



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Centro de  
Investigación en  
Dinámica Celular

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**  
**Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y**  
**Aplicadas**

**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 ANTÍGENO-ESPECÍFICAS.**

**TESIS**

**QUE PRESENTA:**

**ROCÍO QUINTO MANZANARES**

**Para obtener el Grado de:**  
**LICENCIADO EN CIENCIAS**  
**Área terminal Bioquímica y Biología Molecular**

**Director de la Tesis:**  
**Dra. Hilda Minerva González Sánchez**  
**(Instituto Nacional de Salud Pública, INSP)**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**AGOSTO 2020**

## ÍNDICE

	Página
Resumen-----	2
Introducción-----	5
Antecedentes-----	12
Hipótesis-----	15
Objetivo general -----	16
Objetivos específicos-----	16
Metodología -----	16
1. Generación de un vector codificante para la proteína Bcl-6-----	16
1.1 Amplificación de Bcl-6 -----	16
1.1.1 Extracción de RNA-----	16
1.1.2 Síntesis de cDNA a partir de RNA total con oligo dT -----	17
1.1.3 PCR para Bcl-6-----	17
1.1.4 One Step PCR para Bcl-6 -----	18
1.2 Digestión del gen y del vector con enzimas de restricción y ligación-----	18
1.3 Clonación por el método de electroporación -----	18
1.4 Purificación del plásmido por el método de lisis alcalina-----	18
1.5 Preparación de muestras para secuenciación y análisis de secuencias -----	19
2. Evaluación de la expresión de Bcl-6 -----	19
3. Encapsulamiento en nanopartículas de quitosán recubiertas de antígeno ---	20
3.1 Preparación de nanopartículas de quitosán con DNA -----	20
3.2 Preparación de nanopartículas de quitosán recubiertas de antígeno -----	20
3.2.1 Análisis de eficiencia: ensayo de BCA y SDS-PAGE-----	21
3.3 Preparación de nanopartículas de quitosán cubiertas de antígeno que encapsulen DNA -----	23
Resultados -----	24
Discusión -----	43
Conclusiones y perspectivas -----	48

## RESUMEN

La respuesta inmune adaptativa proporciona la capacidad de reconocer y recordar patógenos específicos, generando respuestas más potentes ante subsecuentes enfrentamientos. Las células B son parte integral de esta respuesta, ya que al estar expuestas a un antígeno específico que pueden identificar mediante su receptor de células B (BCR), éstos proliferan y se diferencian hacia células B plasmáticas productoras de anticuerpos o células B de memoria que son de larga vida y pueden protegernos por períodos de tiempo prolongados. Estos procesos ocurren dentro de regiones sub-anatómicas conocidas como centros germinales (CG), en los que las clonas de células B recombinan sus genes de inmunoglobulina y tras repetidas rondas de diversificación y selección clonal, evolucionan para generar anticuerpos de mayor afinidad, lo cual es indispensable para una respuesta inmune efectiva. Uno de los eventos iniciales que conducen a la diferenciación de las células B es el incremento en la expresión del represor transcripcional Bcl-6, que promueve su rápida proliferación y la formación de agregados que maduran hacia la generación de CG. Asimismo Bcl-6 provee un ambiente tolerante para la hipermutación de los genes de inmunoglobulina. Por ello, la expresión de Bcl-6 en las células B es crítica para la formación *in vitro* de CG, que pueden servir de modelos para el estudio de la memoria inmunológica. El objetivo de este trabajo es generar un método de encapsulación y liberación de DNA exógeno codificante para la proteína Bcl-6 para ser utilizado como una forma de transfección y marcaje para células B con un BCR específico. La hipótesis planteada supone que al incorporar un vector codificante para Bcl-6 en nanopartículas de quitosán conjugadas con antígeno, éstas funcionarán como nanoacarreadores que transferirán el vector a las células antígeno-específicas por endocitosis mediada por el BCR. Para ello, se realizó el diseño del vector codificante para Bcl-6, empleando como vector de clonación pIRES2-EGFP, el cual se encuentra bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV), contiene una secuencia IRES (sitio interno de entrada al ribosoma) que permite la síntesis de varias proteínas de interés a partir de un único mRNA multicistónico y contiene la secuencia que codifica para la proteína EGFP, lo que permite corroborar de manera indirecta la expresión del gen de interés. La amplificación de Bcl-6 se realizó a partir de una muestra de amígdala humana mediante la purificación del mensajero y realizando síntesis de cDNA y PCR en un solo paso. Se realizaron cortes con las enzimas de restricción BAMH1 y SAL1 tanto en el producto de PCR como en el vector, y se ligaron. El constructo fue incorporado en bacterias electrocompetentes *E. coli* DH5 $\alpha$  por electroporación. Se realizó secuenciación para verificar la orientación correcta del gen Bcl-6 y se transfectó en células HEK para corroborar de forma indirecta la expresión de Bcl-6. Por otro lado, se prepararon nanopartículas de quitosán mediante el método de coacervación y se

incorporó en ellas el constructo utilizando el método de adsorción. Se generaron nanopartículas con vector vacío y con el vector codificante para Bcl-6. La incorporación del DNA se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Posteriormente se procedió a recubrir las nanopartículas con antígeno. Para ello, se estandarizó el protocolo para la unión de proteínas al quitosán empleando albúmina de suero bovino (BSA). Se probaron dos métodos, el método de adsorción y el método de unión covalente. Se evaluó la eficiencia de la unión mediante electroforesis de proteínas en geles de acrilamida y realizando ensayos de ácido bicinonínico (BCA) en los lavados realizados durante la ejecución del protocolo. Finalmente, se analizó la eficiencia de la unión de la proteína en las nanopartículas que encapsularon el DNA. Concluimos que el método de unión covalente es más eficiente que el de adsorción, al permitir el pegado de una mayor concentración de proteína, además de que este método nos asegura una mayor estabilidad de la unión con el antígeno. Estas nanopartículas recubiertas de antígeno y que contienen el vector codificante de Bcl-6 podrán ser evaluadas posteriormente para verificar su aplicación como un método de selección y marcaje de células B específicas.

**PALABRAS CLAVE:** nanopartículas, endocitosis mediada por BCR, linfocitos B, centros germinales.

## INTRODUCCIÓN

### *Componentes del Sistema Inmune*

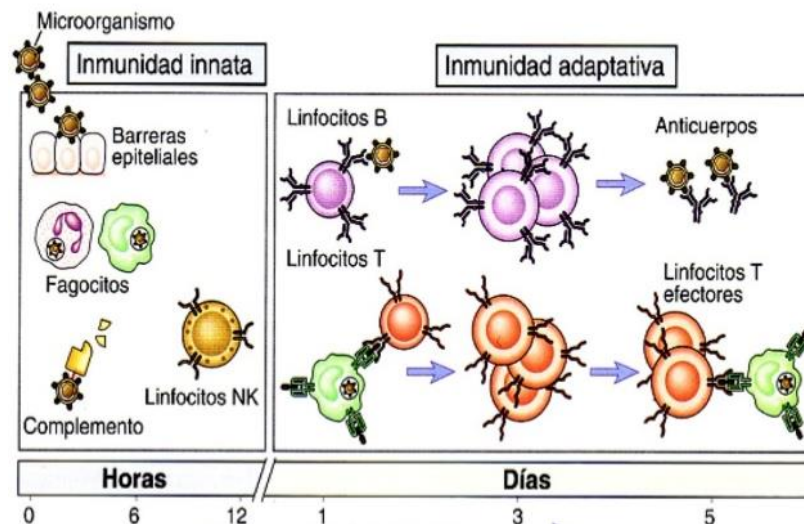
La defensa contra los patógenos es mediada por reacciones tempranas de la respuesta inmune innata y las respuestas tardías de la inmunidad adaptativa [1]. Los mecanismos de la inmunidad innata constituyen la primer línea de defensa del organismo y son específicos de las estructuras que son comunes a grupos de microorganismos relacionados y no pueden distinguir diferencias finas entre ellos. Sus principales componentes son: 1) barreras físicas y químicas, como el epitelio y las sustancias químicas antimicrobianas producidas en las superficies epiteliales; 2) células fagocíticas, células dendríticas y linfocitos citóxicos naturales NK , etc. y 3) proteínas sanguíneas, incluidos miembros del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación [2]. Por otro lado, la respuesta inmune adaptativa reconoce a un gran número de sustancias microbianas y no microbianas y reacciona frente a ellas. Una característica importante de la inmunidad adaptativa es la capacidad de distinguir diferentes sustancias (especificidad), así como de responder de forma vigorosa a exposiciones repetidas al mismo microbio (memoria).

Las principales células del sistema inmune adaptativo son los linfocitos T y los linfocitos B, éstos reconocen antígenos extraños de manera específica y responden contra ellos. Los linfocitos T son las células de la inmunidad celular, reconocen antígenos de los microorganismos intracelulares y sirven para destruir estos microbios o las células infectadas. Los linfocitos T reconocen péptidos derivados de proteínas extrañas que están unidas a proteínas propias llamadas moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), que se expresa en las superficies de otras células. Los linfocitos T constan de poblaciones con funciones diferentes, entre las cuales encontramos a los linfocitos T cooperadores los cuales secretan citocinas responsables de muchas respuestas celulares, estimulan la proliferación y diferenciación de los propios linfocitos T y activan otras células incluyendo linfocitos B, macrófagos, etc. , Mientras que los linfocitos T citotóxicos (CTL) matan a las células que expresan antígenos extraños, como las células infectadas por virus y otros microbios intracelulares. Algunos linfocitos T se denominan linfocitos T reguladores, los cuales actúan sobre todo inhibiendo respuestas inmunitarias [2].

Por otro lado, los linfocitos B reconocen antígenos solubles extracelulares y de la superficie celular y se diferencian en células plasmáticas secretoras de anticuerpos y células B de memoria [3]. En el caso de las enfermedades infecciosas, la unión de los anticuerpos contra sus moléculas diana pueden desencadenar distintos

procesos que lleven a la eliminación del patógeno tales como opsonización, neutralización de toxinas, activación del sistema complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Por estas funciones, los anticuerpos monoclonales (mAbs) se utilizan en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas, autoinmunes y neoplásicas, además de que sus aplicaciones se extienden a la detección y cuantificación de diversas moléculas, por lo que son ampliamente utilizados en el trabajo científico.

El ambiente necesario para la generación de mAbs de alta afinidad requiere la formación de centros germinales (CG), los cuales son estructuras sub-anatómicas que se forman en los órganos linfoides secundarios durante las respuestas inmunitarias dependientes de células T. En los CG 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 linfocitos B de memoria [4].



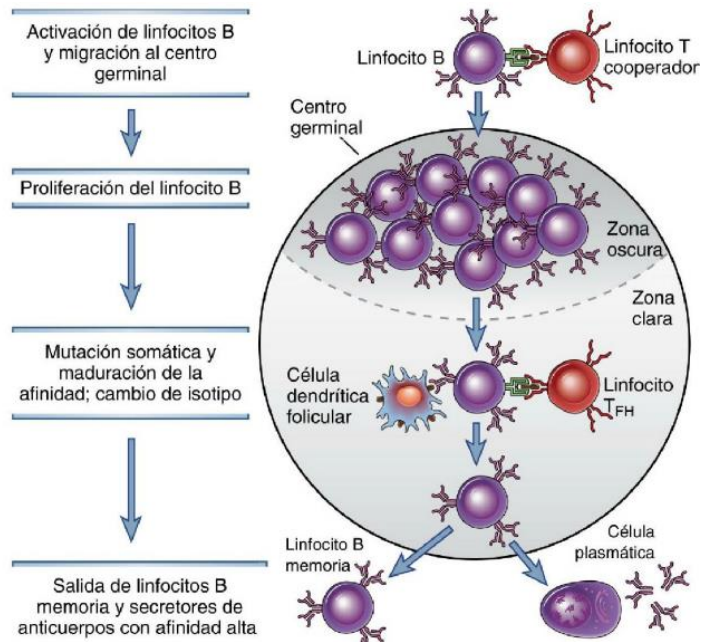
Esquema 1. Componentes del Sistema Inmune.

### **Formación de Centros Germinales**

Los CG se producen entre 4 y 7 días después del inicio de una respuesta del linfocito B dependiente de T. Dentro de cada CG se distinguen dos regiones, una zona oscura llena de un cúmulo denso de linfocitos B que proliferan y se les conoce como centroblastos; y una zona clara donde los linfocitos B (aquí llamados centrocitos) interactúan con el antígeno presentado por las células dendríticas foliculares (FDC) [2]. 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 (THF), el cual libera citocinas como IL-21 e IL-4, y reconoce al antígeno por medio de su receptor específico de células T (TCR) [1].

