



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de
Investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

VOTOS DE APROBATORIOS

Presidente del Consejo Directivo del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **DOMÍNGUEZ DÍAZ KATYA GISEL** con número de matrícula **20164004493** cuyo título es:

“EVALUACIÓN DE UN MÉTODO DE SELECCIÓN CLONAL ESPECÍFICO DE ANTÍGENO EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES DE LINFOCITOS B”

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **Licenciado Ciencias Área Terminal de Bioquímica y Biología Molecular**.

Cuernavaca, Mor a 19 de enero del 2022

Atentamente
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DRA. VERÓNICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA
DRA. MARÍA ANGELICA SANTANA CALDERON
DRA. HILDA MINERVA GONZÁLEZ SÁNCHEZ
DR. JESÚS MARTÍNEZ BARNETCHE
DR. IVAN MARTÍNEZ DUNCKER RAMÍREZ

PRESIDENTE
SECRETARIO
VOCAL
PRIMER SUPLENTE (NO PARTICIPA)
SEGUNDO SUPLENTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

HILDA MINERVA GONZÁLEZ SÁNCHEZ | Fecha:2022-01-19 12:25:05 | Firmante

xLn6KLbF92x4G9FPJu2WARpOGLiB570ougJnpENz6lUK012cs0GZ/zrLamWIZDJBRUtEuQ1NZILRtxa465buLJREF1YB6NI4D+j7T98bScmSfhACco0J6004tj/9UGZDnaHet+72cYmbllJt0Cu9VxOMBvAGACt4hBQGmVDKLuzjjsKaiREIY4mpfGokZSkzdVwWXPskWFK0tSBENyTas9zSttMMfbKrbQvSZgq2CkSuQKk9SJlipshabP+Svacc2+cwRnb+6OcNyNIW3w+VrEID8JoUswWtiyeYHTpRyWN6ErXzhFO9KoMRiUQI0DevQp0PKSxJTNRUhk9bVL7sQ==

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2022-01-19 12:26:15 | Firmante

eVS6eRUSjHOYU1KT10F3RhZM7Bjmqla5SfdCFoqudj+IVHnuWOYUJeHrxx4Bn0fyNrMR+a0WPNxxC5v8o2UQ45asTqn/BH4NSAu+TTIt8BxDosvT8Ak39By7pNLJdQvNwegrap8yxGtFcb12K046hezUOjOnoXJ9SiDi2IYO0PX94aAcI68XLzOq/O6uQWklwOF+RxRvGwC2eMnk6x+yrhriz7Jl5lNmminsLrCwOM7xMwX5op/BwMKhNF02y2Kzh95aqPgjbNGWLKp/Sj2Mr1yh3vkT5ihggAScbky4UgYPJ+dKijW Fiz9SALRWVIHOiEMqBJrvsqBThkCDCQ==

IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha:2022-01-19 12:34:02 | Firmante

D8bK3l1+3X5eQNZplne8Rq+PW8L7IGlrica6lKxHTgqu46xJzXBJSakxPTRdDRN5KbKF8ty2gohb0T7uXEjBbDclJ2cXpMSBnInuV/oi1ACAo08wiVwwYETF4NjkDx2VUMN10H06Zg3bWd8VvVfAMcYtMqn1N25hOlk3v7eNYbDL+K/wFJlF7tDjmJGFgt5f6EKxUhgE8OLQSS9rVDXo+kdGe7TZiCtZOz1sfa9r1TcJ+8A0QOUjy1r79zumEHqwXcn1lBkxwncJAwLTK9qmlyBFST/8b0L47AkuxC5EDYRXZ628yU9Kel4Um+rtsz40Wlp+VLqGqS4FeOcQWzvQ==

VERONICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA | Fecha:2022-01-19 14:44:05 | Firmante

PQMhHTUGDE1/T8CuhTs7YAClx+bITjPk0+2OYx6gcHo09dWe8RGUrzX12U4k7dt8Yc9ZOxhFF6blgsC/mYkMMWUG7vzCqTb6eCUdwtv8o4YLKeWfGD6nJCANXlh5xrpXJWfX8zaMqBIHFk3JoxN902frVyoQDQ/bnRX/9P2rYe5MhmY6+t8DweC/3uAcL2hZg1LKcjh58RlpVm3w471PliiQDPyTkManfvB4RjJf0pqi9cpbchY309SHhsuwcYatmm9hxPepuRsmAaepa8rAsQbSjBzRP/l6lajnrbVzrPI5eOyYvgfIjbGDTzaivuxQEE/t93GyLFoXxQ1cQuvF6+g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



qHKycXBp7

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/VkbgO7M4ORVgOrcZRKONjsMDHqcbchyl>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACION EN DINÁMICA CELULAR

**EVALUACIÓN DE UN MÉTODO DE SELECCIÓN CLONAL
ESPECÍFICO DE ANTÍGENO EN DIFERENTES LÍNEAS
CELULARES DE LINFOCITOS B**

TESIS

Que presenta:

Katya Gisel Domínguez Díaz

Para obtener el grado de LICENCIADO EN CIENCIAS
(Área terminal Bioquímica y Biología Molecular)

Sinodales:

Presidente: Dra. Verónica Mercedes Narváez Padilla

Secretario: Dra. Angélica Santana Calderón

Vocal: Dra. Hilda Minerva González Sánchez

Suplente: Dr. Jesús Martínez Barnetche

Suplente: Dr. Iván Martínez-Duncker Ramírez

Cuernavaca, Morelos a 25 de Agosto del año 2021.

ÍNDICE

	Página
Resumen-----	3
Introducción-----	5
Antecedentes-----	9
Justificación-----	12
Hipótesis-----	12
Objetivo general -----	12
Objetivos específicos-----	12
Metodología -----	13
1. Preparación de nanopartículas de quitosan recubiertas de SpA-----	13
1.1 Purificación del plásmido por el método de lisis alcalina (PureYield Plasmid Midiprep System).-----	13
1.2 Preparación de nanopartículas de quitosán.-----	14
2.Evaluación de la eficiencia de pegado de proteínas y DNA al quitosán-----	15
2. 1 Ensayo de BCA:-----	15
2.2 SDS-PAGE -----	16
2.3 Electroforesis de agarosa-----	18
3.Cultivo de líneas celulares de linfocitos B.-----	18
4.Incorporación específica de las Np-Ch a las células B.-----	19
4.1 Estandarización de la cantidad de células a emplear y cantidad de nanopartículas-----	19
4.2 Incorporación de las Np-Ch a las células B.-----	20
5.Evaluación del efecto de la incorporación de las nanopartículas de quitosán recubiertas de antígeno en la proliferación de los linfocitos B.-----	20
Resultados -----	21
Discusión -----	33
Conclusiones y perspectivas -----	38
Referencias -----	40

EVALUACIÓN DE UN MÉTODO DE SELECCIÓN CLONAL ESPECÍFICO DE ANTÍGENO EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES DE LINFOCITOS B

RESUMEN

La inmunidad adaptativa esta mediada por linfocitos T y B. Los linfocitos B son activados mediante mecanismos moleculares y celulares ante un estímulo (antígeno) identificado por su receptor de células B (BCR), induciendo su proliferación, su expansión clonal y diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos de larga vida y células B de memoria que entran en la reserva linfocítica recirculante [1], dichos procesos ocurren en los centros germinales (CG). En el CG los linfocitos B reciben señales derivadas del contacto con antígeno para la expresión de BCL-6. BCL-6 es un factor de transcripción que actúa como represor de la transcripción que promueve la proliferación de células B, permite la hipermutación somática, cambio de isotipo y ayuda a mantener la reacción del CG [1,2]. Por ello la expresión de BCL-6 es clave para la formación y mantenimiento de los CG. Por ello, la expresión de BCL-6 en los linfocitos B facilitaría la formación *in vitro* de CG, los cuales servirían como modelos para estudiar la memoria inmunológica y generar nuevos anticuerpos terapéuticos humanos.

En el presente trabajo se evaluó un método de selección clonal de linfocitos B, empleando nanopartículas de quitosán (Np-Ch) recubiertas de la proteína A de *Staphylococcus aureus* (SpA) como antígeno. Las Np-Ch fueron utilizadas como nanoacarreadores que transfirieron un vector codificante para la proteína BCL-6 a las células B antígeno-específicas. La hipótesis es que las Np-Ch recubiertas con antígeno servirán como un método de selección clonal para linfocitos B específicos de antígeno. Nuestros objetivos fueron 1) preparar las Np-Ch unidas a SpA y que contengan el vector codificante para BCL-6; 2) evaluar la especificidad de la incorporación de estas Np-Ch en líneas celulares de linfocitos B; 3) evaluar si la incorporación de las Np-Ch conteniendo el vector codificante para BCL-6 estimula la proliferación celular. Para probar la especificidad por el antígeno se emplearon 3 líneas celulares de linfocitos B, las células Daudi y Raji, que pertenecen al clan III

de las inmunoglobulinas y que reconocen al antígeno; y las células Ramos, pertenecientes al clan II y que fueron nuestro control negativo.

Logramos preparar con alta eficiencia las Np-Ch acopladas al vector y a SpA, así como sus respectivos controles. Las nanopartículas fueron incorporadas exitosamente por las células, sin embargo, no se encontró especificidad respecto al antígeno empleado, por lo que se cree que están siendo incorporadas por un mecanismo independiente de receptor. Por otro lado, se encontró que BCL-6 ejerce su función en la inducción de la división celular comparado con el control, así como también una mejor proliferación y viabilidad celular en comparación con aquellas que no incorporaron el vector. Concluimos que las mejores condiciones para la estimulación con las Np-Ch es la siembra de las células a una densidad de 1.25×10^4 células/mL, en medio RPMI suplementado con 10% SFB, empleando una cantidad de nanopartículas de entre 6-12 μL por cada 100 μL de medio por un período de 24 h. Dado que la incorporación de las Np-Ch resultó ser poco específica sugerimos que para experimentos posteriores se evalúe el empleo de quitosán de otro peso molecular, la densidad de proteínas en las Np-Ch, así como el empleo de linfocitos B de sangre periférica de voluntarios sanos.

INTRODUCCIÓN

Componentes del sistema inmune.

El sistema inmune está compuesto por órganos linfoides, por una gran gama de moléculas señalizadoras y por células que desempeñan funciones especializadas en las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. La inmunidad innata es el primer paso crítico en la defensa del huésped contra las infecciones y tiene otras funciones clave como la eliminación de tejidos muertos y el inicio de la reparación tisular.

Los principales componentes de la inmunidad innata son [1]:

- Barreras epiteliales (físicas) y sustancias antimicrobianas (químicas).
- Células como neutrófilos, macrófagos, dendríticas y linfocitos citolíticos naturales (NK).
- Proteínas pertenecientes al sistema de complemento.
- Citocinas reguladoras de la inmunidad innata.

Por otro lado, la respuesta inmune adaptativa proporciona la capacidad de reconocer y recordar patógenos específicos, generando respuestas más potentes ante subsecuentes enfrentamientos. Esta respuesta es mediada por linfocitos T y B, y es necesariamente activada por un antígeno. Una característica importante de la inmunidad adaptativa es la formación de la memoria inmunológica, con lo cual el sistema inmune es capaz de recordar los encuentros con microbios y reaccionar con más fuerza después de encuentros subsecuentes. Este fenómeno asegura que las reacciones de defensa del huésped sean eficaces contra infecciones repetidas o persistentes, y es la base sobre la que se fundamenta la vacunación [3].

Reconocimiento antigénico en el sistema inmune adaptativo

El reconocimiento de este sistema inmunitario lo efectúan moléculas de membrana celular (receptores) o moléculas solubles (anticuerpos) y funciona mediante la unión de un sitio activo en el receptor o el anticuerpo y regiones discretas en la estructura

del antígeno llamadas epítomos, o determinantes antigénicos. Los linfocitos T y B reconocen al antígeno a través de sus receptores para antígeno llamados TCR (T cell receptor) y BCR (B cell receptor), respectivamente. La estimulación por el antígeno, junto con otras señales complementarias, conduce a su proliferación clonal con la producción de dos grupos de células: las de memoria, que son de larga vida y conservan la especificidad de la precursora y células efectoras que llevan a cabo funciones definidas [1].

En el caso de los linfocitos T, éstos se encargan de montar respuestas celulares al destruir a células infectadas con patógenos y mediante la liberación de citocinas que permiten la activación y participación de otros grupos de células. Los linfocitos B son los encargados de montar la respuesta adaptativa humoral, la cual está mediada por anticuerpos secretados, y su función fisiológica es la de la defensa contra microorganismos extracelulares y toxinas microbianas.

