocaron en etanol y se sonicaron 1 hora para dispersar. Se centrifugaron a 5000 g por 1 hora para remover MWCNT de mayor tamaño que formaron pastilla, el sobrenadante se filtró y se recuperó.

3.2.3 Aminación (f-MWCNT)

Los ox-MWCNT se dispersaron y homogeneizaron en agua destilada (100 ml) mediante sonicación. Luego se añadió 4 - [(N-Boc) aminometil] anilina (2 g, 8,9 mmol) y nitrito de isoamilo (2 ml, 14.8 mmol) a la suspensión y la reacción se sometió a reflujo a 80°C durante 10 h. La suspensión se filtró y se lavó con N, N-dimetilformamida (DMF) y metanol hasta que las soluciones estuvieron libres de impurezas. El sólido negro obtenido se secó bajo vacío durante toda la noche. El corte de los grupos Boc se llevó a cabo por su dispersión en ácido clorhídrico (HCl) 4 M utilizando 1,4-dioxano como disolvente. La reacción se mantuvo agitada y a temperatura ambiente toda la noche, después se filtró y se lavó con DMF y metanol. Las muestras se secaron al vacío.

3.2.3.1 Reactividad a la Ninhidrina

La conjugación de grupos amino a la superficie de los MWCNT se comprobó mediante la prueba de la ninhidrina. Se colocaron en un tubo de ensayo 200 mg

de ninhidrina y 30 mg de hidrindantina disueltos en 7.5 ml de DMSO y se agregaron 2.5 ml de buffer de acetatos 4 M. En un tubo de ensayo se suspendió 1 mg de f-MWCNT en 1 ml de agua y 1 ml de la solución ninhidrina-hidrindantina. Se calentaron 20 minutos en baño maría y se enfriaron en baño de hielo. Se tomó una gota y se puso en 5 ml de una solución de etanol al 50%. Después de la homogenización, los f-MWCNTs se centrifugaron y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 570 nm. Se utilizó una curva estándar generada con β -alanina.

3.3 Bioconjugación

La conjugación se realizó mediante EDC. Los MWCNT se dispersaron a 1 mg / ml en tampón 50 mM de ácido 2- (N-morfolino) etanosulfónico (MES) con 7 mg de N-hidroxisuccinimida (NHS) y 9,5 mg de 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC); la mezcla se dejó reaccionar durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron individualmente los péptidos P53c y P53b. Las mezclas se centrifugaron y los sobrenadantes se recuperaron para el ensayo de HPLC. El MWCNT precipitado y biofuncionalizado se lavó y se resuspendió en PBS.

3.3.1 HPLC

Para determinar la concentración del péptido estudiado, se siguió un método de HPLC. Para ello, se inyectaron 0.05 ml de muestra (o estándar) a un caudal de 0.6 ml / min. Se produjo un gradiente lineal en 10 minutos que cambió de 100% A (0,1% de ácido trifluoroacético en agua) a 100% B (0,1% de ácido trifluoroacético en acetonitrilo). La detección se llevó a cabo a 214 nm.

3.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se incubaron en un rotador durante 24 h a 4°C los f-MWCNT y ox-MWCNT disueltos en PBS con la proteína modelo BSA. Posteriormente los MWCNT se recuperaron por centrifugación y se lavaron. Se realizó una electroforesis en gel poliacrilamida al 10% donde se agregaron los f-MWCNT, ox-MWCNT, BSA libre y

los MWCNT disueltos con BSA. Las bandas de BSA se detectaron mediante tinción en gel con azul de Coomassie.

3.5 Estudios de citotoxicidad

3.5.1 Células HEK-293T

El ensayo de resazurina se realizó para determinar la viabilidad de las células HEK-293T tratadas con MWCNT. Las células se cultivaron con f-MWCNTs-p53b-p53c a las dosis indicadas (1000, 500 y 100 μg) durante 48 h a 37°C y una atmosfera 5% CO_2 . Se trató un cultivo control con H_2O_2 . A continuación, las células se lavaron y se incubaron con resazurina durante 4 h al para la estimación de la viabilidad celular midiéndose la fluorescencia en un equipo FlexStation II.

3.5.2 Esplenocitos

Se utilizó el ensayo de conversión de resazurina para medir la viabilidad de los esplenocitos. Primeramente, se extrajeron las células del bazo de un ratón BALB/c en condiciones de esterilidad. Se colocaron 1×10^6 células/ml en 1 ml de medio RPMI completo por pozo con concanavalina $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ y diferentes dosis de ox-MWCNT y f-MWCNT (100, 500 y 1000 μg) por 24 h. Se cultivó un pozo con DMSO como control negativo y un pozo sin MWCNT como control positivo. Se incubaron a 37°C con 5% CO_2 por 24 h. Se añadió la resazurina (10% del volumen final) y 48 h después de iniciado el cultivo y se leyó la proliferación en un equipo FlexStation II.

3.5.3 In vivo

Ratones con 13 semanas de vida se inmunizaron cada dos semanas por un total de cuatro veces. Se obtuvieron porcentajes de sobrevivencia, así como el peso antes y después del tratamiento.

Los grupos fueron tratados con: dosis altas del conjugado f-MWCNTs-p53b-p53c, dosis bajas del conjugado f-MWCNTs-p53b-p53c, péptidos solos y péptidos con el adyuvante de Freund.

4. Resultados y discusión

El material de partida utilizado en el presente estudio consistió en MWCNT de 10-30 μm de longitud, en el que se observaron trazas metálicas en TEM. El éxito del tratamiento con ácido para su purificación y corte fue comprobado a ser observados en TEM y medidos usando el software DigitalMicrograph, donde los MWCNT muestran una longitud promedio entre 60 y 340 nm.