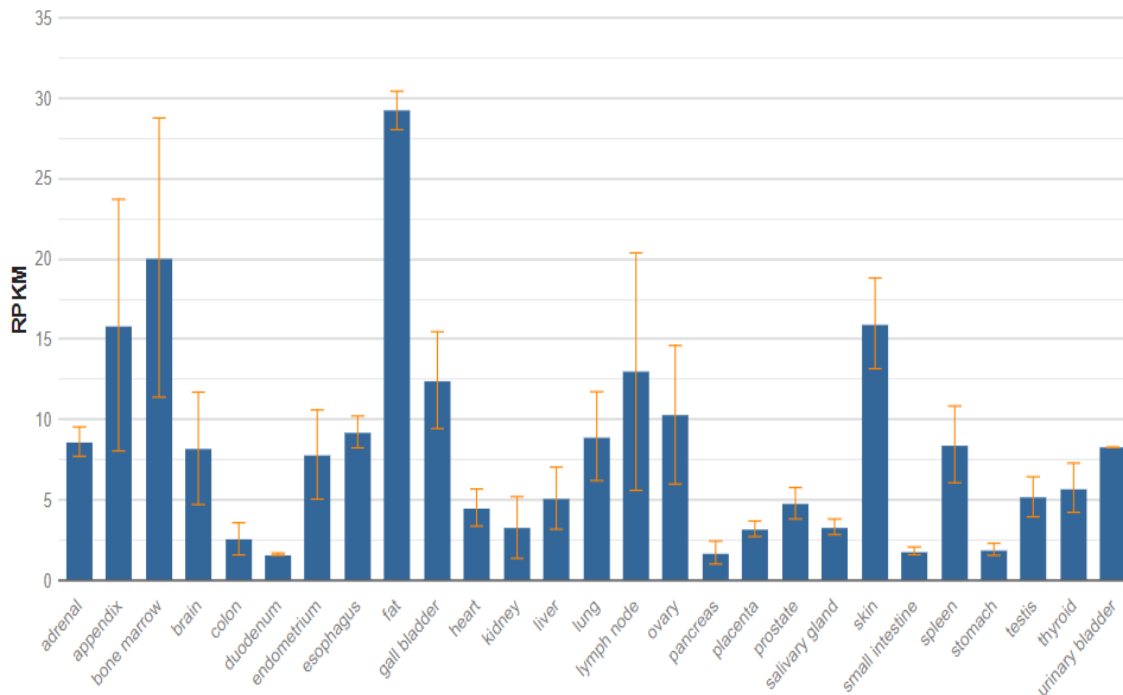
El microambiente del CG está compuesto por una variedad de células y matriz extracelular que proporcionan señales para la proliferación, diferenciación y migración de las células B. La presentación de antígenos a las células B es un factor determinante en la eficiencia de la reacción de CG, ya que los antígenos polivalentes inducen una respuesta más potente que los antígenos monovalentes, asimismo antígenos unidos a membrana son más eficientes para inducir la activación de células B que los antígenos solubles [5]. La interacción con el antígeno permite la señalización a través del BCR y su captación en un proceso llamado endocitosis mediada por BCR, en el cual el antígeno es endocitado, llevado a lisosoma para su degradación a péptidos, y después presentado por medio del complejo principal de histocompatibilidad II (MHC II), para su reconocimiento por las células THF por medio del TCR.



Esquema 2. Estructura de un centro germinal.

## ***Bcl-6, regulador maestro de los CG***

Un fundamental importante para que se lleve a cabo la reacción del CG es la expresión de un represor transcripcional denominado proteína 6 del linfoma de células B (Bcl-6). El gen *bcl-6* tiene un tamaño de 24 Kb y codifica para la fosfoproteína Bcl-6 de 95 KDa. La proteína Bcl-6 se caracteriza por un dominio BTB / POZ N-terminal y seis motivos de unión al DNA del dedo de zinc terminal [6]. La porción media de la proteína Bcl-6 incluye tres dominios PEST que están involucrados en la modulación de la estabilidad y actividad proteica [7]. El dominio BTB es esencial para su dimerización y para la represión de la transcripción. Bcl-6 actúa como represor transcripcional mediante el reclutamiento de complejos de histonas desacetilasas de clase I y II (HDAC) directamente o a través de co-represores a través del dominio BTB [4]. Bcl-6 se expresa en diversos órganos y tejidos, mayormente se ha encontrado en grasa, médula ósea, piel, apéndice y bazo [8]. Además se ha reportado su expresión en algunas poblaciones de linfocitos y monocitos en sangre periférica [4]. En particular, Bcl-6 se expresa en células B de CG pero no en otro tipo de células B [9]. Se considera un regulador maestro de la reacción del CG, ya que es esencial para el desarrollo y función de las células B del CG y células THF.



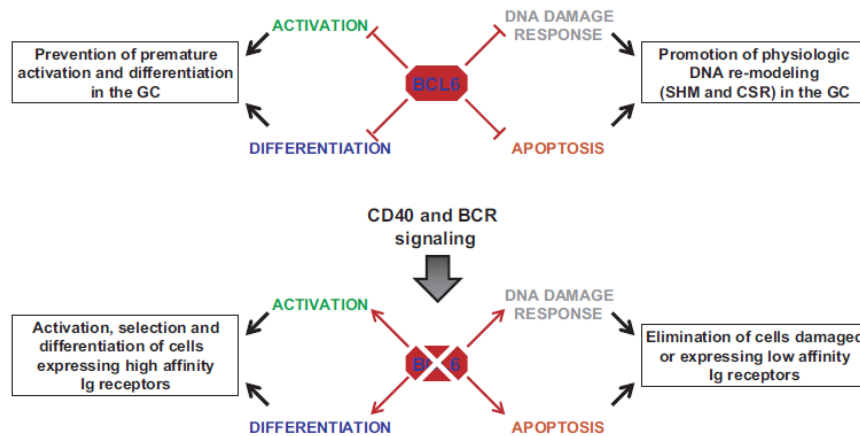
Esquema 3: Expresión en diferentes órganos y tejidos de la proteína Bcl-6.



El primer paso hacia la formación del CG es la activación de células B naive por el antígeno dependiente de células T en los folículos de los tejidos linfoides periféricos [7]. Posteriormente, las células B con el antígeno migran hacia el borde entre los folículos donde experimentan proliferación e interactúan con células TFH afines. Esto ocurre de 1-3 días después de la inmunización [8]. Las células B pueden luego diferenciarse en células plasmáticas extrafoliculares y dejar que el folículo genere anticuerpos de baja afinidad o alternativamente pueden ingresar a la vía del CG. Estas células B precursoras tempranas (células B pre-CG) comienzan a regular la expresión de la proteína Bcl-6 y se mueven hacia el centro de los folículos linfoides [10]. Las células B pre-CG finalmente se agregan en grupos tempranos de CG en el día 4 posterior a la inmunización. Una vez que se establecen los CG tempranos, las células B experimentan una rápida proliferación, lo que resulta en la expansión masiva del CG. Alrededor del día 7 el CG se forma completamente y se polariza [10].

Unas de las funciones biológicas mejor caracterizadas de Bcl-6 en centroblastos es facilitar la rápida proliferación y tolerancia del daño genómico que se produce durante la expansión clonal y la hipermutación somática. Bcl-6 reprime directamente sensores de daño en el DNA e inhibe la expresión del gen supresor de tumores p53. Bcl-6 además regula la expresión de la enzima desaminasa inducida por la activación (AID) [6], la cual media dos procesos importantes en las células B del CG: cambio de clase de inmunoglobulina y la hipermutación somática. De esta forma, Bcl-6 permite que las células B del CG toleren las roturas fisiológicas del DNA requeridas para la recombinación por cambio de clase de inmunoglobulina y la hipermutación somática sin inducir una respuesta apoptótica dependiente de p53 [12]. Bcl-6 también media la progresión del ciclo celular en las células B de CG al regular la expresión del gen de detención del ciclo celular CDKN1A (inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1A). Además Bcl-6 bloquea la activación prematura, que puede ser inducida por las células T u otras señales solubles, al inhibir la expresión del gen PR /SET dominio 1 (PRDM1), que es crucial para el desarrollo de células plasmáticas. PRDM1 codifica para el factor de transcripción la proteína 1 de maduración inducida por linfocitos B (BLIMP1) que es esencial para la diferenciación hacia células plasmáticas. Interesantemente, Bcl-6 y BLIMP1 se regulan entre sí, ya que la proteína Bcl-6 puede unirse al locus PDRM1 y reprimir la expresión de BLIMP1, y viceversa. Por lo tanto, la proporción de Bcl-6 y BLIMP1 es uno de los

factores determinantes para que una célula B activada se convierta en una célula plasmática o una célula de memoria [6].

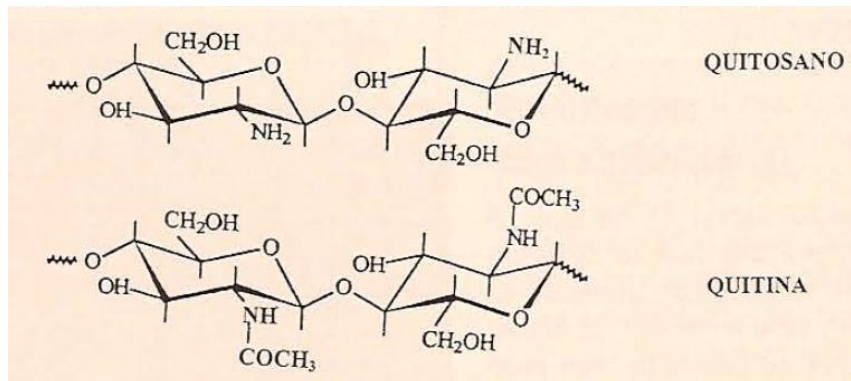


Esquema 3. Regulación de los CG por Bcl-6.

### ***Nanopartículas de quitosán y su empleo como nanotransportadores***

Las nanopartículas poliméricas sintéticas son típicamente sólidas entre 10 nm y 200 nm. Han sido una plataforma atractiva para la administración de vacunas, células, pDNA e hibridomas, ya que los antígenos y adyuvantes se pueden unir a la superficie o cargar en el interior de estas nanopartículas [14]. Las nanopartículas poliméricas se forman mediante autoensamblaje de copolímeros anfifílicos bajo un proceso de emulsión o nanoprecipitación.

El quitosano es un aminopolisacárido obtenido a escala industrial por N-desacetilación termoalcalina de la quitina aislada de los desechos de crustáceos. El quitosano es conocido como un polímero biocompatible, biodegradable y de baja toxicidad, y por lo tanto potencialmente aplicable en medicina [15]. El quitosano es degradado por enzimas, como la quitosanasa, la lisozima presente en superficies mucosas y en suero humano, enzimas gástricas como la papaína, pepsina y lipasa A [15]. El quitosano ha sido utilizado para la liberación de fármacos e ingeniería de tejidos y comercialmente en parches cicatrizantes.



Esquema 4. Estructura química del quitosano y la quitina.

Las microesferas son aquellas partículas compuestas por una matriz de quitosano, que a diferencia de las microcápsulas están cubiertas por una membrana polimérica; mientras que las nanopartículas poliméricas son sistemas de entrega con capacidad para superar las barreras fisiológicas, proteger y dirigir las sustancias cargadas a células específicas. Desde el punto de vista fisicoquímico, el quitosano es un biopolímero hidrosoluble que puede formar películas, hidrogeles, andamios porosos, fibras, micro y nanopartículas en condiciones y medios ácidos suaves. Las nanopartículas a base de quitosano, se forman como resultado de procesos de auto-asociación o entrecruzamiento en virtud de los cuales las cadenas poliméricas se ordenan en estructuras nanoscópicas ya sea por interacciones inter o intramoleculares de tipo covalente o no covalente.