El inicio de la respuesta humoral se da cuando los linfocitos B y T activados (específicos frente al mismo antígeno) se reconocen, migrando hacia los bordes de los folículos en órganos linfoides secundarios, donde surge la primera respuesta de anticuerpos. Las células T activadas expresan el ligando de CD40 (CD40L), el cual se une a CD40 ubicado en la superficie de las células B estimuladas por antígeno. Esta interacción, induce proliferación y diferenciación de los linfocitos B, así como la síntesis y secreción de inmunoglobulinas (Ig), al principio en focos extracelulares (sufren un cambio de isotipo limitado) y después en centros germinales [1].

Centros germinales y generación de anticuerpos de alta afinidad

Los centros germinales (CG) son estructuras organizadas que se producen unos 4-7 días después del inicio de una respuesta del linfocito B dependiente de T [1]. El CG está compuesto por una variedad de células y matriz extracelular que proporcionan señales para la proliferación, diferenciación y migración de las células B. Estas estructuras contienen células derivadas de solo uno o unos pocos clones

de linfocitos B específicos frente al antígeno y expresan un represor de la transcripción llamado BCL-6 (del inglés B cell lymphoma gen 6) [2].

La arquitectura de los CG se divide en dos regiones, una zona oscura llena de un cúmulo denso de linfocitos B que proliferan; y una zona clara donde los linfocitos B, interactúan con el antígeno presentado por las células dendríticas foliculares (FDC). Tras su interacción con las células B, las FDC liberan citocinas como IL-6 y BAFF, mientras que el antígeno es reconocido por el receptor específico de células B (BCR). La célula B también interactúa con el linfocito T cooperador folicular (TFH), el cual libera citocinas como IL-21 e IL-4, y reconoce al antígeno por medio de su receptor específico de células T (TCR).

La generación de anticuerpos monoclonales (mAbs) de alta afinidad requiere de la formación de CG, ya que en estas regiones ocurren los acontecimientos característicos de las respuestas dependientes del linfocito T cooperador, como: maduración de la afinidad, cambio de clase, y la generación de células plasmáticas de vida larga y linfocito B de memoria [1].

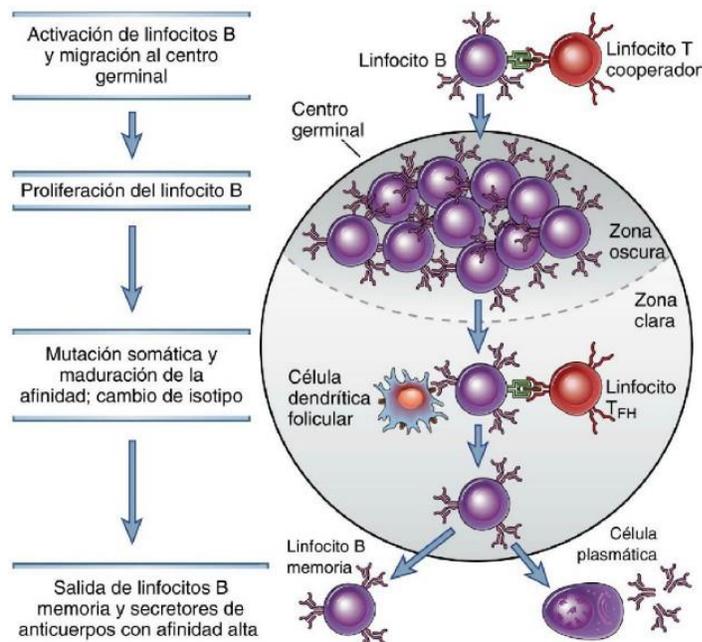


Figura 1. Estructura y función de un centro germinal.

Papel de Bcl-6 en la función del CG

Uno de los principales factores de transcripción implicados en la determinación del destino de los linfocitos B del CG es Bcl-6. BCL-6 es un gen que está ubicado en el cromosoma 3q27 y tiene un tamaño aproximado de 24kb y codifica para una proteína de 95kDa [16]. Esta proteína se expresa ante el estímulo de CD40 y del receptor para IL-21. Algunas de sus funciones más importantes en la reacción del CG son: cooperación con c-Myb, un activador de la transcripción para promover la entrada rápida al ciclo celular manteniendo la proliferación de los linfocitos B y por ende la reacción del CG [1], previene la activación prematura y diferenciación de las células B, proporciona un entorno tolerante a las roturas de DNA reprimiendo a p53, factor transcripcional que media la apoptosis ante daño al material genético, este daño es asociado a mecanismos de remodelación del gen de inmunoglobulina involucrados en la producción de anticuerpos de alta afinidad (hipermutación somática) de diferentes isotipos [16].

Una vez que bcl-6 se ha expresado en las células B, los niveles de esta proteína son regulados negativamente. Una vía para la inactivación/regulación de bcl-6 es mediante la interacción de alta afinidad entre el antígeno y el BCR, esto conduce a la activación de una cascada de señalización inducida por MAPK seguida de la fosforilación de BCL6, culminando en su degradación a través de la vía ubiquitina-proteasoma [17]. Por ello, Bcl-6 se expresa en células B en CG y no en células plasmáticas o de memoria.

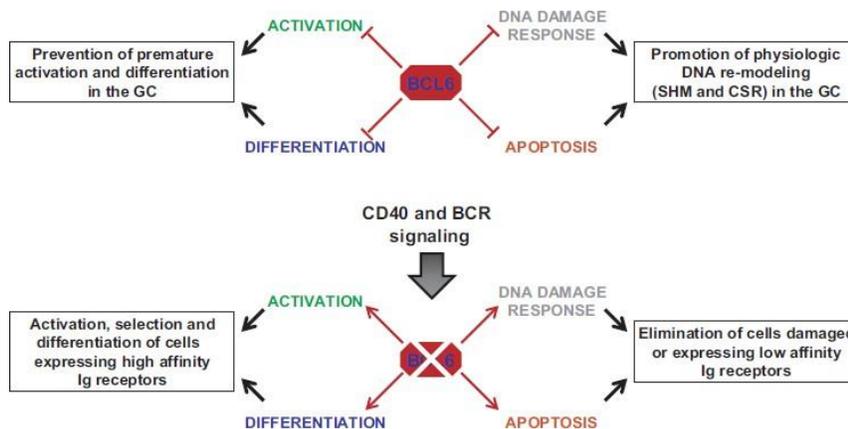


Figura 2. Regulación de los CG por Bcl-6.

ANTECEDENTES

Diversos modelos *in vitro* han sido utilizados con el objetivo de esclarecer los procesos que ocurren dentro de los CG, que conducen a la activación, proliferación y diferenciación de células B, así como la generación de mAbs altamente específicos. Una variedad de protocolos han sido descritos para proliferación de las células B, así como su diferenciación hacia células plasmáticas y células de memoria *in vitro*. En estos modelos, células B humanas o murinas son estimuladas con citocinas como IL-4, IL-21 y CD40L, añadidas al medio de cultivo. Sin embargo, un problema común en estos modelos es la elevada activación policlonal, generada por la estimulación inespecífica. Esto es que la administración de agentes estimulantes de forma soluble en el medio de cultivo, induce la activación de células B con diversas especificidades.

En los últimos años, los avances en ingeniería de materiales han generado nuevas alternativas para la presentación antigénica como el empleo de nanopartículas sintéticas. Las nanopartículas son partículas microscópicas con un tamaño entre 1 y 100 nanómetros y pueden estar hechas con base en distintos materiales orgánicos e inorgánicos como fosfolípidos, polímeros, metales, sílice y carbono [4].

Las nanopartículas pueden asemejar la naturaleza de los virus al adoptar características como la morfología a nanoescala y la visualización repetitiva de antígenos multivalentes. Es bien sabido que las superficies de los virus muestran una forma ordenada y repetida de sus epítomos, lo cual se ha relacionado con una manera en la que el sistema inmune de los mamíferos responde más fuertemente a estos patrones de repeticiones en el antígeno para desarrollar inmunidad adaptativa contra el patógeno [4]. Por ello, las nanopartículas tendrían la capacidad de inducir fuertes respuestas inmunes humorales y celulares contra diversas dianas antigénicas [4].

En este contexto, el sistema de complemento puede ser activado por las repeticiones de la partícula viral, involucrando el complejo CD19-CD21, lo cual facilita aún más la activación de células B [5], y amplifica otras vías de procesamiento inmunológico [6] culminando en una potencialización de la respuesta inmune. Además, las repeticiones multivalentes promueven la agrupación y entrecruzamiento de BCRs lo cual facilita la internalización por endocitosis mediada por receptor [4].

Varias vacunas basadas en nanopartículas que varían en composición, tamaño, forma y propiedades superficiales han sido aprobadas para uso humano y el número de candidatos está aumentando [22]. El uso de nanopartículas en formulaciones de vacunas permiten estabilidad del antígeno e inmunogenicidad, así como también una mayor seguridad, en contraste con las vacunas atenuadas, que por su naturaleza "viva" plantea problemas de seguridad, especialmente para las personas que pueden estar inmunodeprimidas [4].

Entre los diferentes materiales que pueden ser utilizados para la generación de nanopartículas, el quitosán ha sido ampliamente utilizado al ser un polímero biocompatible, biodegradable y de baja toxicidad, y, por tanto, potencialmente aplicable en medicina [7]. Estas nanopartículas poliméricas sintéticas son típicamente sólidas entre 10 nm y 200 nm [9]. Distintas investigaciones apuntan a

que el quitosano se une eficazmente al ADN en solución salina o de ácido acético y protege parcialmente al ADN de la degradación de las nucleasas [10, 11, 12]. Las nanopartículas de CS son resultado de una asociación o entrecruzamiento de sus cadenas poliméricas por interacciones intermoleculares así como también por asociaciones intramoleculares, pueden ser de tipo covalente y no covalente [9]. En nuestro grupo de investigación se desarrolló un método de estimulación de células B utilizando Np-Ch recubiertas con un antígeno específico, con la finalidad de estimular a células B específicas y evitar el problema de la activación policlonal que ocurre cuando se utilizan antígenos solubles [9]. Simultáneamente, las nanopartículas servirán como nanotransportadores al encapsular el vector codificante para la proteína Bcl-6. Para validar la especificidad de este método de estimulación, las Np-Ch se conjugarán con el superantígeno SpA (proteína A de *Staphylococcus aureus*). Elegimos el uso de un superantígeno, dado que éste es un factor con interacciones mediadas por receptor-antígeno con capacidad para interactuar con gran parte de la reserva linfocítica (más del 5%), mientras que los antígenos peptídicos convencionales generalmente interactúan con menos del 0,1% del repertorio de linfocitos vírgenes [18].

SpA es una proteína de 42 kDa con 5 dominios homólogos de 56 a 61 aminoácidos formando alfa hélices que se unen en tándem [18]. Cada uno de los cinco dominios tienen un sitio de unión a Fab [19]. Estos dominios en conjunto le brindan al superantígeno la capacidad de localizar células B que expresan anticuerpos relacionados con la familia VH3 [20], permitiendo interacciones con aproximadamente el 30-50% de células B en humanos [18].

JUSTIFICACIÓN.

Diversos modelos *in vitro* han sido utilizados con el objetivo de esclarecer los procesos que ocurren dentro de los CG, que conducen a la activación, proliferación y diferenciación de células B, así como la generación de anticuerpos monoclonales (mAbs) altamente específicos. Generalmente en estos modelos, se administran agentes estimulantes de forma soluble en el medio de cultivo, lo cual induce la activación de células B con diversas especificidades. Por ello, el desarrollo de un método de selección y estimulación específico de antígeno permitirá la activación de células B específicas, facilitando el aislamiento de mAbs y el estudio de los procesos que ocurren en el CG.

HIPÓTESIS

Nanopartículas de quitosán recubiertas con antígeno servirán como un método de selección clonal para linfocitos B, al ser incorporadas específicamente en un proceso mediado por el receptor de células B.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la especificidad de un método de selección clonal basado en nanopartículas de quitosán recubiertas con el superantígeno SpA empleando líneas celulares de linfocitos B humanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar nanopartículas de quitosán recubiertas con el superantígeno SpA.
2. Evaluar la especificidad de la incorporación de las nanopartículas conjugadas con antígeno en líneas celulares de linfocitos B humanos.
3. Determinar si la incorporación de nanopartículas de quitosán recubiertas de antígeno estimula la proliferación de líneas celulares de linfocitos B.