Los MWCNT puros y cortados se aminaron mediante la reacción Tour, y se utilizó un método indirecto para confirmar la presencia de grupos amino en el MWCNT basado en ninhidrina. La prueba de la ninhidrina dio como resultado la absorbancia de la muestra de 1 mg/ml de f-MWCNT de 0.1736 ± 0.0005 ; utilizando la curva estándar de β -alanina y multiplicando por tres, debido a la dilución hecha, la concentración obtenida de NH_2 en MWCNT fue de 45.2 $\mu\text{g/mL}$, que es un equivalente de 0,5 $\mu\text{mol/mg}$ de NH_2 en MWCNT.

La adsorción de BSA en MWCNT se realizó para probar la capacidad de bioconjugación con antígenos mediados por interacciones físicas. El análisis por SDS-PAGE reveló que f-MWCNT adsorbió eficazmente BSA, mientras que ox-MWCNT no lo hizo, lo que se atribuye a la atracción electrostática favorable entre la BSA cargada negativamente y los grupos amino de f-MWCNT.

Posteriormente, se realizó un análisis de HPLC para cuantificar p53b y p53c unidos a f-MWCNT, estimando el péptido remanente en el sobrenadante después de la reacción de bioconjugación con EDC. La densidad de los péptidos logró a tasas de 0.24 y 0.12 mg de péptido/mg de f-MWCNT para p53c y p53b, respectivamente.

Los efectos de f-MWCNT-p53b-p53c se evaluaron en células HEK-283T. Los f-MWCNT-p53b-p53c no tuvieron una citotoxicidad obvia en el rango de 100-500 μg comparados con las células que no se cultivaron con MWCNTs, pero la dosis de 1000 μg sí indujo una reducción de la viabilidad.

Fue posible observar que los esplenocitos de ratón tratados con ox-MWCNTs presentaron una disminución de la viabilidad mayor en contraste con los tratados

con f-MWCNTs; Sin embargo, ambos materiales mostraron una reducción en la viabilidad celular en concentraciones de 500 y 1000 µg. Ambos materiales se mostraron seguros en la dosis de 100 µg. Debido a la mejor biocompatibilidad de los f-MWCNT, se realizaron los siguientes análisis con éstos.

La evaluación de la toxicidad *in vivo* realizada en ratones reveló que ninguno de los grupos tratados con MWCNT mostró signos de toxicidad en términos de letalidad, pérdida de peso o supervivencia a largo plazo en comparación con los grupos de control tratados sin MWCNT.

5. Conclusiones

Los resultados presentados abren oportunidades de estudio relativas a la preparación y funcionalización de MWCNT. Se comprobó el éxito de aminación de los MWCNT por medio del ensayo de ninhidrina, así como la conjugación de los péptidos de interés por EDC de manera indirecta midiendo la proteína no reaccionante en HPLC. Los estudios de toxicidad probaron, al igual que en la literatura, que el nivel de funcionalización de los nanotubos de carbono puede aumentar significativamente su compatibilidad. La realización de estudios futuros permitirá determinar si los f-MWCNT-p53b-p53c tienen el potencial de inducir efectos antitumorales. Dadas sus propiedades, los nanotubos de carbono se consideran posibles vehículos de entrega y adyuvantes, seguros y óptimos para vacunas en el área de la inmunoterapia contra el cáncer.

Bibliografía

- 1.- World Health Organization. (2021). *Cancer*. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- 2.- Koury, J., Lucero, M., Cato, C., Chang, L., Geiger, J., Henry, D., & Tran, A. (2018). Immunotherapies: Exploiting the Immune System for Cancer Treatment. *Journal of immunology research*. doi:10.1155/2018/9585614
- 3.- Lichtman, A. (2012). Mecanismos efectores de la inmunidad celular. Abbas Abul K, Lichtman A, Pillai S. *Inmunología Celular y Molecular*. 7ma ed. Madrid: Elsevier Saunders, 217-9.
- 4.- Williams, A. B., & Schumacher, B. (2016). p53 in the DNA-damage-repair process. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(5).
- 5.- Battigelli, A., Ménard-Moyon, C., & Bianco, A. (2014). Carbon nanomaterials as new tools for immunotherapeutic applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(37), 6144-6156.

ANEXO

Anexo manuscrito enviado

← [Materials] Manuscript ID: materials-1332501 - Submission Received



Editorial Office <materials@mdpi.com>

Vie 23/07/2021 06:50 PM

Para: Sergio Rosales-Mendoza

CC: Usted; María Lourdes Betancourt-Mendiola; Omar González-Ortega; Andrea Romero-Maldonado; Alejandra Wong-Arce; Susan Farfan-Castro; Mildred Quintana



Dear Dr. Rosales-Mendoza,

Thank you very much for uploading the following manuscript to the MDPI submission system. One of our editors will be in touch with you soon.

Journal name: Materials

Manuscript ID: materials-1332501

Type of manuscript: Article

Title: Synthesis and characterization of multi-wall carbon nanotubes-based conjugates for epitope-specific cancer immunotherapy

Authors: Andrea Narvaez-Monsivais, María Lourdes Betancourt-Mendiola, Omar González-Ortega, Andrea Romero-Maldonado, Alejandra Wong-Arce, Susan Farfan-Castro, Mildred Quintana *, Sergio Rosales-Mendoza *

Received: 23 July 2021

E-mails: andrea_anm@hotmail.com, lourdes.betancourt@uaslp.mx, omar.gonzalez@uaslp.mx, andrea.romma@gmail.com, awa_2892@hotmail.com, a205029@alumnos.uaslp.mx, mildred.quintana@uaslp.mx, rosales.s@uaslp.mx

You can follow progress of your manuscript at the following link (login required):