## ANTECEDENTES

### **Modelos de CG *in vitro***

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*. Los principales hallazgos y los protocolos empleados para los modelos de CG *in vitro* se resumen en la Tabla 1. En estos modelos, células B humanas o murinas son estimuladas con citocinas como IL-4, IL-21 y CD40L, añadidas al medio de cultivo. Asimismo, se ha encontrado que la transfección de células B con un vector codificante para Bcl-xL y Bcl-6 estimula la proliferación y sobrevivencia de las células B [11]. En nuestro grupo de investigación también se ha desarrollado un modelo para el aislamiento de mAbs dirigidos contra bacterias a partir de un cultivo de células B humanas estimuladas *in vitro*. 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. Por ello, para la generación de un modelo *in vitro* de CG planteamos el desarrollo de un método de selección y estimulación específico de antígeno. Para esto se utilizarán nanopartículas de quitosán (Np-Ch) recubiertas de antígeno, que inducirán una estimulación altamente eficiente en gran parte debido a su polivalencia, pero también porque el antígeno se presentará unido a una superficie lo cual aumenta la eficacia de la presentación. Además, las nanopartículas servirán como nanotransportadores ya que encapsularán a un vector codificante para la proteína Bcl-6, así aprovecharemos el proceso de endocitosis mediada por BCR para el suministro de señales coestimuladoras en células B específicas. El desarrollo de este sistema de estimulación específica de antígeno podrá ser aplicado posteriormente para la activación de las células B y la generación de un centro germinal *in vitro*.

Referencia	Fuente de células B y aislamiento.	Estímulo	Protocolo	Resultados
Kyung-Ho 2018. Biomaterials	Sangre periférica, bazo. Ratón	-CD40L -IL-4 -BAFF -IL-21	-Células B Naive 10 <sup>5</sup> /pozo.	-CD40L funciona mejor que anti-CD40.

	Selección negativa, Miltenyi	-Antígeno	-CD40L (100 ng/mL)	-Perlas unidas a CD40L y antígeno unido a perlas son mejores que estando soluble.
Purwada <b>2015.</b> Biomaterials	Bazo. Ratón Selección negativa, Stem Cell Technologies.	-RGD (ECM) -IL-4 -CD40L -BAFF	-20,000 células Naive -Hidrogeles (2% gelatina + 1.5% SiNP). -Incubación de 6 días	-3D funciona mejor que 2D. -RGD promueve la supervivencia celular a largo plazo.
Nojima <b>2011.</b> Nat Comm	Bazo Ratón Sistema iMag (BD).	-CD40L -BAFF -IL-4 -IL-21	-Células B Naive $5 \times 10^5$ . -Células 40LB $3 \times 10^6$ . -IL-4 1 ng/mL. -IL-21 10 ng/mL	-IL-21 acelera la proliferación de células B de CG y la diferenciación parcial a plasmablastos.
Cao <b>2010</b> J. Imm Meth	Sangre periférica, médula ósea, amígdalas. Humano. Aislamiento células B con el Kit II Miltenyi.	-CD40L -IL-21 -CpG -Células no B.	-Células B $3 \times 10^5$ . -Células no B $5.7 \times 10^6$ . -CD40L 500 ng/mL. -IL-21 50 ng/mL. -CpG 6 $\mu$ g/mL. -Incubación de 3 a 6 días.	-Ellos encontraron diferentes fuentes de células B (TT+ encontrados en amígdalas)
Kwakkebos <b>2010.</b> Nat Med	Sangre periférica, amígdala. Humano. Selección positiva, células de memoria	-CD40L -IL-4 -IL-20 -IL-21	-Transfección de Bcl-6 y Bcl-XL a células de memoria. - $2 \times 10^5$ células/mL. - $10^5$ CD40L-L Cel/ml. -IL-2 100 U/mL. -IL-4 50 ng/mL. -IL-21 25 ng/mL	-No observaron cambio de isotipo, y una baja frecuencia de hipermutación somática. -La transfección disminuyó la producción de IgG. -Las células transfectadas sobreviven varios meses.

Traggiai <b>2004.</b> Nat Med	Sangre periférica. Humano. Células B de memoria: CD22 Miltenyi.	-CpG -EBV	-Aislamiento de células B de un paciente recuperado de SARS. -CpG 2.5 µg/mL. -Incubación por 2 semanas.	-Las células B de memoria se inmortalizaron con EBV. -El uso de SP de un paciente con SRAS permitió la recuperación de Abs neutralizantes.
Arpin <b>1995</b> Science	Amígdalas Humano	-IL-2 -IL10	-Células B 25000. -Células CD40L-L 5000. -Para generar células de memoria +CD40L 4 d. para células plasmáticas – CD40L 4d	-CD40L dirige la diferenciación de las células de memoria.

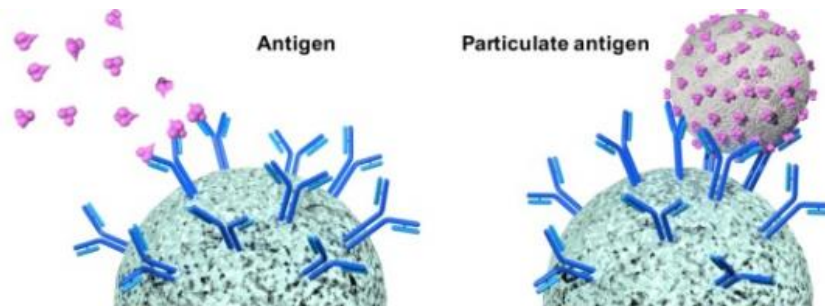
Tabla 1. Modelos de CG in vitro.

### ***Multimerización antigénica en nanopartículas***

Una nanopartícula puede funcionalizarse en la superficie con diversas moléculas. Se ha encontrado que la presentación de antígenos en nanopartículas mejora las respuestas de anticuerpos al inducir un eficiente entrecruzamiento de BCRs [14] (Esquema 5). Por ello, los antígenos asociados con los nanotransportadores son captados de manera más eficiente por las células dendríticas en comparación con los antígenos solubles, lo que permite un suministro más efectivo a los ganglios linfáticos y una presentación cruzada [18]. Las interacciones multivalentes promueven la agrupación y señalización del BCR y facilitan la internalización del antígeno mediada por el receptor (esquema 5).

Las características del antígeno, como la afinidad del epítipo, la valencia o el reclutamiento de correceptores pueden afectar la señalización de las células B y T, entonces la agrupación de BCR por antígenos multivalentes es crucial para la

señalización dependiente de antígeno [14]. La asociación de antígenos proteicos con nanopartículas se pueden dividir en encapsulación de partículas y asociación de superficie. Algunas de las diferentes maneras de asociación de antígeno son conjugación química, interacción electrostática, adsorción física y recubrimiento de biomembrana. Estudios han demostrado que los antígenos pueden sufrir cambios conformacionales tras la adsorción de nanopartículas [16].



Esquema 5. Representación de la interacción multivalente por las vacunas de nanopartículas, las cuales promueven la agrupación de receptores de células B y facilitan la internalización mediada por receptores, en comparación con el antígeno soluble.

## JUSTIFICACIÓN

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) son ampliamente utilizados en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas, autoinmunes y neoplásicas. Sus aplicaciones también se extienden a la investigación científica siendo empleados para la detección y cuantificación de varias moléculas. La generación de una plataforma que nos permita reproducir la reacción del centro germinal humano donde se forman y seleccionan los mAbs ofrece un potencial invaluable, ya que además de ser útil para aumentar la comprensión de la biología de las células B y la memoria inmunológica, contribuiría al desarrollo de mAbs con potencial terapéutico. Un problema común en estos modelos es la activación policlonal generada por la estimulación *in vitro* de las células B, por lo cual se requiere del desarrollo de métodos que permitan la estimulación y selección de células B específicas.

## HIPÓTESIS

Nanopartículas de quitosán recubiertas con antígeno y cargadas con un plásmido que exprese Bcl-6 serán incorporadas en células B específicas por endocitosis mediada por el receptor de células B.

## **OBJETIVO GENERAL**

Generar un vector codificante para Bcl-6 y su encapsulamiento en nanopartículas de quitosán recubiertas de antígeno para su liberación dirigida en células B.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Generar un vector codificante para la proteína Bcl-6.
2. Crear nanopartículas de quitosán que incorporen el vector codificante de Bcl-6.
3. Estandarizar el método de unión de antígeno en las nanopartículas de quitosán.
4. Obtener nanopartículas de quitosán recubiertas de antígeno que incorporen el vector codificante de Bcl-6.

## **METODOLOGÍA**

### **1. Generación de un vector codificante para la proteína Bcl-6.**

Se utilizó el vector pIRES2-EGFP, el cual contiene la secuencia IRES con lo cual la traducción del gen BCL-6 y de la proteína EGFP ocurre simultáneamente y permite corroborar de manera indirecta la expresión de la proteína Bcl-6 al detectar la expresión de EGFP. Entre los posibles sitios de corte para enzimas de restricción contenidos en este vector, se eligieron BAMH1 y SAL1, ya que estas enzimas no tienen sitios de corte en el gen BCL-6.

### **1.1 Amplificación de Bcl-6.**

**1.1.1 Extracción de RNA.** Se realizó el aislamiento de RNA a partir de sangre periférica de un donador voluntario sano, se homogeneizó la muestra (50- 100 mg sangre periférica) con 1 ml de trizol en un tubo de 1,5 ml. Posteriormente se incubó la mezcla durante 5 min a temperatura ambiente (o almacenar a -80°), se agregaron 200 µl de cloroformo, se agitó durante 15 segundos e incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12 000 g durante 15 min a 4 ° C. Se formaron 3 fases: la fase superior se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml, y se añadió 500 µl de isopropanol seguido de una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de una centrifugación a 12 000 g durante 10 min a 4 ° C. Se desechó el sobrenadante, lavó el pellet con 1 mL de etanol al 70% (vortex), se centrifugó a 7500 g durante 5 min a 4 grados, se lavó el pellet y se centrifugó nuevamente. Se dejó



secar el pellet al aire 5-10 min, se disolvió el RNA en 100 uL de agua DEPC pasando a través de la punta de la pipeta, se incubó durante 10 min de 55 a 60 °C, y se midió la concentración en un espectrofotómetro Implén.

**1.1.2 Síntesis de cDNA a partir de RNA total con oligo dT:** primero se realizó la digestión del RNA total (RNAt) con DNAsa 1, se preparó la mezcla en un tubo de PCR, el cual contenía 1 µg de RNA total, 1 U de DNAsa1, 1X de buffer DNAsa, H<sub>2</sub>O DEPC cbp 20 µl, se incubó la muestra por 15 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 2 µl de EDTA 25 mM y se incubó la muestra por 10 minutos a 65°C. Para la síntesis de cDNA: se preparó la mezcla 1 en un tubo de PCR que contenía 11 µl de RNAt/DNAsa1 y 1 µl de Oligo dT (12 pM/ µl), la mezcla 1 se incubó por 10 min a 65 °C. Para preparar la mezcla 2: se emplearon 4 µl Buffer 5X RT, 1 µl de DTT 0.1 M, 1 µl RNAsa Out (40 U/ µl) y 1 µl de dNTP's (10 mM c/u). Al término de los 10 min a 65 °C, se incubó la mezcla 1 por 2 min en hielo, se agregó la mezcla 2 (integrando con la pipeta) seguido de 2 min a 42 °C. Se agregó a la muestra 1 µl de RT Superscript II (200 U/ µl) y se mezcló con la pipeta, incubando la muestra por 60 min a 42°C, seguido de una incubación la por 10 min a 72 °C. El cDNA se conservó a -20 °C.

### **1.1.3 PCR para Bcl-6.**

*Diseño de primers.* Se utilizó el programa oligo analyzer de Integrated DNA Technologies. La temperatura de alineamiento de los primers depende de la concentración de G y C y de la longitud de las secuencias, y fueron las mismas o muy similares para ambos primers. El contenido de GC se encontró alrededor del 50%-60%, la longitud de los primers entre 25-35 pb, se evitó la formación de estructuras secundarias y dímeros. En las secuencias de los primers se incluyeron sitios de corte para las enzimas de restricción SAL1 (GTCGAC), y BAMH1 (GGATCC).

*Estandarización de la PCR para Bcl-6.* La temperatura de alineamiento fue la resultante del diseño de primers, mientras que la temperatura y tiempo de elongación dependen del rendimiento de la taq polimerasa utilizada y de la longitud del producto. El número de ciclos de amplificación necesarios para obtener una banda visible depende en gran medida de la concentración inicial del DNA a amplificar (como 30 o 35 ciclos). Durante la estandarización de la PCR se realizaron gradientes de temperatura, de magnesio y de concentración de cDNA, asimismo se probaron diferentes concentraciones de primers y número de ciclos, para encontrar las mejores condiciones en las cuales amplificara el gen. Partimos de una reacción preparada de la siguiente forma: cDNA 1 µl, 1 µl de oligo fw (5 pmol/ µl), 1 µl de

oligo Rv (5 pmol/  $\mu$ l), 4  $\mu$ l dNTPS 1 mM, 1  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>, 2  $\mu$ l buffer, 0.1  $\mu$ l de platinum taq polimerasa, y H<sub>2</sub>O DEPC cbp 20  $\mu$ l, y se realizó el control negativo.