METODOLOGÍA

1. Preparación de nanopartículas de quitosán recubiertas con SpA.

1.1 Purificación del plásmido por el método de lisis alcalina (PureYield Plasmid Midiprep System).

Para la obtención del plásmido codificante para Bcl-6 se partió de un cultivo líquido de bacterias *E. coli* cepa DH5α previamente transformadas con un vector pIRES2-EGFP-Bcl6. El cultivo se centrifugó y se descartó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 150 µl de la solución I (50 mM Glucosa, 25 mM Tris-HCl pH8, 10 mM EDTA), se mezcló con ayuda del vortex, se le agregó 150 µl de la solución II (0.2 N NaOH, 1 % SDS) y se mezcló por inversión. A la muestra se le agregaron 150 µl de la solución III (29.5 g de acetato de potasio, 11.5 ml ácido acético glacial), y también se mezcló por inversión, seguido de una centrifugación a velocidad máxima por 10 min. Al sobrenadante se le añadió 1 mL de resina de diatomeas, se mantuvo por 3 minutos a temperatura ambiente en rotación, la mezcla se transfirió a una jeringa donde previamente se había colocado la columna promega y se filtró lentamente, enseguida se agregaron 2 mL de solución de lavado y de nuevo se pasó por la jeringa lentamente, la columna se colocó en un tubo eppendorf y se centrifugó por 2 min a velocidad máxima, la columna se colocó en un tubo nuevo y se le agregaron 30 µl de H₂O MQ estéril, el tubo con la columna se mantuvo a temperatura ambiente por 3 min y después se centrifugó a velocidad máxima por 2 min, se tomaron 2 µl para separarlo por electroforesis en un gel de agarosa al 1% para corroborar la presencia de DNA plasmídico, esperar la banda en el peso que corresponde el vector más el inserto, teniendo esto se prosiguió a realizar una PCR para mandar a secuenciar y así comprobar la secuencia de Bcl-6.

1.2 Preparación de nanopartículas de quitosán.

Las nanopartículas de quitosán se prepararon mediante el método de coacervación utilizando un 0.25 % de polímeros de quitosán, tripolifosfato de sodio (TPP), 10 µg de proteína (albúmina de suero bovino [BSA] o SpA) y 10 µg de DNA plasmídico (pIRES2-Bcl6-EGFP o el vector vacío[ø]). Para preparar el quitosán se diluyeron 2.5 mg de quitosán en 1 mL de ácido acético al 2% y se mezclaron durante 1 hora. La proteína se disolvió en agua miliQ y se preparó un stock de 2 mg/ml.

Con estos datos se construyó una tabla para preparar las nanopartículas:

Condición	Proteína 2 mg/ml	DNA Ø: 746.75ng/ µL BCL-6: 605.15ng/ µL	Quitosán 2%	Volumen Final
NP-Ch- Bcl-6- proteína	5 µL	13.39/16.52 µL	150 µL	200 µL
Control sin proteína		13.39/16.52 µL	150 µL	200 µL
Control sin quitosán	5 µL	13.39/16.52 µL		200 µL
Control sin DNA	5 µL		150 µL	200 µL

Los reactivos se añaden en el siguiente orden:

H₂O→quitosán→ DNA→proteína→TPP 10%. Cada uno de los reactivos se añaden en tubos enumerados en el orden indicado. Se les adicionó TPP 10% (entrecruzador) 10 µl cada 12 minutos 5 veces, mientras se agitaba la mezcla. Una vez terminado los 5 ciclos del TPP, se pasó el líquido a tubos eppendorf y se centrifugaron a 25°C, 3000 RPM por 30min. Una vez que se centrifugaron, el sobrenadante se colocó en tubos nuevos rotulados y el pellet se resuspendió en 500 µl de H₂O miliQ. Se centrifugó nuevamente y el sobrenadante se colocó en tubos nuevos rotulados, el pellet se resuspendió en 200 µl de H₂O miliQ y se guardaron a 4°C.

2. Evaluación de la eficiencia de pegado de proteínas y DNA al quitosán.

2.1 Ensayo de BCA:

Este ensayo de proteínas combina la reducción de Cu^{2+} a Cu^{1+} por proteína en un medio alcalino con la detección colorimétrica altamente sensible y selectiva del catión cuproso Cu^{1+} por ácido bicinconónico BCA. Primero ocurre la quelación de cobre con proteínas en un ambiente alcalino para formar un complejo azul claro, esta reacción es conocida como la reacción de biuret. Los péptidos que contienen tres o más residuos de aminoácidos forman un complejo de quelato coloreado con iones cúpricos en un ambiente alcalino que contiene tartrato de sodio y potasio. Hay un segundo paso de este ensayo, donde el BCA reacciona con el catión reducido (cuproso) que se formó anteriormente, el intenso producto de reacción de color púrpura resulta de la quelación de dos moléculas de BCA con un ion cuproso, este complejo exhibe una absorbancia lineal a 562 nm con concentraciones crecientes de proteínas.

Para este ensayo se prepararon 9 estándares a partir de un stock de BSA de 2 mg/ml con las siguientes concentraciones: 1500,750,500,250,125,50,25,5,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los estándares se pusieron por duplicado en la placa de 96 pozos más las muestras de interés (nanopartículas y sobrenadante) también por duplicado (25 μL).

Para preparar la solución A+B (Reactivo de trabajo) de acuerdo al Kit "Pierce BCA Protein Assay" con una relación de 50:1, se utilizaron 10 ml de la solución A y 200 μl de la solución B. Este stock se preparó en un tubo falcon de 50 ml y posteriormente se añadieron 200 μl de éste en cada pozo con muestra.

Las muestras se agregaron en campana pues requeríamos mantenerlas estériles. Una vez que se añadió todo, se incubó a 37°C por 30 min. Se prosiguió a leer la placa en el lector de placas ELISA a 540nm.

La eficiencia del pegado de la proteína se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Eficiencia} = \frac{[\text{Inicial}] - [\text{sobrenadante}]}{[\text{Inicial}]} \times 100$$

En donde inicial corresponde al sobrenadante de la muestra que no contiene quitosán, y que fue preparada de la misma forma que para las nanopartículas.

2.2 SDS-PAGE

Se prepararon geles de acrilamida con un espesor de 1 mm, de 8 x 10 cm, con un porcentaje de acrilamida al 10%. La polimerización se llevó a cabo a temperatura ambiente y los geles se dejaron reposar 10 minutos antes de su utilización.

Las muestras se desnaturalizaron diluyéndolas 1:1 (v: v) con buffer sample reductor: tris 120 Mm, glicerol 10 %, SDS 6%, beta- mercaptoetanol puro, azul de bromofenol 0.05%. El buffer sample no reductor: tris 120 mM, glicerol 20%, SDS 4%, azul de bromofenol 0.1% en agua hirviendo por 10 minutos.

Para el gel separador se adicionaron los siguientes reactivos en el siguiente orden:

Gel Separador	
REACTIVOS	VOLUMEN (6 ml)
Mezcla de acrilamida/bis-Acrilamida	2 ml
Tris-HCl 1M pH 8.8	2.25 ml
Agua bidestilada	1.62 ml
SDS 10%	60 µl
Persulfato de amonio al 10%	60 µl
TEMED	6 µl

Para el gel concentrador se adicionaron los siguientes reactivos en el siguiente orden:

Gel Concentrador	
REACTIVOS	VOLUMEN (3 ml)
Mezcla de acrilamida/bis-acrilamida	0.66 ml
Agua bidestilada	1.86ml
Tris-HCl 1M pH 6.8	416.66 μ l
SDS 10%	33.33 μ l
Persulfato de amonio al 10%	16.66 μ l
TEMED	3.33 μ l

Se preparó el gel separador y se añadió entre las placas hasta una altura aproximada de 1 cm del final del cristal, se agregó isopropanol a las placas para acelerar la polimerización y que estuviera uniforme el gel, se tardó en polimerizar unos 20 minutos. Después se retiró el isopropanol y se adicionó el gel concentrador, preparado momentos antes, hasta llenar totalmente el espacio entre los dos cristales, se incluyó el peine con cuidado, se polimerizó en unos 10 minutos. Posteriormente una vez transcurrido este tiempo se retiró el peine con cuidado, se montó en la cámara de electroforesis, se agregó el buffer de electroforesis y se cargaron las muestras de un volumen final de 25 μ l en cada pozo. Se corrieron a 100 V por 90 minutos, por último, se desmontó el gel, y se separaron los vidrios con ayuda de agua destilada, se tiñó con tinción de coomassie por 12 horas, y se destiñó con solución destiñidora a base de metanol y ácido acético.

2.3 Electroforesis de agarosa

Se preparó un gel de agarosa al 1%, en un matraz Erlenmeyer se colocó 1 g de agarosa y 100 ml de buffer TAE se mezclaron y se calentaron hasta la completa disolución de la agarosa. Una vez listo, se vertió la mezcla en la cámara previamente armada y se le adicionó 0.5 μ L de bromuro de etidio, se mezcló bien y se dejó polimerizar por aproximadamente 20 minutos. Se cargó un volumen total por

muestra de 10.5 μL por pozo, dicha muestra previamente preparada con buffer de carga (10 μL muestra + 0.5 μL buffer). Por último, se corrió a 95 V por 35 minutos.

3. Cultivo de líneas celulares de linfocitos B.

Se realizó el cultivo de las líneas celulares Daudi, Raji y Ramos para su posterior uso para la incorporación del antígeno en nanopartículas de quitosán. Las células congeladas deben estar a una temperatura inferior a $130\text{ }^{\circ}\text{C}$, preferiblemente en vapor de nitrógeno líquido, hasta que estén listas para su uso. Para asegurar el nivel más alto de viabilidad, se descongeló el vial agitando suavemente en un baño de agua a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguido del inicio del cultivo tan pronto como sea posible (la descongelación debe ser rápida, aproximadamente 2 minutos). Se retiró el vial del baño de agua tan pronto como se descongeló el contenido y se descontaminó sumergiéndolo o rociándolo con etanol al 70%. Todas las operaciones a partir de este momento se realizaron en estrictas condiciones de asepsia.

Se transfirió el contenido del vial a un tubo de centrifuga que contenía 9 ml de medio de cultivo completo y se centrifugó la suspensión celular a aproximadamente 125 rpm durante 5 a 10 minutos y se desechó el sobrenadante. Se agregó el contenido del vial (pellet) a un matraz de cultivo de 25 cm^2 o 75 cm^2 que contiene el medio de crecimiento fresco para el cual, previamente se colocó en la incubadora durante al menos 15 minutos para permitir que el medio alcanzara su pH normal (7,0 a 7,6). Es importante evitar una alcalinidad excesiva del medio durante la recuperación de las células. Se incubó el cultivo a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una incubadora adecuada y se recomienda un 5% de CO_2 en atmósfera de aire.

4. Incorporación específica de las Np-Ch a las células B.

4.1 Estandarización de la cantidad de células a emplear y cantidad de nanopartículas.

Previo a la incubación de las nanopartículas con Bcl-6 con las líneas celulares de linfocitos B, se probaron diferentes concentraciones de células Daudi, Ramos y Raji y se evaluó su proliferación a las 0, 24 y 48 h por un ensayo de MTS/PMS. El ensayo

se compone de dos soluciones; una sal interna de tetrazolio: [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfofenil) -2H-tetrazolio; MTS] y un reactivo de acoplamiento de electrones (metosulfato de fenazina; PMS). El MTS es biorreducido por las células a un producto de formazán que es soluble en medio de cultivo de tejidos. La absorbancia del formazán a 490 nm se mide directamente a partir de placas de ensayo de 96 pocillos sin procesamiento adicional. La conversión de MTS en formazán soluble acuoso se logra mediante enzimas deshidrogenasa que se encuentran en las células metabólicamente activas. La cantidad de producto de formazán medida por la cantidad de absorbancia de 490 nm es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo.

Las células se centrifugaron y se resuspendieron en medio completo con y sin suero fetal bovino al 10% (SFB 10%), se cultivaron a 3 distintas concentraciones cada línea celular (0.62×10^4 , 1.25×10^4 y 2.5×10^4). Para los posteriores experimentos se eligió la concentración de células en la que las 3 líneas celulares mostraban una duplicación similar a los distintos tiempos.

Para el ensayo de MTS/PMS primero se descongeló la solución MTS y la solución PMS en un baño de agua a 37°C, en un tubo de ensayo se añadió 2 ml de solución MTS y 100 µl de solución PMS y se mezcló suavemente para asegurar una combinación correcta de la solución MTS/PMS seguido de la adición de 20 µl de esta solución a cada pocillo de la placa de 96 ensayos que contiene 100 µl de células en medio de cultivo. Posteriormente se incubó la placa durante 1-4 h a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%. Por último, se midió la absorbancia a 490 nm utilizando un lector de placas ELISA.

Posteriormente se probó la concentración de nanopartículas a adicionar, usando únicamente la línea celular Daudi para estandarización, se evaluó la adición de 3, 6 y 12 µL de nanopartículas en un volumen final de 100 µL de suspensión celular (1.25×10^4 células/pozo, Daudi). Se evaluaron las concentraciones en medio RPMI con y sin suero. También se probaron concentraciones más bajas de

nanopartículas, diluyendo 1:10 las preparadas en el punto 2 de la metodología y empleando los mismos volúmenes (3, 6 y 12 μL en un volumen final de 100 μL). Cada determinación se realizó por cuadruplicado o quintuplicado.

4.2 Incorporación de las Np-Ch a las células B.

Se realizó la transferencia de las nanopartículas con Bcl-6 en las líneas celulares de linfocitos B y la evaluación de su expresión por inmunofluorescencia, para ello, se incubaron las células B con diferentes concentraciones de las Np-Ch durante 72 h a 37°C. Como control negativo utilizamos Np-Ch carentes de antígeno y recubiertas con BSA. La incorporación de las Np-Ch se evaluó por microscopía de fluorescencia al detectar la expresión de EGFP y realizando un estimado del número de células fluorescentes (observación de las células a las 24 h). El control negativo nos permitirá obtener el porcentaje de células no específicas que incorporen las Np-Ch, ya que se espera que solo las incorporen aquellas que tengan el BCR que reconozca al antígeno SpA.

5. Evaluación del efecto de la incorporación de las nanopartículas de quitosán recubiertas de antígeno en la proliferación de los linfocitos B.

Se incubaron las células Daudi con diferentes concentraciones de las Np-Ch durante 24, 48 y 72 h a 37°C. Como control negativo utilizamos Np-Ch con el vector vacío (sin Bcl-6). Se determinó la proliferación celular empleando el ensayo colorimétrico de MTS/PMS, además se evaluó la viabilidad celular empleando azul de tripán. Se esperaba que las células que expresen Bcl-6 proliferaran más, por ello se compararon con las que incorporaron el vector vacío. Para cada experimento se realizaron 3-4 réplicas. Además, para determinar la contribución de la expresión de Bcl-6, se comparó el efecto de la adición de Np-Ch conteniendo pIRES2-EGFP-Bcl6 o el vector vacío, en el cultivo celular.

RESULTADOS

Preparación de las Np-Ch-DNA conjugadas con antígeno y evaluación de la eficacia de pegado al quitosán

Previo a la preparación de las Np-Ch se purificó el vector pIRES2-EGFP-Bcl6 mediante un protocolo de lisis alcalina y se corroboró la presencia de éste en la muestra mediante electroforesis en gel de acrilamida al 1%. Posteriormente se llevó a cabo la preparación de las nanopartículas de acuerdo a la sección 1.2 de la metodología. Estas nanopartículas se sometieron a varios experimentos con la finalidad de poder evaluar su eficiencia de pegado de proteínas y DNA al quitosán, así como también ver que los componentes se encontraran en la muestra, para su posterior uso en cultivos de células B para su incorporación.

Para evaluar la eficiencia del pegado del DNA en las Np-Ch conjugadas con las proteínas se empleó un espectrómetro para la detección del DNA a 260nm. Se realizó el cálculo de eficiencia utilizando la fórmula indicada en los métodos. En la Tabla 1 se muestran los resultados de la eficiencia de la preparación de las Np-Ch empleando las proteínas BSA (control negativo) y SpA. Como podemos observar, en ambos casos la eficiencia de pegado del DNA al quitosán fue mayor al 80%. Como era de esperarse nuestros controles que no contienen DNA, la eficiencia de pegado fue del 0% ya que en esta muestra no pusimos el vector, mientras que, en ausencia de la proteína, la totalidad del DNA se pega al quitosán. En el control que no contiene quitosán tanto el DNA como la proteína permanecen en la fracción que recolectamos como sobrenadante, ya que no se forma el precipitado correspondiente a las Np-Ch.

CALCULO DE EFICIENCIA CUANTIFICACION DE DNA	
	% Eficiencia
Np-Ch-Bcl-6-SpA	89.40
Np-Ch- \emptyset -SpA	94.3
Np-Ch-Bcl-6-BSA	95.4
Np-Ch- \emptyset -BSA	96.8
Control sin proteína	100
Control sin DNA	-

Tabla 1. Eficacia de pegado de DNA a las Np-Ch.

Posteriormente, evaluamos la eficiencia de pegado de la proteína a las Np-Ch mediante un ensayo de BCA en el sobrenadante obtenido de la preparación de las Np-Ch. Se empleó la misma fórmula indicada en los métodos y se encontró que la eficiencia de pegado de la proteína a las Np-Ch con DNA fue del 100% (Tabla 2). De igual forma, en nuestro control sin proteína no se encontró proteína en el sobrenadante por lo que la eficiencia de esta muestra fue de 0 %. Estos resultados nos muestran que la preparación de las Np-Ch fue correcta, ya que tanto el DNA como la proteína se pegaron con alta eficiencia.

CALCULO DE EFICIENCIA CUANTIFICACION DE PROTEÍNA	
	% Eficiencia
Np-Ch-Bcl-6-SpA	100
Np-Ch- \emptyset -SpA	100
Np-Ch-Bcl-6-BSA	100
Np-Ch- \emptyset -BSA	100
Control sin proteína	-
Control sin DNA	100

Tabla 2. Eficacia de pegado de proteína a las Np-Ch.

Una vez que se calculó la eficiencia de pegado de la proteína y DNA al quitosán mediante su cuantificación, se prosiguió a corroborar con ayuda de geles de acrilamida y agarosa respectivamente. Se prepararon nanopartículas de quitosán al 0.5% disuelto en ácido acético al 0.2%, usando TPP, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA que fue tanto vector vacío como vector con Bcl-6 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ proteína, para corroborar que el DNA fuera encapsulado se realizó un gel de agarosa al 1%. Cuando el DNA se encapsula completamente, se observa en la electroforesis que el DNA no corre y se queda en el pozo, esto es porque el quitosán que encapsula el DNA tiene carga positiva (Figura 1).

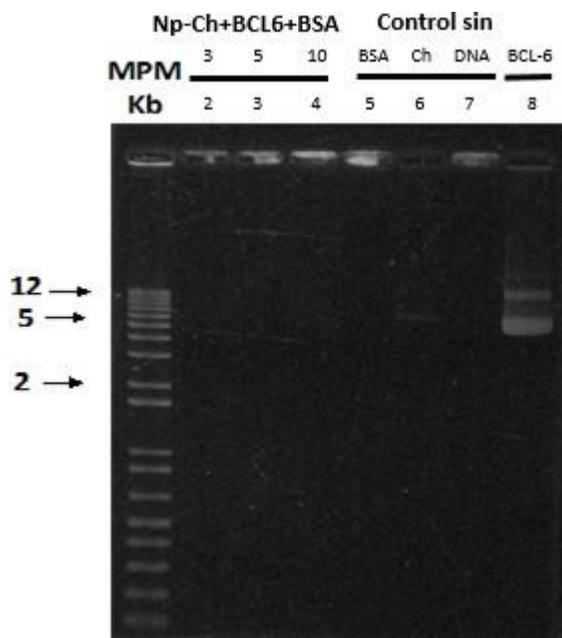


Figura 1. Electroforesis de la encapsulación del DNA por nanopartículas de quitosán: **1.** Marcador de peso molecular, **2-4.** Nanopartículas de quitosán conjugadas con 10 µg/mL BSA y DNA (PIRES2-EGFP) a las concentraciones de 3 (carril 2), 5 (carril 3) y 10 µg/mL (carril 4). **5.** Control de preparación de las Np-Ch sin BSA. **6.** Control de preparación de las Np-Ch sin quitosán. **7.** Control de preparación de las Np-Ch sin DNA (PIRES2-EGFP). **8.** PIRES2-EGFP-Bcl-6). En cada carril se cargaron 15 µl de muestra.

Para saber con más certeza si la proteína se estaba uniendo a Np-Ch, realizamos 4 experimentos independientes de SDS- PAGE, tanto de Np-Ch+ BSA+BCL-6 y con vector vacío (\emptyset) para tener un estimado de la proteína que no se pegaba y comparar con el ensayo de BCA. En la figura 2 se muestra el corrimiento de las Np-Ch conjugadas con proteína y DNA, con sus respectivos controles. Como podemos observar, en la proteína tiene un tamaño de 66.5 kDa (carril 1), cuando se tiene un exceso de proteína durante la preparación de las Np-Ch se observa una banda en este peso molecular. Sin embargo, en nuestro caso vemos que prácticamente toda la proteína se une al quitosán ya que se queda retenida en el pozo y no se observa banda en el peso molecular correspondiente al de la proteína. En los controles de preparación de las Np-Ch, observamos que al no añadir quitosán, la proteína corre libremente en el gel de acrilamida (carril 5 y 9).

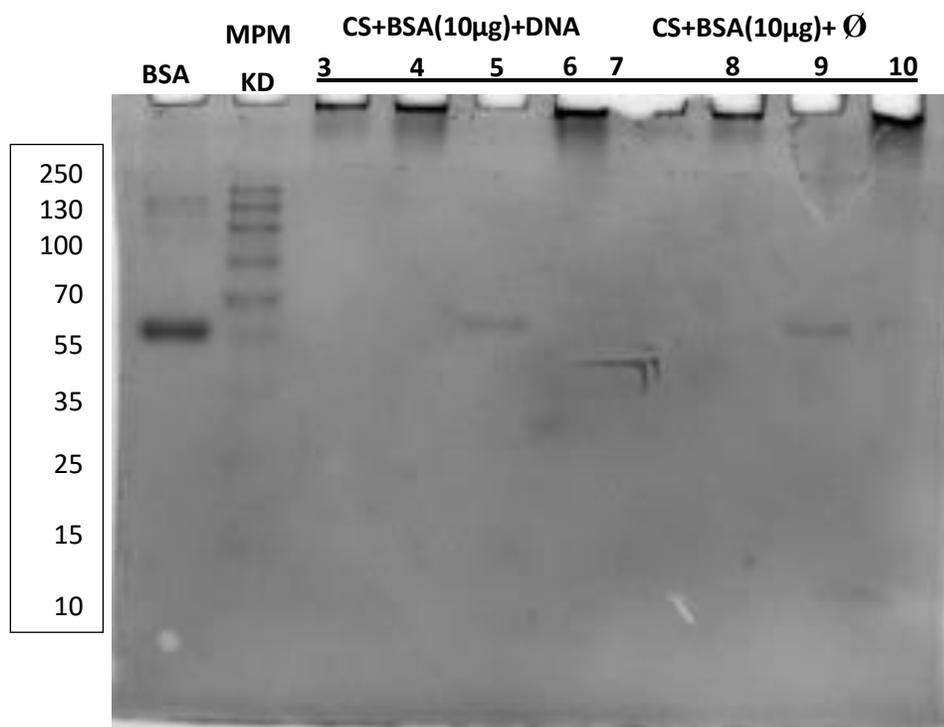


Figura 2. SDS-PAGE representativo de las nanopartículas de quitosán conjugadas a proteína y DNA. **1.** BSA(10 µg/mL). **2.** Marcador de peso molecular. **3.** Nanopartículas de quitosán conjugadas con 10 µg/mL BSA y DNA (PIRES2-EGFP). **4.** Control de preparación de las Np-Ch sin BSA. **5.** Control de preparación de las Np-Ch sin quitosán. **6.** Control de preparación de las Np-Ch sin DNA (PIRES2-EGFP). **7.** Nanopartículas de quitosán conjugadas con 10 µg/mL BSA y DNA (Ø). **8.**Control de preparación de las Np-Ch sin BSA. **9.** Control de preparación de las Np-Ch sin quitosán **10.** Control de preparación de las Np-Ch sin DNA (PIRES2-EGFP). En cada carril se cargaron 25 µl de muestra.