**1.1.4 One Step PCR para Bcl-6.** Para las muestras de RNA de amígdala humana se realizó un mix con 12.5  $\mu$ l de Buffer 2X, 2  $\mu$ l de primer FW 5 pmol/ $\mu$ l, 2  $\mu$ l de primer Rv 5 pmol/ $\mu$ l, 1  $\mu$ l de RT platinum, 5  $\mu$ l de RNA (purificado) de amígdala y 2.5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O.

**1.2 Digestión del gen y del vector con las enzimas de restricción y ligación.** Se realizó la digestión con cada enzima por separado para verificar los cortes, primero con 1  $\mu$ l BAMH1 (10 u/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l de buffer (10X), 5  $\mu$ l de DNA (1  $\mu$ g), y H<sub>2</sub>O DEPC cbp 20  $\mu$ l, se dejaron incubando a 16°C durante 12 h. Después se preparó un gel de agarosa al 1% para verificar el corte, se realizó un lavado para eliminar el buffer, ya que es distinto para cada enzima. El lavado se realizó con 500  $\mu$ l de butanol, seguido de una centrifugación a 14000 rpm/20 min, se resuspendió el pellet en 500  $\mu$ l de etanol al 70%, se centrifugó a 14000 rpm/10 min, se dejó secar y se resuspendió en 5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O DEPC. Posteriormente, se realizó la digestión con 1  $\mu$ l de SAL1 (10 u/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l de buffer (10X), 5  $\mu$ l de DNA (1  $\mu$ g), H<sub>2</sub>O DEPC cbp 20  $\mu$ l, y se dejó en incubación a 16 °C durante 12 horas, se volvió a lavar para realizar la ligación. Para la ligación se utilizaron 100 ng de inserto, 1  $\mu$ l del vector pIRES2-EGFP, 2  $\mu$ l de buffer ligasa 10X, 1  $\mu$ l de taq DNA ligasa y H<sub>2</sub>O cbp 20  $\mu$ l, posteriormente se incubaron a 16°C por 12 horas.

**1.3. Clonación por el método de electroporación:** Se descongeló una alícuota de células electrocompetentes E. coli DH5 $\alpha$ , se agregó el producto de ligación (vector más el inserto Bcl-6), y se mezcló ligeramente, esto se dejó en hielo por 5 min. La mezcla se colocó en una cubeta para electroporar, y se mantuvo en hielo por 2 min. La cubeta se colocó en el electroporador y se realizó una descarga de 2.5 KV, se recuperaron las bacterias con 1 mL de medio LB y se incubaron por 1 hora a 37°C en agitación, se cosecharon de 20-50  $\mu$ l del cultivo en placas de LB con el antibiótico de selección del plásmido (kanamicina), seguido de una incubación a 37°C por 16 h y se observó el desarrollo de colonias de las cuales se seleccionaron las más aptas y se sembraron en medio líquido LB sin antibiótico a 37°C por 12 h en agitación, posteriormente se realizó la purificación del DNA plasmídico.

**1.4 Purificación del plásmido por el método de lisis alcalina:** El cultivo se transfirió a un tubo eppendorf de 1.7 mL, se centrifugó y se descartó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 150  $\mu$ l de la solución 1, se mezcló con ayuda del vortex, se le agregó 150  $\mu$ l de la solución II y se mezcló por inversión. A la muestra se le agregaron 150  $\mu$ l de la solución III, 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  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O 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  $\mu$ l 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.

### **1.5 Preparación de muestras para secuenciación y análisis de la secuencia.**

Se mandó a secuenciar por el método de Sanger, se preparó un mix de 16 $\mu$ l totales, con 500 ng de DNA, 1  $\mu$ l de oligo Rv 5 pmol/ $\mu$ l y 16  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O DEPC. Los resultados se analizaron con el programa bioinformático "Chromas", y se realizaron alineamientos de secuencias múltiples con ayuda del software "Muscle", para así saber si correspondía la secuencia con la de Bcl-6, y que no hubiera un cambio de nucleótido, codón o corrimiento del marco de lectura.

## **2. Evaluación de la expresión de Bcl-6.**

Debido a que el constructo pIRES2-EGFP-Bcl6 contiene la secuencia de EGFP downstream de Bcl-6 y la secuencia IRES2, al traducirse si se expresa la proteína EGFP podemos deducir que Bcl-6 también es expresado. Esto es una forma indirecta de verificar la expresión de Bcl-6. Para ello se hicieron transfecciones en las células HEK 293T, usando 1 $\mu$ g de DNA y el método 2X HBS transfection.

Se crecieron células HEK 293T en medio DMEM preparado con glutamax, 10% de suero fetal bovino (SFB), y los antibióticos penicilina y estreptomina, incubando a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80%- 90% fueron transferidas a placas de 6 pozos para realizar la transfección. Cuando las células llegaron a una confluencia de cerca del 90%, se cambió el medio por DMEM 2% de SFB y se mantuvieron en incubación por 2 horas previo a la transfección.

Se emplearon 4 condiciones: pIRES2-EGFP-Bcl-6, pIRES2-EGFP (vector vacío), GFP (control positivo) y sin DNA (control negativo). En condiciones de esterilidad se prepararon las siguientes mezclas: 1) para pIRES2-EGFP-Bcl-6 y pIRES2-EGFP, 1

µg de DNA, 2 M de CaCl<sub>2</sub>, HBS 2X, cbp H<sub>2</sub>O 40 µl; 2) para el control positivo: 1 µg de GFP, CaCl<sub>2</sub> 2M, HBS 2X y cbp H<sub>2</sub>O 40 µl; y 3) para el control negativo: CaCl<sub>2</sub> 2M, HBS 2X y cbp H<sub>2</sub>O 40 µl. Se mezclaron con ayuda del vortex. Cada condición se preparó por triplicado y se aplicó sobre las células HEK 293T manteniéndolas en incubación por 24 horas. Posteriormente, se verificó la expresión de EGFP en un microscopio de fluorescencia.

### **3. Encapsulamiento en nanopartículas de quitosán recubiertas de antígeno.**

#### **3.1 Preparación de nanopartículas de quitosán con DNA.**

Se prepararon nanopartículas de quitosán; usando quitosán de bajo peso molecular al 5% disuelto en ácido acético al 2%, utilizando 8 µl de quitosán con 12.5 µg de DNA hasta completar el volumen de 50 µl con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, siendo la mínima cantidad de DNA que se pega al quitosán según lo estandarizado por el Dr. Víctor Hugo Bermúdez y acorde a nuestras observaciones experimentales. Se mezcló con ayuda del vortex y se dejó incubando por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó un gel de agarosa al 1% para observar que el DNA se haya unido al quitosán, si este no se pegara se observaría la banda del DNA.

#### **3.2 Preparación de nanopartículas de quitosán recubiertas de antígeno.**

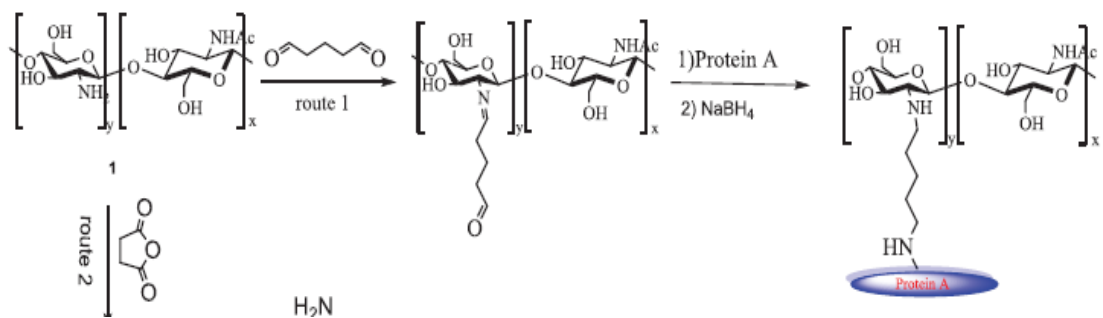
Se prepararon Np-Ch cubiertas de antígeno, el antígeno a utilizar es la proteína A de *Staphylococcus aureus* (spA). Sin embargo para la estandarización se utilizó albumina de suero bovino (BSA). Probamos dos distintos métodos para el pegado de la proteína:

*Método de adsorción.* Se disolvió el quitosán al 2% en ácido acético al 5%, con ayuda del vortex, se realizó un lavado con PBS a 14,000 rpm, 4°C, 30 min. Después se agregó la proteína y se dejó incubando a temperatura ambiente, se volvió a lavar con PBS, se guardó el sobrenadante y se dejó en 1 ml de PBS nuevo, en este método la proteína se pega electrostáticamente al quitosán por lo tanto esta unión es débil y reversible.

*Método por unión covalente:* se disolvió el quitosán al 2% en ácido acético al 5% en un agitador magnético, se centrifugó a 2,000 rpm, a temperatura ambiente por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y ese ocupamos, se agregó por cada 1 mL de quitosán 1 mL de NaOH, se mezclaron por inversión, y se volvió a centrifugar a 2,000 rpm a temperatura ambiente. Se formó un pellet que corresponde a las nanopartículas de quitosán y se volvió a lavar con 2 ml de agua destilada a 2,000 rpm a temperatura ambiente por 5 minutos, se dejó en 1 ml de agua en un agitador

magnético a temperatura ambiente durante 12 h después se agregó glutaraldehído al 25%, por cada gramo de quitosán 1 ml de glutaraldehído. Utilizamos glutaraldehído como crooslinker el cual se unió al quitosán y éste a la proteína, realizando una unión irreversible. Se dejó en agitación durante 5 h a 33°C, se realizaron dos lavados con 2 ml de agua destilada a 2000 rpm por 5 min, se retiró el sobrenadante y se dejó en 1 ml de agua en un agitador magnético hasta que se observe una mezcla homogénea, posteriormente se mezcló con la proteína usando distintas concentraciones, dejándolas en incubación por 2 horas a temperatura ambiente. Se volvieron a lavar, y se paró la reacción con NaBH<sub>4</sub> 1 mg/mL dejándola en reposo por 10 min a temperatura ambiente, se volvió a lavar y se dejó en un volumen final de 100 µl. Se midió la absorbancia tanto de la muestra como del sobrenadante después de agregar la proteína, para saber si la proteína se unió al quitosán, además se realizó un ensayo de ácido bicinconínico (BCA) para determinar la cantidad exacta de proteína que no se unió.

#### Covalent Immobilization of Protein A on Chitosan and Aldehyde Double-Branched Chitosan



Esquema 6. Inmovilización covalente de la proteína A de *Staphylococcus aureus* en quitosán por medio de glutaraldehído.

### 3.2.1 Análisis de eficiencia: ensayo BCA y SDS-Page.

Ensayo de BCA:

Este ensayo de proteínas combina la reducción de Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>1+</sup> por proteína en un medio alcalino con la detección colorimétrica altamente sensible y selectiva del catión cuproso Cu<sup>1+</sup> por ácido bicinconínico 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

purpura 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.

-Se prepararon los estándares (1mL) de la proteína BSA, con concentraciones de (1500, 750, 500, 250, 125, 50, 25 y 5) µg/mL, a partir de un stock de BSA de 2mg/mL.

-Se preparó el reactivo de trabajo, WR: se preparó el mix de acuerdo al Kit "Pierce™ BCA Protein Assay" con una relación de 50:1, 50 partes del reactivo A por cada parte del reactivo B, Se prepararon 200 µl por cada pozo para trabajar en una placa de 96.

-Para la preparación de las muestras a analizar se mezcló 25 µl de la muestra problema/estándares, más 200 µl de WR. Se mezcló durante 30 segundos, y se dejó incubando a 37° C por 30 minutos, se cubrió la placa con parafilm, después se dejó atemperar la placa a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 562 nm en un lector de placas.

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

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

## SDS-PAGE

Se prepararon SDS-PAGE, con un espesor de 1 mm, de 8 x 10 cm, con un porcentaje de acrilamida del 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%.

**Para el gel separador** se mezcló: 2 mL de la mezcla de acrilamida / bis-acrilamida (30%:0.8%), 2.25 mL de tris-HCL 1 M pH 8.8, 60 µl de SDS 10%, 60 µl de persulfato de amonio 10%, 6 µl de TEMED, y agua BD.