Incorporación específica de las Np-Ch a las células B.

Para determinar la concentración de células y de Np-Ch a utilizar en nuestros ensayos se emplearon las células Daudi y Raji a diferentes concentraciones para evaluar su tasa de proliferación en medio RPMI 10% suero fetal. Para esto, suspensiones celulares de ambas líneas celulares se contabilizaron con ayuda de una cámara de newbauer y se sembraron a diferentes concentraciones (0.62×10^4 , 1.25×10^4 y 2.5×10^4 células/mL), se dejaron en incubación a 37°C durante 0, 24 y 48 h. Al transcurrir este tiempo se realizó un ensayo de MTS/PMS y se obtuvieron las curvas de crecimiento correspondientes.

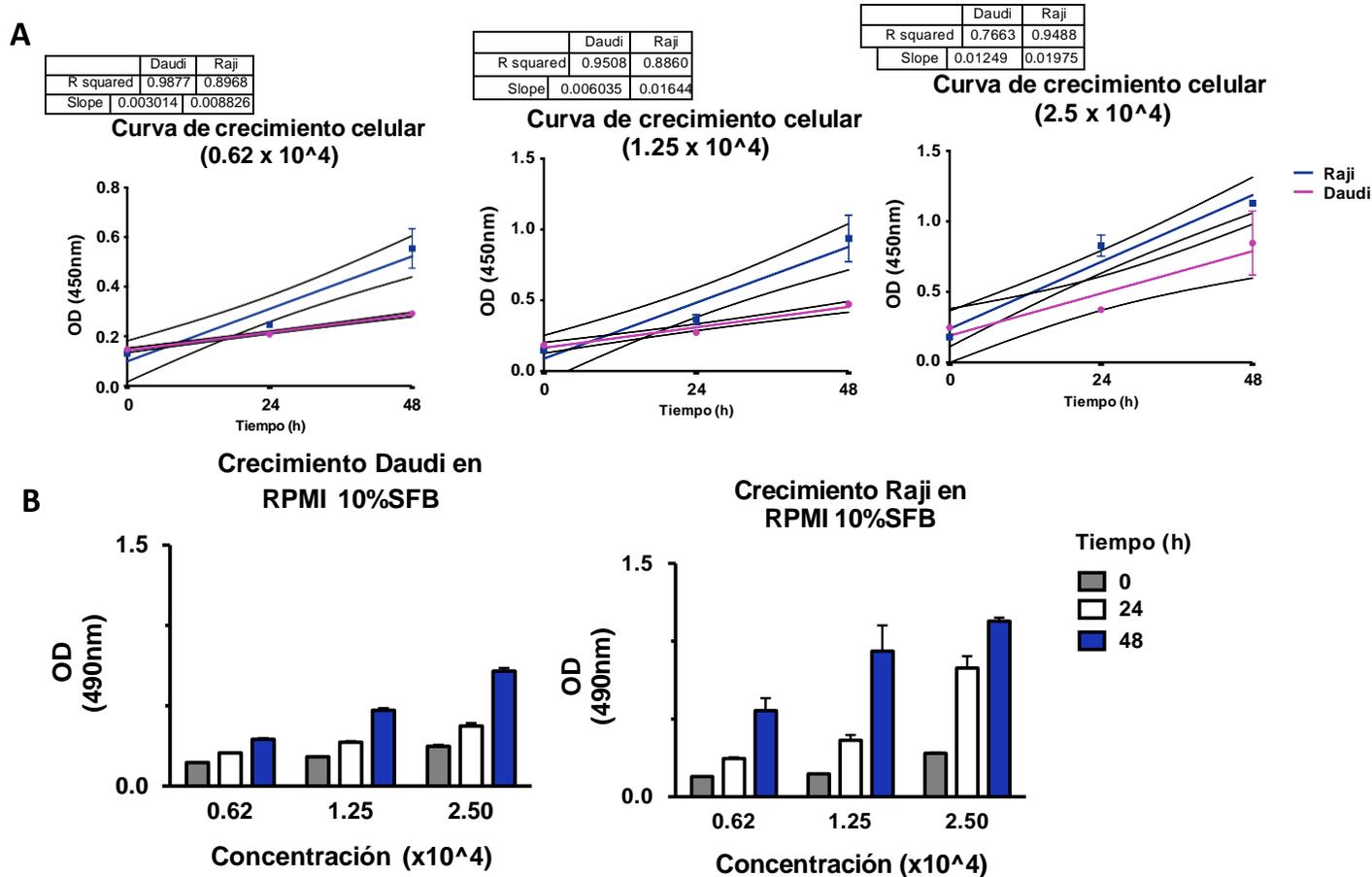


Figura 3. A. Curvas de crecimiento de las líneas celulares Raji y Daudi a distintos tiempos (0, 24, 48 h) en distintas concentraciones (0.62, 1.25 y 2.50 x 10⁴ células/ml), mediante un ensayo MTS/PMS a una absorción de 490 nm. **B.** Comparativo de la proliferación de las líneas celulares Daudi y Raji a diferentes tiempos y diferentes densidades celulares.

Como se presenta en la figura 3, las células Raji proliferan más rápidamente que las células Daudi, comparando diferentes densidades celulares a diferentes tiempos. En la figura 3A se observa que, aunque la linealidad (R^2) de la curva de crecimiento de las células Daudi sea mayor que la de las células Raji, para las concentraciones celulares de 0.62 y 1.25 x 10⁴, la pendiente observada es menor, lo cual nos representa la mayor proliferación de las células Raji. En estas curvas también vemos que la densidad óptica de ambas líneas celulares es similar a las 24 h para las concentraciones de 1.25 x 10⁴, así como las curvas de crecimiento son más similares a la concentración de 2.5 x 10⁴ células/ml, por ello estas condiciones

fueron utilizadas para experimentos posteriores para comparar ambas líneas celulares

En la figura 3B, observamos que las células Daudi tienen duplicación celular entre las 24 y 48 h, esto evidenciado por el incremento en la densidad óptica en estos tiempos a cada una de las concentraciones analizadas. En el caso de las células Raji, éstas proliferan más rápidamente, con un tiempo de duplicación cercano a las 24 h. Esto es más evidente cuando comparamos los datos experimentales de las dos líneas en una misma gráfica (Figura 4). De manera que se pueda apreciar la comparación entre las distintas líneas celulares a las 24 y 48 h. La figura 4, nos indica que a las 24 h ambas líneas celulares muestran una duplicación celular muy parecida cuando se siembran a una concentración de 1.25×10^4 células/ml.

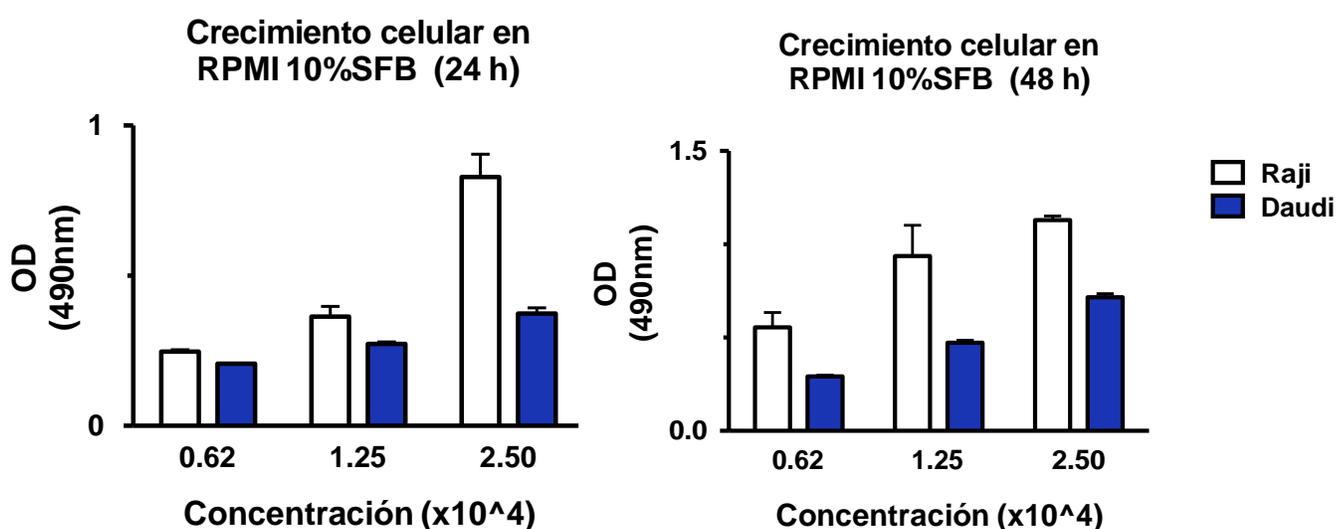


Figura 4. Comparativo del crecimiento de las líneas celulares Raji y Daudi a las 24 y 48 h en medio de proliferación, analizada mediante un ensayo MTS/PMS a una absorción de 490 nm. La concentración celular se muestra en 10^4 células por mililitro.

Una vez que ya se tenía la concentración celular y los tiempos a los cuales las células se deben sembrar para exhibir un crecimiento celular similar, el siguiente parámetro que se estandarizó fue el medio y la concentración de nanopartículas que se debe añadir a las células. Para esto, se preparó una suspensión de células Daudi a una concentración celular final de 1.25×10^4 cel/ml en medio suplementado con SFB al 10% y medio RPMI solo, se dejaron crecer por 24 horas. Se sembraron en placas de 96 pozos y se pusieron en presencia de nanopartículas conjugadas con BCL-6 (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y la proteína BSA (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se diluyeron 1:10 y se añadieron a las células a distintos volúmenes 3 μL y 12 μL en presencia y ausencia de SFB 10%.

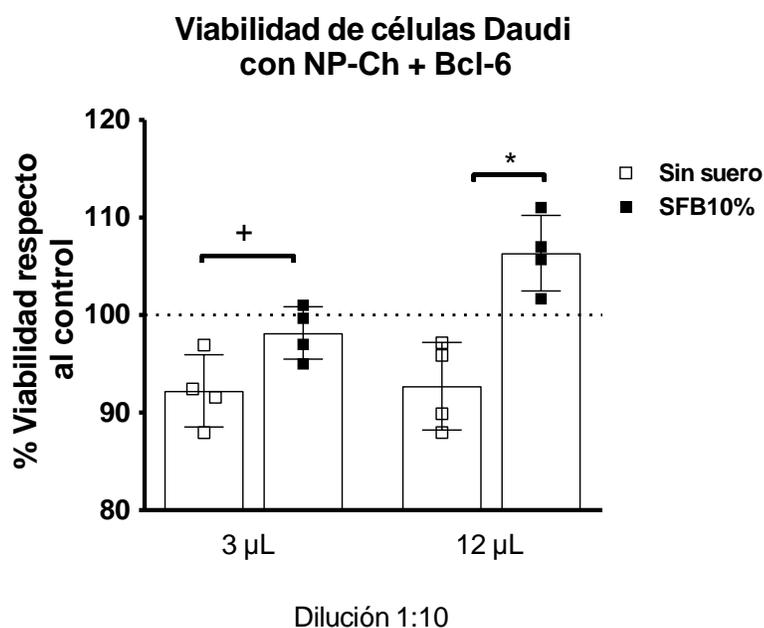


Figura 5. Proliferación de la línea celular Daudi, en presencia y ausencia de SFB 10% con dos diferentes concentraciones de nanopartículas conjugadas a BCL-6 y BSA, evaluada a las 24 h por un ensayo de MTS/PMS. Promedio \pm desviación estándar, U de Mann Whitney, $+p < 0.06$, $*p < 0.05$, $n = 4$. La línea punteada representa el control de solo medio sin adición de Np-Ch.

Como se observa, empleando 3 μL de nanopartículas diluidas 1:10, las células muestran una tendencia a proliferar más en presencia de suero al estimular con Np-Ch-Bcl-6, mientras que a una concentración de 12 μL se aprecia un aumento

significativo en la proliferación celular en la condición que tiene SFB 10% vs la que no, por lo que para los siguientes ensayos se decidió estimular en presencia de suero.

Una vez que ya se tenía los parámetros de tiempo de duplicación, concentración celular y medio suplementado con suero, se analizaron distintas concentraciones de nanopartículas sometidas a diluciones y sin diluir, conjugadas y no conjugadas a proteína (BSA). Primero se contaron las células, se centrifugaron y se dejaron a una concentración final de 1.25×10^4 cel/ml, las células se resuspendieron en medio suplementado con SFB al 10% y se dejaron crecer por 24 horas en presencia de nanopartículas con y sin proteína a distintas concentraciones.