**Para el gel concentrador** se mezcló: 0.66 mL de la mezcla de acrilamida/ bis acrilamida (30%:0.8%), 416.66 µl de tris-HCL 1M PH 6.8, 33.33 µl SDS 10%, 16.66 µl de persulfato de amonio al 10%, 3.33 µl de TEMED y agua BD.

Se limpiaron los cristales con jabón y se enjuagaron con abundante agua, después se limpiaron con metanol para deslipidizarlos. Se colocaron entre ambos cristales el

separador del grosor indicado, se preparó el gel separador y se añade 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 retira el isopropanol y se adiciona 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. Después de ese 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  $\mu$ l en cada pozo. Se corrieron a 115 V, por 120 minutos, por último se desmontó el gel, y se y se separaron las placas 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.

### **3.3 Preparación de nanopartículas de quitosán cubiertas de antígeno que encapsulen DNA.**

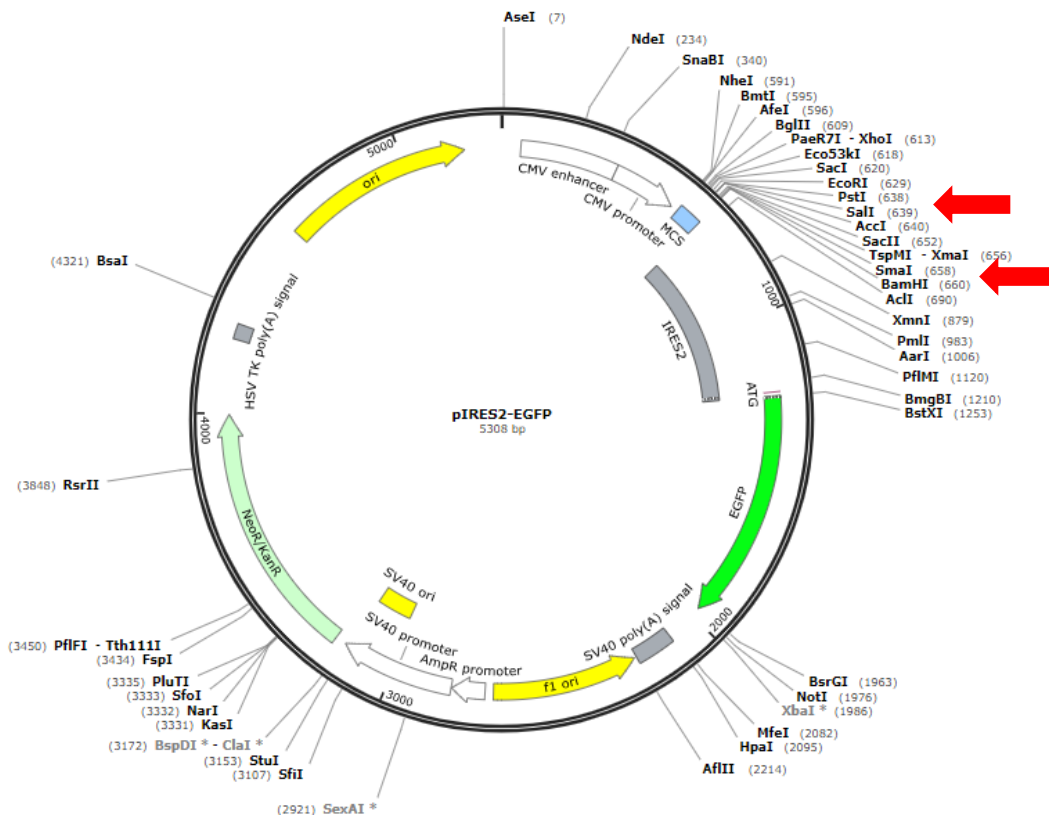
Primero se prepararon Np-Ch con DNA, utilizando quitosán de bajo peso molecular al 2% disuelto en ácido acético al 5%, se mezclaron en un agitador magnético por 15 min, se tomó 1 ml de este quitosán y se centrifugaron de 2000 a 5000 rpm, por 5 min a temperatura ambiente, se pasó a un nuevo tubo el sobrenadante y éste se lavó con 2 ml de agua destilada de 2000 a 5000 rpm por 5 min a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante, y ahora ocupamos el pellet que se dejó a un volumen de 500  $\mu$ l de agua destilada, y de este solo se tomaron 8  $\mu$ l, y se mezcló con 12.5  $\mu$ g de DNA completando el volumen a 50  $\mu$ l con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se dejó incubando por 30 minutos a temperatura ambiente. Para corroborar que se una el DNA al quitosán, las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1%. Se volvió a lavar para eliminar impurezas y se dejó en 50  $\mu$ l de agua destilada, se volvió a cargar otro gel de los lavados para saber si hubo DNA que no se unió al quitosán y esté en el sobrenadante. A los 50  $\mu$ l de muestra se agregaron de 200 a 500  $\mu$ l glutaraldehído incubando a 33°C por 5 horas en un agitador magnético (protegiendo de la luz), se volvieron a lavar ahora con 1 ml de PBS a 14,000 rpm a 4°C por 30 min, se desechó el sobrenadante. La muestra se dejó en un ml de PBS, y se mezcló con distintas concentraciones de proteína BSA, para saber cuál es la concentración del antígeno más adecuada. Posteriormente se lavó con PBS para retirar lo que no se pegó al quitosán, a 14,000 rpm, 4°C por 30 minutos, se guardó el sobrenadante para saber la concentración de la proteína que no se pegó, la muestra se dejó en 50  $\mu$ l completando a 500  $\mu$ l con PBS nuevo, para parar la reacción se utilizó  $\text{NaBH}_4$  10 mg/mL, incubando a temperatura ambiente por 30 minutos, se volvió a lavar con PBS a 14000 rpm a 4°C por 30 minutos, dejando un volumen final de 100  $\mu$ l.

# Resultados

## Generación de un vector codificante para la proteína Bcl-6.

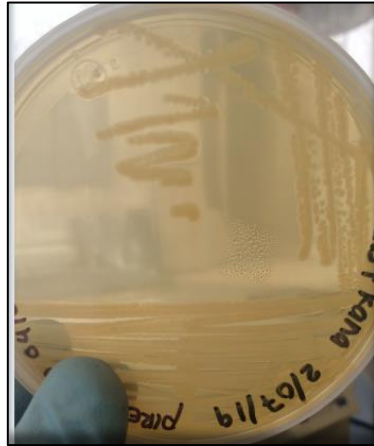
### Amplificación del vector vacío.

El vector pIRES2-EGFP (Figura 1) se proliferó realizando transformación por la técnica de choque térmico, usando células quimiocompetentes. Se realizó utilizando 100 ng del vector, y 50  $\mu$ l de células E. coli DH5 $\alpha$ , se sembraron en medio Luria Bertani (LB) con el antibiótico kanamicina (30 mg/  $\mu$ l). Se observó el crecimiento a las 24 horas, colonias blancas y uniformes (Figura 2). Posteriormente se resembraron en medio líquido LB, se realizó la purificación de DNA plasmídico (pDNA) por la técnica de lisis alcalina utilizando columna de promega.



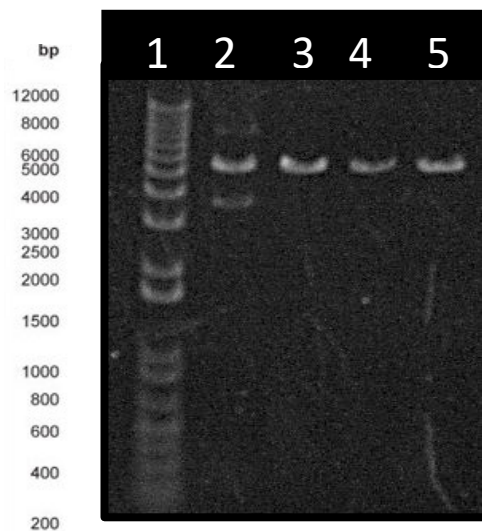
**Figura 1.** Vector pIRES2-EGFP. Contiene el promotor de CMV, en verde la secuencia que codifica para la proteína EGFP, en gris la secuencia IRES, y distintos sitios de corte para enzimas de restricción, con flechas rojas indican los sitios de corte para las enzimas que utilizamos BAMH1 y SAL1.





**Figura 2.** Proliferación del vector pIRES2-EGFP.

Posteriormente se realizó la digestión del vector, utilizando las enzimas de restricción SAL1 y BAMH1, primero se cortó con BAMH1 incubando a 16 °C por 24 horas. Para poder cortar con la otra enzima es necesario el cambio de buffer que se llevó a cabo con precipitaciones con etanol y butanol, después del segundo corte se comprobó con electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Figura 3).



**Figura 3.** Doble digestión de pIRES2-EGFP. 1. Marcador de peso molecular, 2 y 3. PIRES2-EGFP digerido con BAMH1, lavado y digerido con SAL1 para corroborar el corte de ambas enzimas. 4 y 5. PIRES2-EGFP digerido con SAL1, lavado y digerido con BAMH1. Se cargaron 3  $\mu$ l de muestra, con buffer de carga DNA 10X.

*Amplificación de Bcl-6.* El DNA genómico de Bcl-6 se transcribe en diferentes variantes, entre ellas de 3399 pb, 3306 pb, 2003 pb, (Figura 4), siendo la secuencia de referencia la de 2710 pb [11], por lo que los primers fueron diseñados con base en esta variante.

Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype
BCL6-211	<a href="#">ENST00000621333.4</a>	3399	<a href="#">650aa</a>	Protein coding
BCL6-202	<a href="#">ENST00000406870.7</a>	3306	<a href="#">706aa</a>	Protein coding
BCL6-201	<a href="#">ENST00000232014.8</a>	2710	<a href="#">706aa</a>	Protein coding
BCL6-206	<a href="#">ENST00000450123.6</a>	2003	<a href="#">650aa</a>	Protein coding
BCL6-205	<a href="#">ENST00000438077.1</a>	709	<a href="#">104aa</a>	Protein coding
BCL6-204	<a href="#">ENST00000430339.5</a>	454	<a href="#">121aa</a>	Protein coding
BCL6-203	<a href="#">ENST00000419510.6</a>	4178	<a href="#">55aa</a>	Nonsense mediated decay
BCL6-210	<a href="#">ENST00000496823.1</a>	1138	No protein	Processed transcript
BCL6-209	<a href="#">ENST00000480458.5</a>	342	No protein	Processed transcript
BCL6-208	<a href="#">ENST00000479110.1</a>	635	No protein	Retained intron
BCL6-207	<a href="#">ENST00000470319.1</a>	526	No protein	Retained intron

**Figura 4.** Variantes de Bcl-6. La secuencia de referencia contiene 2710 pb y se indica con subrayado azul.

*Diseño de primers.* Se diseñaron los primers con el programa bioinformático Oligo Analyzer de IDT, procurando que la Tm fuera igual para los dos primers, forward y reverse. Para el diseño del oligo forward se incluyó la secuencia del codón de inicio, la secuencia del sitio de corte para la enzima SAL1, y el sitio kozak; mientras que para el oligo reverse se incluyó el codón de paro, y el sitio de corte para la enzima BAMH1. El tamaño esperado del producto de PCR fue de 2 Kb, debido a que para el diseño de los primers se excluyeron las regiones no codificantes UTR. Los oligos obtenidos se muestran en la tabla 2.

Forward	TAAAGTCGACAAATCGCCTCGCCGGCTG
Reverse	AAAGGATCCTTCAGCAGGCTTTGGGGAGCT

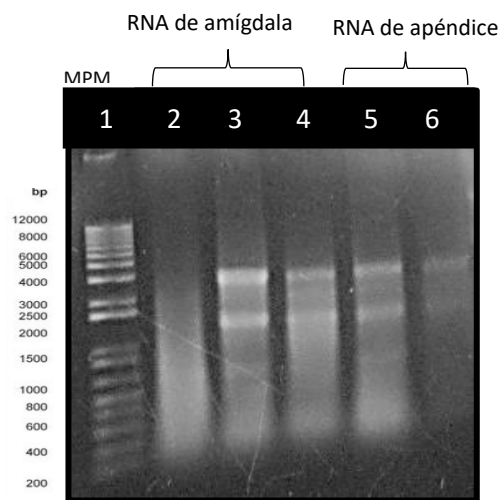
**Tabla 2.** Diseño de primers para Bcl-6, en color azul se muestra la secuencia de reconocimiento para la enzima SAL1, en verde la secuencia kozak, en amarillo la secuencia de reconocimiento para la enzima BAMH1, en rojo los codones de inicio y de paro respectivamente.

*Estandarización de la PCR para Bcl-6.* Para amplificar el gen Bcl-6 se realizó la extracción de RNA de sangre periférica de un donador voluntario sano utilizando trizol, seguido por la síntesis de cDNA empleando el kit Superscript II. Para la estandarización de la PCR para Bcl-6 se partió de la siguiente reacción: desnaturalización inicial de 94°C por 4 minutos, después en un período de 35 ciclos

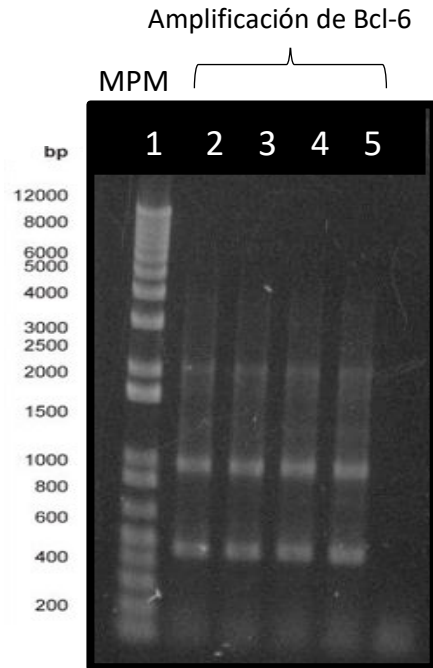
de desnaturalización de 94°C por 1 minuto, alineamiento de los primers a 65°C por 30 segundos, y elongación de 68°C por dos minutos, al término de los ciclos, se realizó una extensión a 68°C por 5 minutos. Para la reacción de PCR se emplearon 100 ng de cDNA, Oligo fw (5 pmol/ µl), Oligo Rv (5 pmol/ µl), dNTPS 1 mM, MgCl<sub>2</sub> (50 mM), Buffer HF 10 X, Taq polimerasa platinum HF (5 u/µl), en un volumen final de 20 µl.

Durante la estandarización de la PCR evaluamos diferentes concentraciones de los componentes de la reacción: cDNA (20- 200 ng), dNTPs (1-3 mM), Taq polimerasa (5-10 µl u/). A pesar de estas modificaciones en la reacción de PCR no se observaba amplificación, una de las causas podría ser el diseño de los primers, o bien que la muestra de sangre periférica que estábamos empleando tuviera bajos niveles de expresión de Bcl-6. Por ello, primeramente revisamos el diseño de los primers y al no encontrar ningún problema en éste, decidimos revisar la segunda opción y emplear como control positivo un tejido.

Recibimos una donación de muestras de RNA de amígdala y apéndice, que son tejidos linfoides con altos niveles de expresión de Bcl-6. Se analizó la calidad del RNA en un gel de agarosa (Figura 5) y se utilizaron las muestras de mejor calidad, es decir, las menos degradadas. A partir del RNA se sintetizó cDNA y realizamos la PCR para Bcl-6 dejando al final una reacción que contenía: cDNA 100 ng, Oligo fw (1 pmol/ µl), Oligo Rv (1 pmol/ µl), dNTPS 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, Buffer HF 10X, polimerasa platinum HF (5u/ µl), H<sub>2</sub>O DEPC cbp 20 µl. Obtuvimos una banda muy tenue en 2 KB (Figura 6) que correspondía con el tamaño del amplicón esperado. Se realizaron varias repeticiones, así como modificaciones a la reacción de PCR y se obtuvo la misma banda tenue, lo que nos llevó a concluir que la concentración del transcrito de Bcl-6 en las muestras era baja.

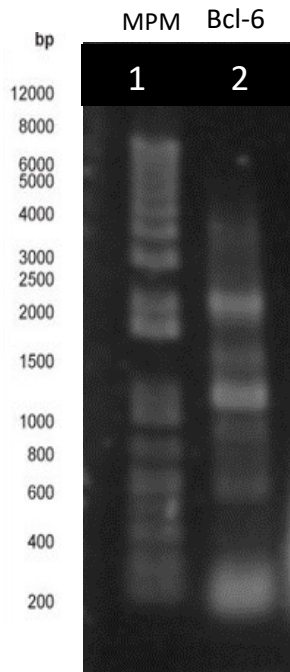


**Figura 5.** Electroforesis de RNA de apéndice y amígdala de humanos. 1. Marcador de peso molecular, 2, 3 y 4. Amígdala, 5 y 6. Apéndice. Gel de agarosa al 1%

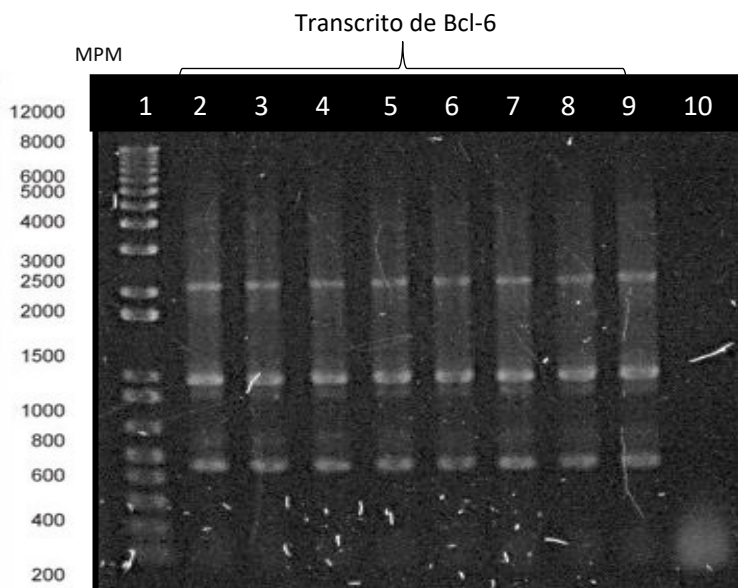


**Figura 6.** Electroforesis de la PCR de Bcl-6 de la síntesis de cDNA de RNA de amígdala humana. 1. Marcador de peso molecular, 2, 3, 4 y 5. Bandas tenúes en 2 KB, se observan otras bandas en distintos pesos moleculares.

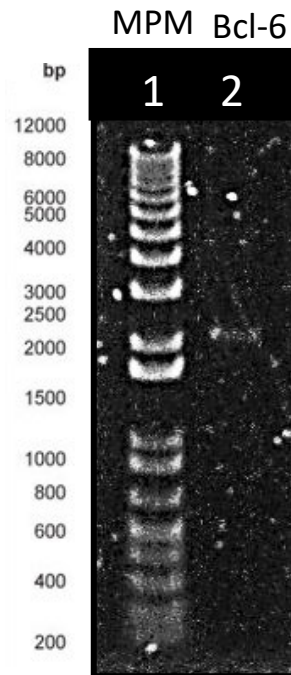
Con la finalidad de potenciar la detección del transcrito realizamos una purificación del mRNA usando el kit “oligotex mRNA Spin-column protocol” para obtener más producto para la amplificación. A partir del RNA de apéndice y amígdala, utilizando 0.50 mg de RNA. Posteriormente, se repitió la PCR de Bcl-6 y se observó amplificación de una banda aún tenúe. Entonces, con el mRNA se realizó One step-PCR con el objetivo de amplificar aún más el transcrito y el resultado obtenido fue una banda en 2 Kb (Figura 7). Sin embargo, no solo se obtuvo esa banda, sino también otras bandas a 1.3 KB y 800 pb (Figura 8), que podrían corresponder a un pegado inespecífico de los primers o a otros transcritos de Bcl-6 de menor longitud, por lo tanto cortamos la banda que esperábamos de 2 KB y realizamos una purificación con columna de promega, se volvió a correr el gel de agarosa al 1%, para corroborar la banda (Figura 9).



**Figura 7.** Electroforesis del producto de One step PCR con la purificación del mensajero de Bcl-6. 1. Marcador de peso molecular, 2. Amplificación de Bcl-6, se observa una banda esperada en 2 KB sin embargo se pueden observar otras bandas en distintos pesos moleculares.



**Figura 8.** Electroforesis de PCR de Bcl-6. Producto de la purificación de mRNA, y one step PCR, se observa la banda a 2 KB, las otras bandas pueden corresponder a otras variantes cortas de Bcl-6.

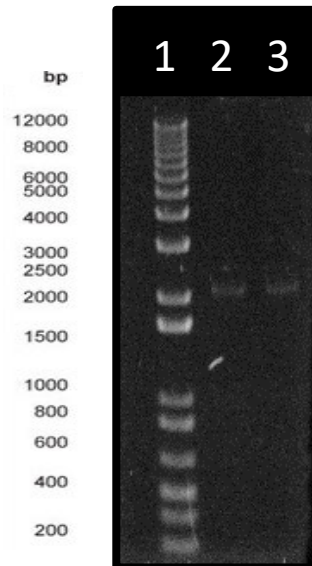


**Figura 9.** Electroforesis de la banda cortada y purificada en 2 KB, se purifico con resina de diatomeas, se corrió el gel de agarosa al 1%, 3  $\mu$ l de DNA con buffer de carga 10 X.

### **Digestión del gen con las enzimas de restricción y ligación.**

Una vez purificado el DNA de Bcl-6, se realizó la digestión con BAMH1 y SAL1, primero se digirió con una enzima a 37 °C utilizando 1  $\mu$ g de DNA, después se precipita el DNA con butanol y se lava con etanol para eliminar restos de buffer de la primera digestión, y luego se realiza la digestión con la otra enzima, de igual forma a 37 °C toda la noche. Posteriormente se volvió a precipitar y lavar para retirar los residuos y poder realizar la ligación, que se dejó a 16°C por 24 horas usando 100 ng de Bcl-6 con 100 ng del vector pIRES2-EGFP (Figura 10). Después se realizó la electroporación, utilizando 100 ng del inserto pIRES2-EGFP/Bcl-6, en células electrocompetentes DH5 $\alpha$ , la electroporación se realizó con un choque eléctrico de 2.5 V, y las células se recuperaron en 1 ml de medio líquido LB, se dejó incubando a 37°C en agitación por una hora, y se sembraron en medio LB sólido con kanamicina, incubando a 37°C por 24 horas. Sin embargo no hubo crecimiento, se realizaron varias repeticiones obteniendo el mismo resultado. Por lo que se decidió clonar en el vector pCR2.1, en el cual no es necesario digerir, lo que evita pérdidas de DNA al no realizar precipitaciones y lavados, además de que nos permite distinguir las colonias que incorporan el DNA (colonias blancas) de las que no lo

contienen (azules) por lo que es una forma más sencilla de seleccionar las células de interés. Utilizando el vector pCR2.1 se siguió el mismo protocolo de electroporación que para pIRES2-EGFP, encontrándose crecimiento de las colonias a las 24 horas, colonias blancas y uniformes, también crecieron colonias sin el inserto que fueron de color azul.



**Figura 10.** Electroforesis de las digestiones de Bcl-6. 1. marcador de peso molecular, 2. Bcl-6 digerido con BAMH1 y después con SAL1, 3. Bcl-6 digerido con SAL1 y después con BAMH1.

Se eligieron colonias blancas uniformes, y se realizó PCR de colonia para corroborar que contenían el inserto y se utilizaron colonias azules como control negativo. Se seleccionaron las que fueron positivas, se sembraron por estría, después se sembraron en medio líquido LB para su crecimiento incubando a 37°C por 24 horas. Posteriormente se realizó la purificación de pDNA por lisis alcalina usando columna de promega y se realizaron las digestiones con BAMH1 y SAL1 para tener solo el gen Bcl-6 y poder clonarlo en el vector pIRES2-EGFP.

#### **Clonación por el método de electroporación:**

Se realizó la ligación del vector PIRES2-EGFP con el gen Bcl-6. El producto de la ligación se precipitó con butanol y se lavó con etanol al 70% para retirar el buffer de la ligación y tenerlo listo para realizar la clonación. La clonación se realizó por el método de transformación por electroporación descrito anteriormente, utilizando el producto de ligación (100 ng) y células electrocompetentes de *E.coli* DH5 $\alpha$ , que fueron sembradas en cajas de LB con kanamicina, incubando a 37°C durante 24

horas. Se observó el crecimiento de colonias blancas uniformes, para seleccionar las colonias con el vector vacío y las del constructo con Bcl-6, se hizo PCR de colonia de todas las colonias que crecieron a las 24 horas. Las que fueron positivas se sembraron por estría, se sembraron en medio líquido LB durante 24 horas para su crecimiento, en seguida se hizo la purificación de pDNA usando columna de promega, corriendo el producto en un gel de agarosa al 1% para verificar que se encuentre la banda en 2 Kb. El producto de la PCR de colonia se mandó a secuenciar para corroborar que correspondía a la secuencia de Bcl-6 (Figura 11).