Viabilidad células Daudi estimuladas con diferentes concentraciones de Np-Ch-Bcl-6

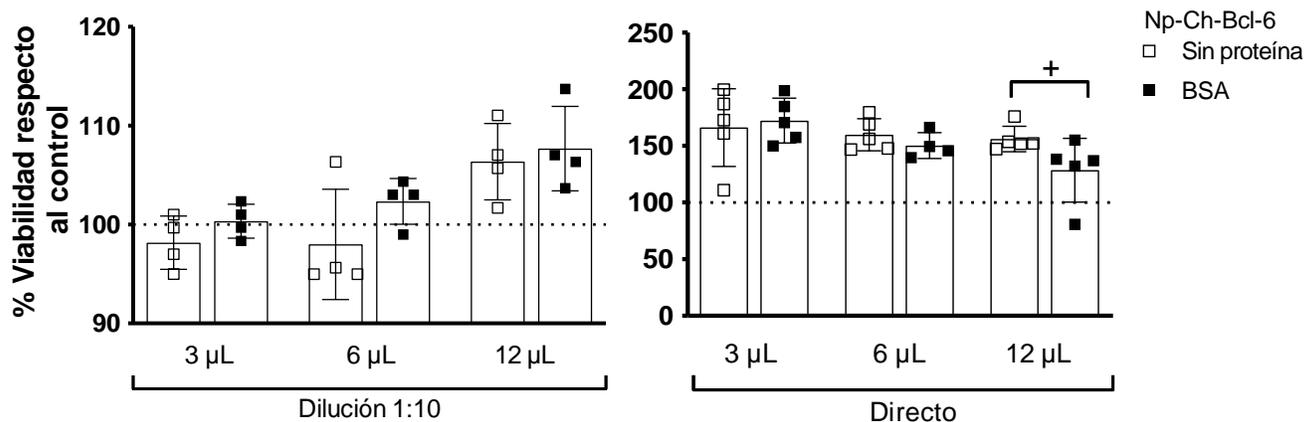


Figura 6. Proliferación de la línea celular Daudi bajo distintas concentraciones de nanopartículas diluidas y no diluidas observada a las 24 h de crecimiento en medio suplementado con SFB 10%. Se probó con nanopartículas conjugadas a proteína (BSA) y nanopartículas sin conjugar. La proliferación fue evaluada a las 24 h por un ensayo de MTS/PMS. Promedio +/- desviación estándar, U de Mann Whitney, +p<0.07, n=4-5. La línea punteada representa el control sin nanopartículas. Concentración de DNA en las Np-Ch 15 µg/mL, concentración de proteína en las Np-Ch 50 µg/mL.

En la figura 6, en el panel de la izquierda se observa como al diluir las nanopartículas no se muestra una diferencia significativa entre nanopartículas conjugadas y sin conjugar al BSA, ni un incremento importante respecto al control de solo medio (línea punteada). En el panel de la derecha, se observa un cambio bastante

significativo respecto al control de solo medio al agregar las nanopartículas, aunque no se encontró diferencia al comparar con y sin proteína cuando se adicionaron 3 y 6 μL de las Np-Ch-Bcl-6, sin embargo, cuando se añadieron 12 μL se observó una mayor proliferación cuando las Np-Ch no estaban conjugadas con BSA.

Dado que nuestra hipótesis es que las Np-Ch conjugadas con antígenos son incorporadas a las células B mediante endocitosis mediada por receptor, al estar unidas con BSA no se espera que haya reconocimiento. Por ello, las Np-Ch-BSA que ingresen a las células B se consideró que entraron inespecíficamente a través de la membrana, posiblemente por otro mecanismo de transporte. Esto mismo se espera que ocurra con las Np-Ch que no están unidas a proteína (antígeno), por ello las que logren ingresar a las células las consideraremos como incorporación basal. En la Figura 6 en el panel de la derecha se observa que la unión a BSA en la Np-Ch tiende a disminuir el ingreso inespecífico de las nanopartículas.

Posteriormente, comparamos la incorporación de las Np-Ch-Bcl6 conjugadas con el antígeno SpA y con BSA en las líneas celulares Ramos (clan II) y Daudi (clan III). Primero evaluamos su viabilidad por un ensayo de azul de tripán a las 48 y a las 72 h posteriores a la incubación con 6 μL de Np-Ch-Bcl6. Encontramos que a las 48 h tras la estimulación con Np-Ch conjugadas a SpA en la línea celular Ramos, hubo una tendencia a que haya menor número de células viables en comparación con la estimulación causada por las Np-Ch-BSA, mientras que en el caso de las células Daudi no se observaron diferencias. Al observar el panel de la derecha a las 72 h, encontramos que la línea celular Ramos tiende a tener una proliferación similar indistintamente se estimule con SpA o BSA, mientras que la línea celular Daudi tiende a proliferar más en presencia de SpA. De acuerdo a la hipótesis, dicha línea tiene especificidad por SpA, por lo que sí se esperara que hubiera un mayor número de células viables al estimular con estas Np-Ch.

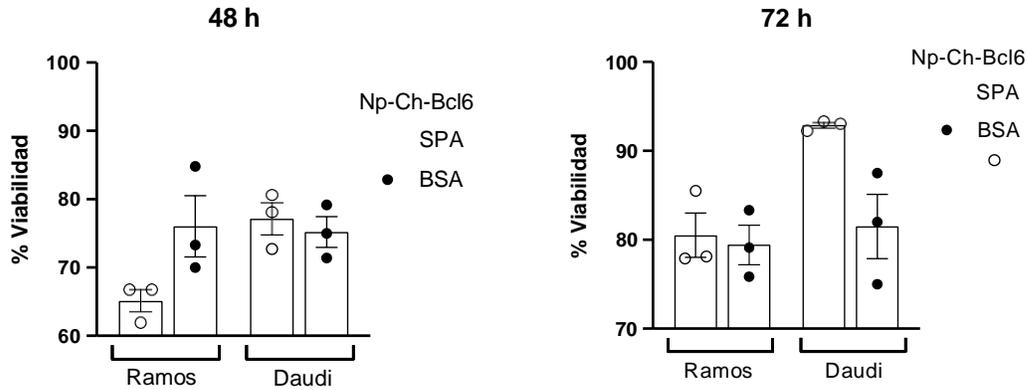


Figura 7. Ensayo de viabilidad celular de la línea celular Daudi y Ramos incubadas en medio suplementado con SFB 10% con la adición de 6 μL de nanopartículas conjugadas a BSA y SpA cada una, analizadas a las 48 y 72h Concentración de DNA en las Np-Ch 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, concentración de proteína en las Np-Ch 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Después comparamos su proliferación mediante un ensayo de MTS/PMS a las 24,48 y 72 h tras adicionarle 3 y 6 μl en la línea celular Daudi y Ramos. Como se puede observar, independientemente de la cantidad de Np-Ch-BCL-6 añadidas, ya sea conteniendo BSA o SpA, no se observó un cambio significativo en la proliferación, solamente se observa que ésta es mayor que la de las células en solo medio de cultivo (línea punteada). Estos resultados nos muestran que las células fueron incorporadas independientemente del antígeno al que fueron expuestas.

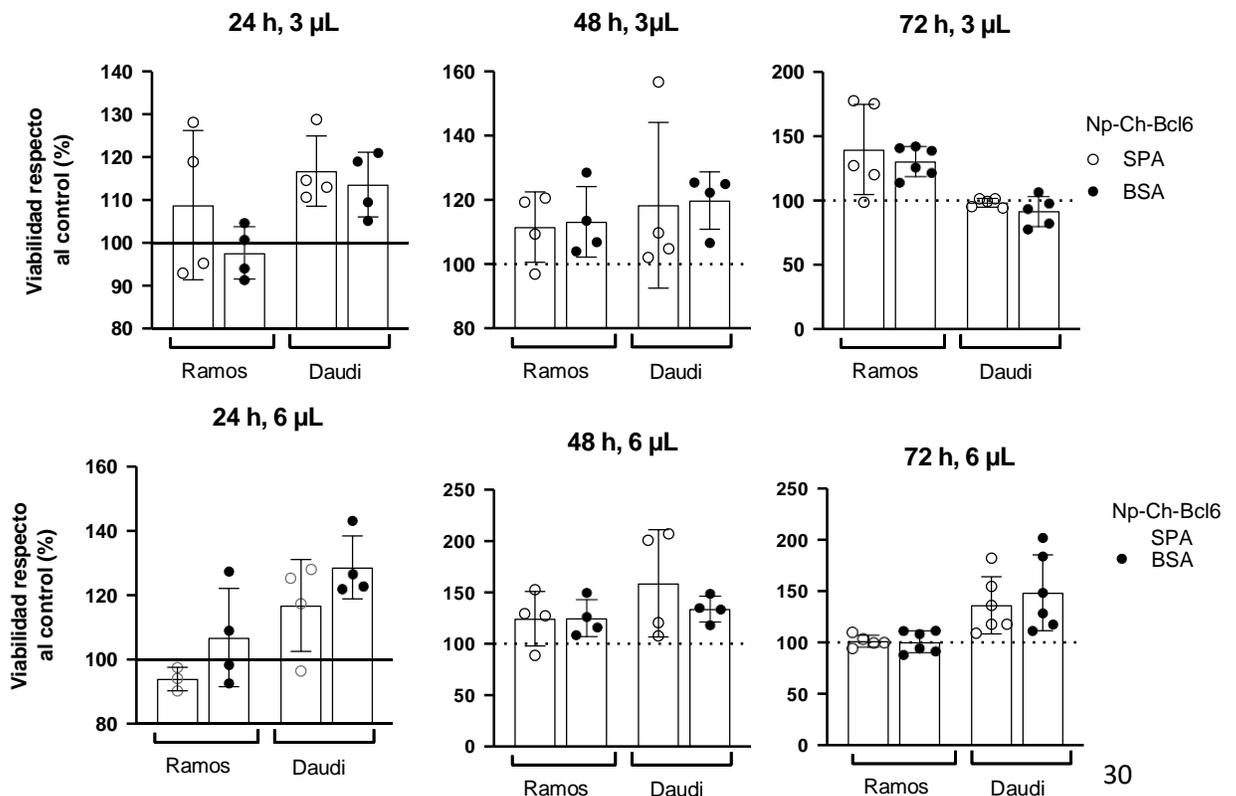


Figura 8. Ensayo MTS/PMS en las líneas celulares Daudi y Ramos incubadas en medio suplementado con SFB 10% tras la adición de 3 y 6 μ L de nanopartículas conjugadas a BSA y SpA cada una. Np analizadas a las 24, 48 y 72h. Concentración de DNA en las Np-Ch 15 μ g/mL, concentración de proteína en las Np-Ch 50

Detección de la incorporación de las Np-Ch conjugadas con antígeno en células B por microscopía de fluorescencia

Para comprobar que las nanopartículas de quitosán conjugadas a DNA y antígeno estaban siendo incorporadas por las células y promovían la proliferación por acción de BCL-6 que se encontraba codificado en el vector, se analizó la incorporación de las nanopartículas por células B mediante microscopía de fluorescencia al detectar EGFP que se encontraba en la construcción del vector (pIRES2-Bcl6-EGFP). Para realizar dicha evaluación se usó la línea celular Daudi en presencia de las Np-Ch-Bcl-6 acopladas a SpA y a BSA, así como en ausencia de Np-Ch. En concordancia con nuestros resultados anteriores, no hubo especificidad en la incorporación. En las células que fueron incubadas en presencia de las Np-Ch se puede observar fluorescencia por acción de la proteína EGFP tras su transcripción y traducción, al ser incorporadas por las células B (Figura 9). Esto nos indica de forma indirecta que BCL-6 también se está transcribiendo y ejerciendo su función en la proliferación.