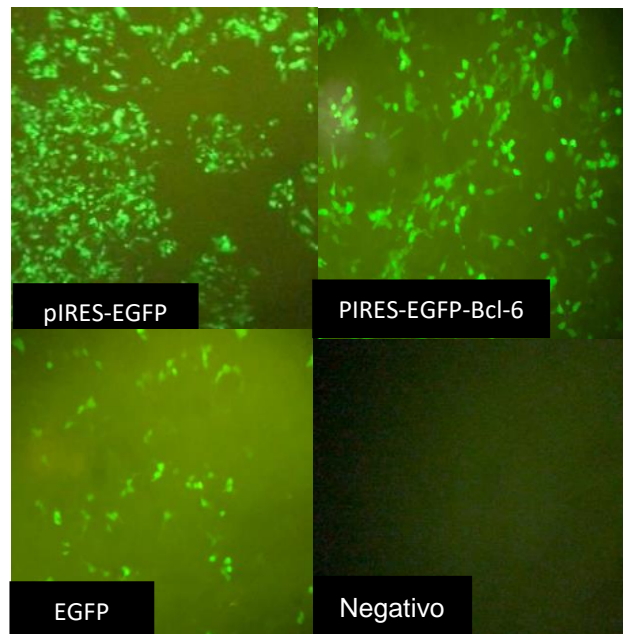
```
>Bcl6
AGAAGTGGGGTCTTAGAAGTGGTGTGCAAGAAGTTTCTAGGAAAGGACACCAGGTTTTGAGCAA
AATTTTGGACTGTGAAGCAAGGCATTGGTGAAGACAAAATGGCCTCGCCGGCTGACAGCTGTATCCAGTT
CACCCGCCATGCCAGTGTATTTCTTCAACCTTAATCGTCTCCGGAGTCGAGACATCTTGACTGATGTT
GTCATTGTTGTGAGCCGTGAGCAGTTTAGAGCCCAATAAACGGTCCATGGCCTGCAGTGGCCTGTTCT
ATAGCATCTTTACAGACCAGTTGAAATGCAACCTTAGTGTGATCAATCTAGATCCTGAGATCAACCTGA
GGGATTTCTGCATCTCTCTGGACTTCATGTACACATCTCGGCTCAATTTGCGGGAGGGCAACATCATGGCT
GTGATGGCCACGGCTATGTACCTGCAGATGGAGCATGTTGTGGACACTTGCCGGAAGTTTATTAAGGCCA
GTGAAGCAGAGATGGTTTCTGCCATCAAGCCTCCTCGTGAAGAGTTCTCAACAGCCGGATGCTGATGCC
CCAAGACATCATGGCCTATCGGGGTGAGGTTGGTGGAGAACAACCTGCCACTGAGGAGCGCCCTGGG
TGTGAGAGCAGAGCCTTTGCCCCAGCCTGTACAGTGGCCTGTCCACACCGCCAGCCTCTTATTCATGT
ACAGCCACCTCCCTGTGACGAGCCTCTCTTCTCCGATGAGGAGTTTCGGGATGTCCGGATGCCTGTGGC
CAACCCCTTCCCAAGGAGCGGGCACTCCCATGTGATAGTGCCAGGCCAGTCCCTGGTGAGTACAGCCGG
CCGACTTGTGAGGTGTCCCCAATGTGTGCCACAGCAATATCTATTCACCCAAGGAAACAATCCCAGAAG
AGGCACGAAGTGATATGCACTACAGTGTGGCTGAGGGCCTCAAACCTGCTGCCCCCTCAGCCCCGAAATGC
CCCCACTTCCCTTGTGACAAGGCCAGCAAAGAAGAAGAGAGACCCCTCCTCGGAAGATGAGATTGCCCTG
CATTTCCAGCCCCCAATGCACCCCTGAACCGGAAGGGTCTGGTTAGTCCACAGAGCCCCAGAAATCTG
ACTGCCAGCCCAACTGCCCCACAGAGTCTGCAGCAGTAAGAATGCCTGCATCCTCCAGCTTCTGGCTC
CCCTCCAGCCAAGAGCCCCACTGACCCCAAGCCTGCAACTGGAAGAAATACAAGTTCATCGTGTCAAC
AGCCTCAACCAGAATGCCAAACCAGAGGGGCTGAGCAGGCTGAGCTGGGCGCCTTTCCCCACGAGCCT
ACACGGCCCCACCTGCCTGCCAGCCACCCATGGAGCCTGAGAACCTTGACCTCCAGTCCCCAACCAAGCT
GAGTGCCAGCGGGGAGGACTCCACCATCCACAAGCCAGCCGGCTCAATAACATCGTTAACAGGTCATG
ACGGGTCTCCCCGACGAGCAGCGAGCCACTCACACTCTACATGCACCCCCGAAGTGCAGTCTCT
GCGGCTCTCAGTCCCCACAGCATGCAGAGATGTGCCTCCACACCGCTGGCCCCACGTTCCCTGAGGAGAT
GGGAGAGACCCAGTCTGAGTACTCAGATTCTAGCTGTGAGAACGGGCTTCTTCTGCAATGAGTGTGAC
TGCCGCTTCTCTGAGGAGGCTCACTCAAGAGGCACAGCTGCAGACCCACAGTGACAAACCTTACAAGT
GTGACCGCTGCCAGGCTCCTTCCGCTACAAGGGCAACCTGCAGCCACAAGACCGTCCATACCCGTTGA
GAAACCCATCGTTGCAACATCTGTGGGGCCAGTTCAACCGCCAGCCAACCTGAAACCCACACTCGA
ATTCACTCTGGAGAGAAGCCCTACAAATGCGAAACCTGCGGAGCCAGATTTGTACAGGTGGCCCACCTCC
GTGCCCATGTGCTTATCCACACTGGTGAGAAGCCCTATCCCTGTGAAATCTGTGGCACCCGTTTCCGGCA
CCTTCAGACTCTGAAGAGCCACCTGCGAATCCACACAGGAGAGAAACCTTACCATTGTGAGAAGTGAAC
CTGCATTTCCGTACAAAAGCCAGCTGCGACTTCACTTGCGCCAGAAGCATGGCGCCATCACCAACACCA
AGGTGCAATACCGCGTGTGAGCCACTGACCTGCCTCCGGAGCTCCCCAAAGCCTGCTGAAGCATGGAGTG
TTGATGCTTTTCGTCTCCAGCCCTTCTCAGAATCTACCCAAAGGATACTGTAACACTTTACAATGTTTCA
CCCATGATGTAGTGCCTCTTTCATCCACTAGTGCACAAATCATAGCTGGGGTTGGGGTGGTGGGGTCCG
GGCCTGGGGGACTGGGAGCCGACAGCTCCCCCTCCCCACTGCCATAAAACATTAAGAAAATCATATT
GCTTCTTCTCCTATGTGTAAGGTGAACCATGTGAGCAAAAAGCAAATCATTATATGTCAAAGCAGGG
GAGTATGCAAAAGTTCTGACTTACTTTAGTCTGCAAAATGAGGAATGTATATGTTTTGTGGGAACAGAT
GTTTCTTTTGTATGTAAATGTGCATTCTTTTAAAAGACAAGACTTCAGTATGTTGTCAAAGAGAGGGCTT
TAATTTTTTTAAACAAAGGTGAAGGAATATATGGCAGAGTTGTAATATATAAATATATATATATAAAA
ATAAATATATATAAACTAAAAAAGATATATATAAATAAATAAATCGCGTTAAAGGCTCGATTTGTATC
TGCAGGCAGACACGGATCTGAGAACTTTATTGAGAAAAGAGCACTTAAGAGAATATTTTAAGTATTGCAT
CTGTATAAGTAAGAAAATATTTTGTCTAAAATGCCTCAGTGTATTTGTATTTTTTTGCAAGTGAAGGTTT
ACAATTTACAAAGTGTGATTAATAAAAAACAAAAGAACAATAAATACTGCAGAAGGAAAATGTGTAAT
TTTGTCTAGTTTTTTCAGTTTGTATATACCCGTACACCGTGCCTCACGGTGCCTTTTTTTCACGGAAGTTT
TCAATGATGGGGCAGCGTGCACCATCCCTTTTTTGAAGTGTAGGCAGACACAGGACTTGAAGTTGTACT
AACTAAACTCTCTTTGGGAATGTTTGTCTCATCCCATCTGCGTCACTGCTTGTGTTATAACTACTCCGGA
GACAGGGTTTGGCTGTGCTAAACTGCATTACCGCGTTGAAAATATAGCTGTACAAATATAAGAATAAA
ATGTTGAAAAGTCAAA
```



**Figura 11.** Análisis de la secuenciación de Bcl-6. Se utilizaron cuatro primers para lograr la cobertura de todo el producto de PCR y se corroboró que la secuencia de Bcl-6 se encontraba íntegra desde el codón de inicio al codón de paro. En amarillo está la cobertura del primer Rv para el extremo de Bcl-6, en color gris la del primer Fw para el extremo de Bcl-6, subrayado la del primer Rv intermedio para Bcl-6 y en azul la del primer Fw intermedio para Bcl-6.

### **Evaluación de la expresión de Bcl-6.**

Debido a que el constructo pIRES2-EGFP-Bcl6 contiene la secuencia de EGFP downstream de Bcl-6 y la secuencia IRES2, al traducirse si se expresa la proteína EGFP podemos deducir que Bcl-6 también es expresado. Esto es una forma indirecta de verificar la expresión de Bcl-6. Para ello se hicieron transfecciones en las células HEK 293T, se emplearon 4 condiciones: pIRES2-EGFP-Bcl-6, pIRES2-EGFP (vector vacío), GFP (control positivo) y sin DNA (control negativo en incubación por 24 horas. Posteriormente, se verificó la expresión de EGFP en un microscopio de fluorescencia (Figura 12). Encontramos que las células que contenían tanto el vector vacío como el constructo con Bcl-6 expresaban la proteína verde fluorescente lo cual es indicativo que al realizar la traducción de proteínas se tuvo que traducir el gen que codifica para la proteína Bcl-6 y después EGFP, entonces deducimos que Bcl-6 se está expresando.

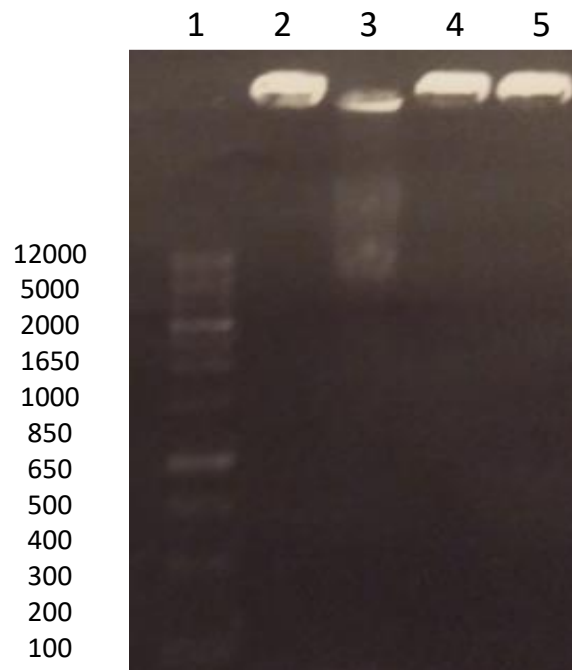


**Figura 12.** Análisis del resultado de la transfección en células HEK. Contenían tanto el vector vacío como el constructo de Bcl-6, observamos la expresión de la proteína verde fluorescente lo cual es indicativo que también se expresó el gen Bcl-6.

## Encapsulamiento del vector en nanopartículas de quitosán recubiertas de antígeno.

### *Preparación de nanopartículas de quitosán con DNA.*

Se prepararon nanopartículas de quitosán al 0.5% disueltas en ácido acético al 0.2%, usando  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y 12.5  $\mu\text{g}$  de DNA que fue tanto vector vacío como vector con Bcl-6, para corroborar que el DNA fuera encapsulado se realizó un gel de agarosa al 1%, como el DNA se encapsuló completamente, se observó en la electroforesis que el DNA no corre y se queda en el pozo, esto es porque el quitosán que encapsula el DNA tiene una carga positiva (Figura 13).