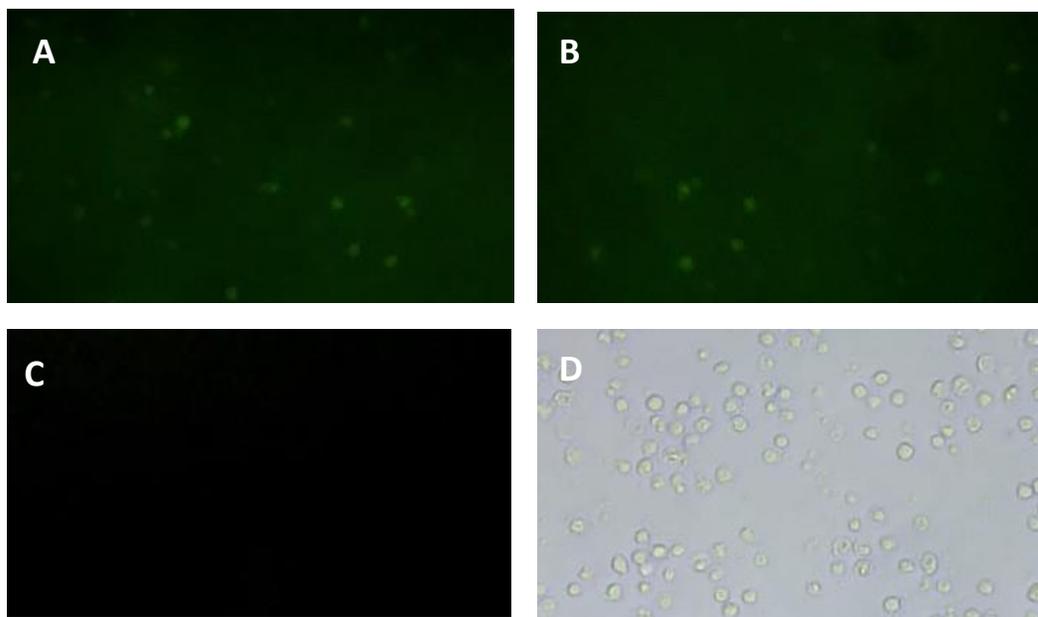


Figura 9. Análisis de la línea celular Daudi tras la incorporación Np-Ch que contienen el vector pIRES2-Bcl6-EGFP y acopladas a SpA (A), acopladas a BSA (B), sin nanopartículas (C) y con Np-Ch-Bcl6-SpA en campo claro (D) observadas a las 24 h por microscopía de fluorescencia.

Evaluación del efecto de la incorporación de las NP-Ch-Bcl-6 en la proliferación celular

Por último, se evaluó el efecto que tenía BCL-6 tras su incorporación por células B. Para estos experimentos usamos la línea celular Daudi la cual se cultivó en medio RPMI suplementado con SFB al 10% en presencia de Np-Ch-BCL-6-BSA, Np-Ch-BCL-6 (sin proteína), Np-Ch- \emptyset -BSA y Np-Ch- \emptyset (sin proteína), con la finalidad de poder comparar entre el vector \emptyset y el que contenía BCL-6.

BCL-6 es el regulador maestro de los centros germinales y tiene un papel fundamental en la proliferación celular, por lo que se espera que las células estimuladas con las NP-Ch conteniendo el vector codificante para Bcl-6 proliferen más que aquellas con el vector vacío. Se compararon diferentes concentraciones de Np-Ch empleando aquellas conjugadas con BSA o sin la proteína. Como podemos observar, las células proliferaron significativamente más en presencia de las Np-Ch conteniendo el vector Bcl-6 en comparación con el control sin estimular (línea punteada), independientemente de si estaban acopladas a BSA o no (Figura 10). No encontramos una diferencia importante al estimular con Np-Ch acopladas a BSA o sin proteína, tampoco encontramos dependencia de la concentración de las nanopartículas añadidas.

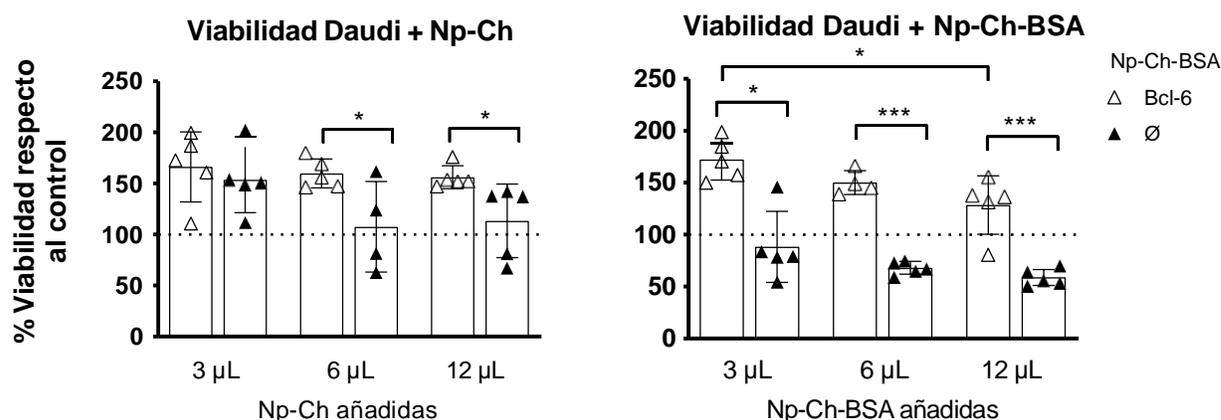


Figura 10. Proliferación de la línea celular Daudi en medio de cultivo RPMI suplementado con SFB 10% tras la incorporación de nanopartículas conjugadas con el vector codificante para Bcl-6 o con el vector vacío (\emptyset), analizadas a las 24 h mediante un ensayo de MTS/PMS. La línea punteada representa el control sin nanopartículas.

DISCUSIÓN

Una característica importante de la inmunidad adaptativa es la formación de la memoria inmunológica, con lo cual el sistema inmune es capaz de recordar los encuentros con microbios y reaccionar con más fuerza después de encuentros subsecuentes. La generación de mAbs de alta afinidad y la generación de memoria inmunológica requiere de la formación de CG. A su vez, la formación de CG es dependiente de antígeno, y es altamente específica. Una estimulación antigénica específica *in vitro* puede inducir la activación y proliferación de células, simulando la formación de estructuras como lo son los CG. Los CG son de suma importancia por lo que en un futuro se pueden implementar para el uso de nuevas inmunoterapias, así como también para comprender mejor los mecanismos que ahí suceden. El entendimiento sobre los CG nos puede abrir las puertas para la síntesis de vacunas capaces de estimular células del sistema inmune humoral y celular para la generación de memoria inmunológica antígeno específica. Dicha estimulación antígeno específica se puede obtener con el uso de nanopartículas que a su vez también pueden funcionar como vehículo de transfección para incorporar material genético en células de interés.

En el presente trabajo se llevó a cabo la estandarización e incorporación de nanopartículas a base de quitosán conjugadas con un vector codificante para Bcl-6 y proteína como antígeno en distintas líneas celulares con la finalidad de poder llevar a cabo una estimulación antigénica *in vitro*. En cuanto a la composición de las nanopartículas, optamos por el uso de quitosán, ya que este material es biodegradable, biocompatible y de baja toxicidad que se puede unir eficazmente a moléculas de DNA en soluciones salinas y de ácido acético, por lo cual es ampliamente utilizado en medicina así como en ingeniería genética. Entonces, si la incorporación de las Np-Ch es específica sobre las células de interés, este sistema funcionaría como un sistema de administración no viral que puede optimizarse para futuras terapias génicas eficientes.

En trabajos anteriores, se ha demostrado que las Np-Ch pueden ser eficaces para el transporte de moléculas de DNA hacia células blanco. En 2003 Corsi y colaboradores [22], diseñaron un sistema de administración a base de quitosán conjugado a DNA. Su objetivo era estudiar la eficacia del quitosán para desarrollar un sistema de administración de genes no virales que pueda optimizarse para una terapia génica eficaz, para esto probaron dos materiales con la finalidad de transfectar células, y evaluar cuál era el más eficaz en términos de viabilidad celular. Los tipos celulares que utilizaron en su estudio fueron: células madre mesenquimales humanas, células de osteosarcoma humano (MG63) y células renales embrionarias humanas (HEK293). En su trabajo ellos demostraron que su construcción nanopartícula-DNA funcionaba mucho mejor en contraste con el reactivo LipofectAMINETM 2000 (LF), muy comúnmente usado para la transfección de células. Por lo tanto, el quitosán resulta una opción más viable que la LF para la transfección, al tener un índice de toxicidad celular menor.

Por otra parte, la incorporación del vector codificante para Bcl-6 (pIRES2-Bcl6-EGFP) a las Np-Ch nos permitiría evaluar la proliferación inducida por este al compararlo con el control, dado que Bcl-6 es un factor transcripcional altamente regulado, clave en la reacción del CG, el aumento de éste, promueve la rápida proliferación de células para dar lugar a la generación del CG. Entonces al ser incorporadas las nanopartículas conjugadas al vector expresarán BCL-6 mediante la maquinaria celular, induciendo proliferación y diferenciación celular. Por lo tanto, si Bcl-6 es expresado por las células que incorporen las Np-Ch esperaríamos ver la formación de rosetas derivada de la acumulación de células por su duplicación.

Por otra parte, la conjugación de las Np-Ch con proteínas, nos permite dirigir la incorporación de éstas hacia blancos de interés. En este sistema se espera que las Np-Ch recubiertas con un antígeno puedan ser reconocidas por BCR específicos en la superficie de las células, incorporadas y procesadas por endocitosis mediada por BCR. Por ello, para evaluar si las células estaban incorporando las Np-Ch de forma específica mediada por su receptor, preparamos Np-Ch conjugadas con BSA para

utilizarlas como control negativo y con el superantígeno SpA. Dado que no se espera que el BCR de estos linfocitos reconozca a la proteína BSA, se esperaba que las Np-Ch no penetraran a la célula o que su incorporación fuera mínima comparada con la de las Np-Ch unidas al superantígeno. Se optó por el uso del superantígeno SpA dado que los superantígenos son mitógenos de origen bacteriano que se dirigen a grandes conjuntos clonales de células B a través de los sitios de región variable del receptor de antígeno (BCR) conservados a lo largo de la evolución [28]. Los superantígenos tienen capacidad de interactuar con inmunoglobulinas mediante su BCR para inducir la activación de gran parte del repertorio linfocitario, entre el 30 y 50% mientras un antígeno convencional solo puede interactuar aproximadamente con el 0.1% del repertorio linfocitario [28].

Al usar SpA como antígeno propusimos el empleo de las líneas celulares Ramos, Daudi y Raji para probar la especificidad de la incorporación de las Np-Ch, dado que sus BCRs poseen diferente afinidad por el antígeno. Se sabe que SpA se une a VH3 perteneciente al clan III [28]. De acuerdo a Schoroeder y colaboradores [23], existe una notable conservación evolutiva de las familias VH durante la evolución de los vertebrados, lo que sugiere que esta conservación es el resultado de selección a favor de determinantes específicos denominados frameworks (FW). De acuerdo a estas secuencias las inmunoglobulinas se han clasificado en clanes (clan I, clan II, clan III). Daudi y Raji son pertenecientes al clan III, mientras que las células Ramos pertenecen al clan II, por ello esperamos que las Np-Ch-SpA fueran incorporadas mayormente por las células Daudi/Raji, mientras que la entrada fuera mínima en las células Ramos. Entonces, nuestro primer control para evaluar la especificidad sería la comparación de la incorporación de las Np-Ch-SpA contra la de las Np-Ch-BSA, y el segundo correspondería a la comparación entre células de diferentes clanes.

Para estas evaluaciones primeramente tuvimos que encontrar las condiciones óptimas para la estimulación de las líneas celulares, esto lo hicimos estandarizando las concentraciones celulares; 0.62×10^4 , 1.25×10^4 y 2.5×10^4 . Encontramos que la concentración celular de 1.25×10^4 células/mL al tiempo de 24 h fue la más

óptima, en el que las líneas celulares a pesar de tener tiempos de duplicación muy distintos, exhibían una duplicación celular similar. Por otro lado, la estimulación con las Np-Ch fue más evidente cuando cultivamos las células en presencia de SFB al 10%. El SFB es una fuente de factores de adhesión, hormonas, lípidos y minerales, así como también regula la permeabilidad de la membrana y funciona como un carrier de lípidos, enzimas y micronutrientes. Por ello es que todos los experimentos posteriores se realizaron en medio suplementado con SFB al 10%.

Contrario a lo que esperábamos, las células incorporaron las Np-Ch independientemente de si estaban acopladas al antígeno o no, en ambos casos, la incorporación de las nanopartículas con Bcl-6 indujo proliferación celular. Una posibilidad es que por su tamaño y carga eléctrica las Np-Ch puedan ser incorporadas a la célula por otro mecanismo diferente a endocitosis mediada por receptor. Entre los diferentes mecanismos de endocitosis que tiene la célula para ingresar partículas se encuentra: fagocitosis, macropinocitosis y micropinocitosis, entre otras. De las vías más conocidas y estudiadas para la entrada de las nanopartículas al interior de las células, están los mecanismos activos de internalización: endocitosis, macropinocitosis, fagocitosis y pinocitosis. Se ha visto que, en algunos casos, las nanopartículas de dimensiones muy pequeñas (entre 1.4-8 nm), se acumulan inicialmente sobre la membrana celular para posteriormente entrar en la célula gradualmente, mientras que a mayor tamaño (45 nm), el mecanismo de internalización es a través de endocitosis mediada por la clatrina [32].

Según Rodríguez-Hernández 2018 ésta es la vía más común [32]. La macropinocitosis es la encargada de la captación de partículas pequeñas, así como también de fluidos y solutos [30], este mecanismo permite internalizar moléculas de hasta 500 nm de diámetro [30], mientras que la micropinocitosis permite internalizar moléculas más pequeñas de hasta <200 nm [31]. Entonces, al ser un proceso menos selectivo independiente de receptor, se podría creer que las nanopartículas están siendo incorporadas mediante esta vía, por eso resulta no haber diferencia

notable en cuanto especificidad de la incorporación de nanopartículas entre las conjugadas a BSA o SpA.

Por otra parte, el tipo celular utilizado también influye en la tasa de incorporación de las Np-Ch. De acuerdo a Corsi y colaboradores [22], empleando distintos tipos celulares (células madre mesenquimales humanas; MSCs, células de osteosarcoma humano; MG63 y células renales embrionarias humanas; HEK293) y nanopartículas hechas de quitosán conjugadas a DNA, observaron que el tipo celular que tuvo una mayor incorporación de los complejos fueron las células HEK, seguidas por las células MSC y por último las MG63, por lo cual ellos argumentan que depende del tipo celular. Algo similar pudiera estar ocurriendo en el presente trabajo, puesto que, a pesar de pertenecer al mismo tipo celular, cada una de las 3 líneas celulares son muy distintas, desde su tiempo de duplicación (figura 4), donde se puede apreciar que la línea celular Raji tiene tiempos de división mucho más rápidos que las otras dos líneas, por lo que no se pudo evaluar de manera eficaz la proliferación inducida por nanopartículas. Con base en estas observaciones, para futuros experimentos se podría trabajar con linfocitos B vírgenes obtenidos de pacientes donadores y no con líneas celulares, de esta forma podemos asegurar que presenten tiempos de duplicación similares.

Otro punto a evaluar son las nanopartículas, Okahata y colaboradores en 2001 [25], encontraron que el nivel de transfección con complejos de plásmido/quitosano era más alto cuando la masa molecular del quitosano era de 40 u 84 kD, mientras que nosotros empleamos quitosán de bajo peso molecular con un peso de 120 kD, lo cual podría generar resultados diferentes. Además, Illum L. et al [26], han elaborado nanopartículas que van desde 20-500 nm y Corsi et al [22] han sintetizado complejos desde 100 a 750 nm, mientras que nuestras Np-Ch tienen un tamaño promedio de 100-150 nm. Esto es importante ya que las nanopartículas deben tener un tamaño adecuado, el cual es fundamental para una captación celular favorable.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La memoria inmunológica es de suma importancia en el sistema inmune de vertebrados, ya que gracias a esta se logra poder estar protegidos contra eventos repetidos de infección por microorganismos, algunos potencialmente peligrosos que pueden atentar contra nuestra salud y/o vida, por lo tanto, la memoria inmunológica es una de las características más importantes del sistema inmune para nuestra supervivencia. Dicho lo anterior, el poder encontrar nuevas alternativas en la estimulación antigénica específica, no viral *in vitro* sería de gran importancia para el tratamiento de enfermedades inmunodeficientes.

En el presente trabajo se logró la estandarización de distintos parámetros para la estimulación antigénica *in vitro* de distintas líneas celulares usando nanopartículas sintéticas a base de quitosán. Se determinó que las mejores condiciones para la estimulación fueron: 1) La concentración celular de 1.25×10^4 cel/ml; 2) el medio de crecimiento RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10%; 3) el tiempo de incubación del cultivo celular con las Np-Ch a las 24 h; y por último, 4) la cantidad de las nanopartículas a emplear entre 3-12 μ L (15 μ g/mL de DNA, 50 μ g/mL de proteína) por cada 100 μ L de medio de cultivo.

Nuestra hipótesis era que las Np-Ch recubiertas con antígeno serían incorporadas específicamente por las células B con el BCR específico que reconociera el antígeno. Sin embargo, encontramos que tanto las Np-Ch con antígeno como las Np-Ch control negativo eran incorporadas a la célula, posiblemente por un mecanismo inespecífico como la pinocitosis. Para disminuir la incorporación inespecífica de las Np-Ch proponemos evaluar más a fondo el pegado de la proteína al quitosán, puesto que esto podría estar influyendo en la incorporación inespecífica, al no encontrarse la proteína unida en la superficie de la nanopartículas, puede influir en que los preparados estén entrando por otras vías independientes de receptor al no llevar a cabo una estimulación específica eficaz. Esto nos puede permitir en un futuro, con investigaciones posteriores, poder crear nuevas

alternativas para inmunoterapias y modelos para el estudio de la memoria inmunológica.

Uno de nuestros objetivos fue evaluar la función de BCL-6 en aquellas células que incorporaron las nanopartículas comparándolas con un control negativo, que correspondía a Np-Ch con el vector pIRES-EGFP carente de Blc-6. BCL-6 es el regulador maestro de la reacción del centro germinal el cual está altamente regulado y ejerce función en la proliferación celular. En este proyecto logramos demostrar que BCL-6 induce a la proliferación por arriba del control en aquellas células que lo han incorporado mediante el uso de las nanopartículas. Por lo que mi perspectiva a futuro sería utilizar el empleo de nanopartículas a base de quitosán como vehículo para transfección de células, para que puedan expresar material genético exógeno de interés, ya que por las propiedades del quitosano se ha demostrado ser un material favorable y de baja toxicidad para su uso, en términos de viabilidad celular. Esta estrategia se podría emplear, por ejemplo, para transfectar células como comúnmente se hace con las vacunas, pero usando quitosán como nanocarreador, ya que sabemos que tiene una baja toxicidad y se une eficientemente al material genético para entregarlo de forma eficiente y lograr la expresión de proteínas heterólogas con la finalidad de generar inmunidad. Otra perspectiva a futuro sería la generación de un modelo de CG, para esto, primeramente, se debe llevar a cabo una estimulación antigénica eficaz, por lo que la adecuación de los protocolos empleados en el presente trabajo podría favorecer para la activación y proliferación de células que eventualmente darán lugar a la formación de CG *in vitro*.

BIBLIOGRAFIA:

1. Abbas A. K Lichtman A.H. and Pober J. S. 8° Ed “Cellular and Molecular Immunology”, Sanunders-elsevier. (2004).
2. Gangqing Hu and Keji Zhao, Looping around Bcl6 in Germinal Center to Sharpen B Cell Immunity, Immunity Previews, 2016, .doi.org/10.1016/j.immuni.2016.08.020.
3. Murphy, K., Travers, P., & Walport, M. (2009). *Inmunología de JANEWAY* (7.^a ed.).
4. Chattopadhyay, S., Chen, J., Chen, H. and Hu, C., 2021. *Nanoparticle Vaccines Adopting Virus-Like Features For Enhanced Immune Potentiation*.
5. Barrington R, Zhang M, Fischer M, Carroll MC. The role of complement in inflammation and adaptive immunity. Immunological reviews. 2001
6. Erik B. Puffer JKP, Jessica J. Hollenbeck, John A. Kink and Laura L. Kiessling. Activating B Cell Signaling with Defined Multivalent Ligands. ACS Chem Bio. 2006
7. Quitosano: un polisacárido natural biodegradable y biocompatible con aplicaciones en biotecnología y biomedicina. C.peniche, W. Arguelles, A. gallardo, C. Elvira, J.San Román. Revistas de plásticos modernos, vol. 81 enero 2001.
8. V. Dodane, V.D. Vilivalam, Pharmaceutical applications of chitosan, Pharm. Sci. Technol. Today 1 (6) (1998).
9. Quinto Manzanares, R. (2020). Generación de un vector codificante de la proteína Bcl-6 y su encapsulación en nanopartículas de quitosán conjugado a antígeno para su liberación dirigida en células B humanas (Licenciatura). UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS .
10. F.C. MacLaughlin, R.J. Mumper, J.J. Wang et al., Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery, J. Controlled Release 56 (1-3) (1998)
11. H.-Q. Mao, K. Roy, S.M. Walsh et al., DNA-chitosan nanospheres for gene delivery, Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., Kyoto, Japan 23 (1996)

12. S.C.W. Richardson, H.J.V. Kolbe, R. Duncan, Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA, *Int. J. Pharm.* 178 (2) (1999)
13. Purwada Alberto, Shah Shivem B., Béguelin Wendy, August Avery, M. Melnick, “Ex vivo synthetic immune tissues with T cell signals for differentiating antigen-specific, high affinity germinal center B cells”. *Biomaterial*, 2018
14. Roh, K., Song, H. W., & Pradhan, P. (2018, 21 febrero). A synthetic stroma-free germinal center niche for efficient generation of humoral immunity ex vivo. *PubMed*.
15. Mark J. Kwakkenbos, Pauline M. van Helden, Tim Beaumont, and Hergen Spits. Stable long-term cultures of self-renewing B cells and their applications. *Immunological Reviews*, 2016, 270
16. Basso K., Dalla F.R., 2012, Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells, *immunological Reviews*, 247, 172–183 Niu H, Ye BH, Dalla-Favera R. Antigen receptor signaling induces MAP kinase-mediated phosphorylation and degradation of the BCL6 transcription factor.
17. Ci Silverman, G. J., & Goodyear, C. S. (2006, junio). Confounding B-cell defences: lessons from a staphylococcal superantigen. *PubMed*, 6. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16724100/>
18. Roben, P., Salem, A. & Silverman, G. J. VH3 antibodies bind domain D of staphylococcal protein A. *J. Immunol.* (1995)
19. Sasso, E. H., Silverman, G. J. & Mannik, M. Human IgM molecules that bind staphylococcal protein A contain VHIII H chains. *J. Immunol.* (1989).
20. Dominguez-Medina, C. C. (2020, 19 junio). SpeS: A Novel Superantigen and Its Potential as a Vaccine Adjuvant against Strangles. *MDPI*.
21. Zhao L, Seth A, Wibowo N, Zhao CX, Mitter N, Yu C, et al. Nanoparticle vaccines. *Vaccine*. 2014.
22. Corsi, K., Chellat, F., Yahia, L., & Fernandes, J. C. (2003). *Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles. Biomaterials.*

23. Schroeder, H. W., Hillson, J. L., & Perlmutter, R. M. (1990). Structure and evolution of mammalian VH families. *International Immunology*.
24. Stillwell, W. (2016). *An Introduction to Biological Membranes: Composition, Structure and Function* (2nd ed.). Elsevier Science.
25. Ishii, T., Okahata, Y., & Sato, T. (2001). Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*,
26. Illum L, Jabbal-Gill I, Hinchcliffe M, Fisher AN, Davis SS. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* 2001.
27. Wolfert MA, Seymour LW. Atomic force microscopic analysis of the influence of the molecular weight of poly(L)lysine on the size of polyelectrolyte complexes formed with DNA. *Gene Ther* 1996.
28. Silverman, G. J., & Goodyear, C. S. (2006). Confounding B-cell defences: lessons from a staphylococcal superantigen. *Nature Reviews Immunology*. doi:10.1038/nri1853
29. Freeman SA, Grinstein S. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *ImmunolRev*. 2014
30. Lim JP, Gleeson PA. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *ImmunolCellBiol*. 2011
31. Kirchhausen T, Owen D, Harrison SC. Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014
32. Rodriguez-Hernandez, A. G.; Aguilar Guzman, J. C. Y Vazquez-Duhalt, R. Membrana celular y la inespecificidad de las nanopartículas. ¿Hasta dónde puede llegar un nanomaterial dentro de la célula?. *Mundo nano* [online]. 2018, vol.11, n.20, pp.43-52. Epub 14-Ago-2020. ISSN 2448-5691.