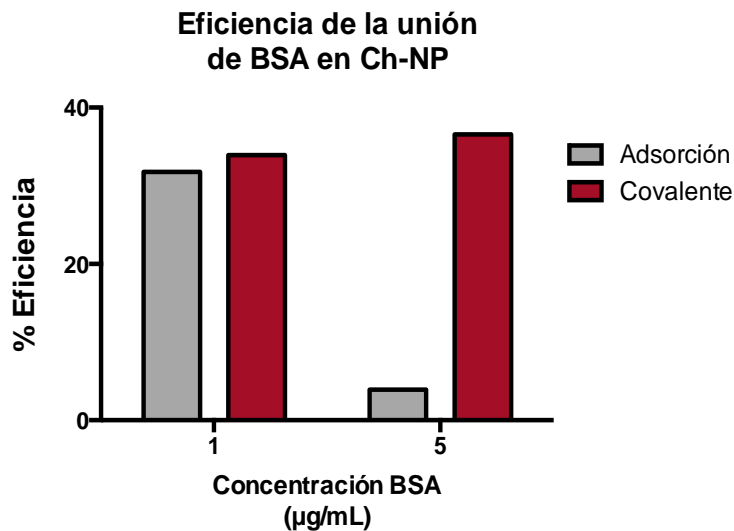
**Figura 13.** Electroforesis de la encapsulación del DNA por nanopartículas de quitosán: **1.** Marcador de peso molecular, **2.** Nanopartículas de quitosán, **3.** DNA (PIRES2-EGFP), **4.** Np-Ch+DNA (PIRES2-EGFP-Bcl-6), **5.** NP-Ch + DNA (PIRES2-EGFP). Las nanopartículas se prepararon usando 12.5  $\mu\text{g}$  de DNA total. En cada carril se cargaron 15  $\mu\text{l}$  de muestra.

### *Preparación de nanopartículas de quitosán recubiertas de antígeno.*

Se prepararon Np-Ch cubiertas de antígeno, el antígeno a utilizar es la proteína A de *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, para la estandarización utilizamos albumina de suero bovino (BSA). Probamos dos distintos métodos para el pegado de la proteína, uno por el método de adsorción en el cual la proteína se pega electrostáticamente (por carga), el DNA se une por su carga negativa al quitosán

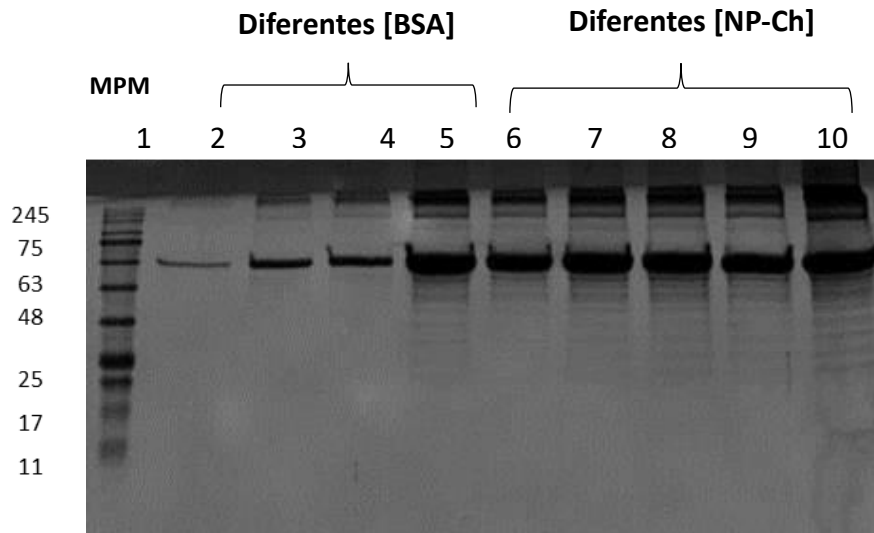
que tiene una carga positiva. Esta unión es débil y reversible. Por lo tanto probamos otro método en el cual hay una unión covalente, utilizamos glutaraldehído como crooslinker el cual se unirá al quitosán y éste a la proteína, realizando una unión irreversible.

Los resultados obtenidos se midieron realizando un ensayo de BCA al sobrenadante comparando su concentración con la albúmina que se unió a las Np-Ch y así poder calcular el porcentaje de eficiencia de pegado y comparar entre ambos métodos (Figura 14).



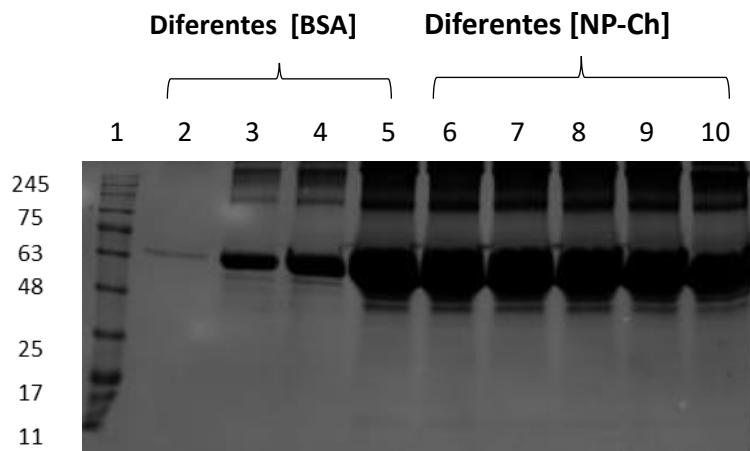
**Figura 14.** Comparación entre los métodos de adsorción y unión covalente de la proteína a las Np-Ch. Observamos que conforme aumenta la concentración de BSA por el método de adsorción hay una menor unión de la proteína al quitosán, mientras que por el método de unión covalente hay una mayor unión de la proteína al quitosán, dejando en los lavados una menor concentración de proteína, por lo tanto el método covalente es más eficiente al captar una mayor cantidad de proteína.

Para saber con más certeza si la proteína se estaba uniendo a Np-Ch, realizamos un SDS- PAGE, tanto de Np-ch con BSA y de los lavados para tener un estimado de la proteína que no se pegaba y comparar con el ensayo de BCA. Probamos diferentes concentraciones de la proteína y se observó que a mayor concentración se pega más la proteína al quitosán, en cambio al preparar Np-Ch con una misma concentración de proteína y diferentes concentraciones de quitosán no había un cambio significativo en la unión, así que no afecta la cantidad de quitosán, sino la cantidad de proteína, ya que el quitosán tiene muchos sitios de unión disponibles (Figura 15)



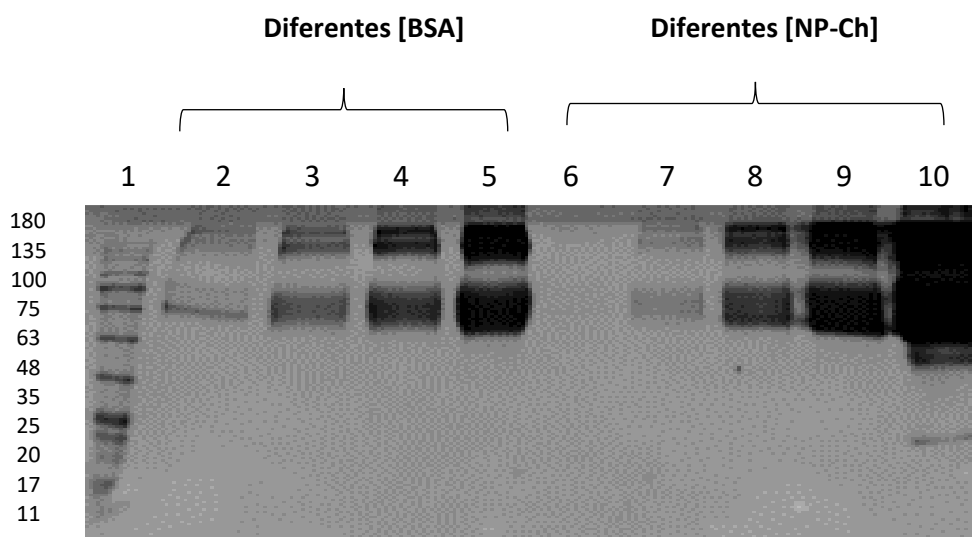
**Figura 15.** SDS- PAGE de Np-Ch con diferentes concentraciones de BSA (100µg/ml de Np-Ch), y diferentes concentraciones de Np-Ch (5 µg/ml de BSA) por el método de **adsorción**, **1.** MPM, **2.** 0.1 µg/ml de BSA, **3.** 0.5 µg/ml de BSA **4.** 1.0 µg/ml de BSA, **5.** 5 µg/ml de BSA **6.** BSA sin Np-Ch, **7.** BSA 12.5 µg/ml de Np-Ch, **8.** BSA con 25 µg/ml de Np-Ch, **9.** BSA con 50 µg/ml de Np-Ch, **10.** BSA con 200 µg/ml de Np-Ch.

Realizamos otro SDS-PAGE, en donde cargamos los lavados de Np-Ch con BSA, ya que al lavarlas en el sobrenadante quedaría toda la proteína que no se unió al quitosán. Se observó una mayor cantidad de proteína en el sobrenadante que proteína pegada al quitosán, y al realizar el ensayo de BCA hubo mayor concentración de proteína en los lavados, por lo tanto en este método de adsorción hay poca eficiencia de pegado de la proteína (Figura16).

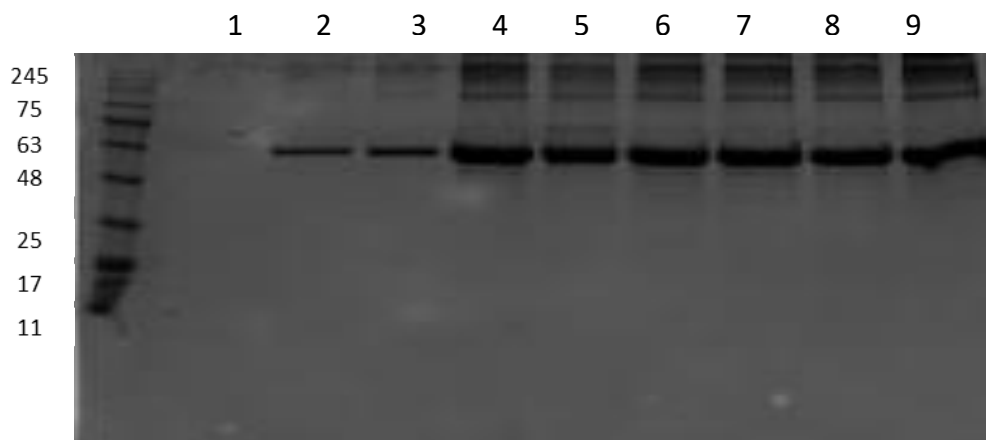


**Figura 16.** SDS –PAGE de **sobrenadantes** con diferentes concentraciones de BSA (100µg/ml de Np-Ch) y diferentes concentraciones de Np-Ch (5 µg/ml de BSA) por el método de **adsorción**. **1.** MPM, **2.** 0.1 µg/ml de BSA **3.** 0.5 µg/ml de BSA **4.** 1.0 µg/ml de BSA, **5.** 5 µg/ml de BSA, **6.** BSA sin Np-Ch, **7.** BSA con 12.5 µg/ml de Np-Ch, **8.** BSA con 25 µg/ml de Np-Ch, **9.** BSA con 50 µg/ml de Np-Ch, **10.** BSA con 200 µg/ml de Np-Ch.

Se realizó el mismo procedimiento para las muestras y los lavados de las Np-Ch preparadas por el método de unión covalente, al igual que por el método de adsorción se realizaron con diferentes concentraciones de proteína con una misma concentración de quitosán, y también con una misma concentración de proteína con distintas concentraciones de quitosán. Se observó que hay mayor unión de la proteína al quitosán cuando se aumenta la concentración de la proteína (Figura 17), y en los lavados se observó que hay menor cantidad de proteína que no se une al quitosán, realizando el ensayo de BCA de los lavados se observó una mayor eficiencia de pegado de la proteína a Np-Ch (Figura 18), comparado con el método de adsorción. Por lo tanto elegimos este método para la unión del antígeno.

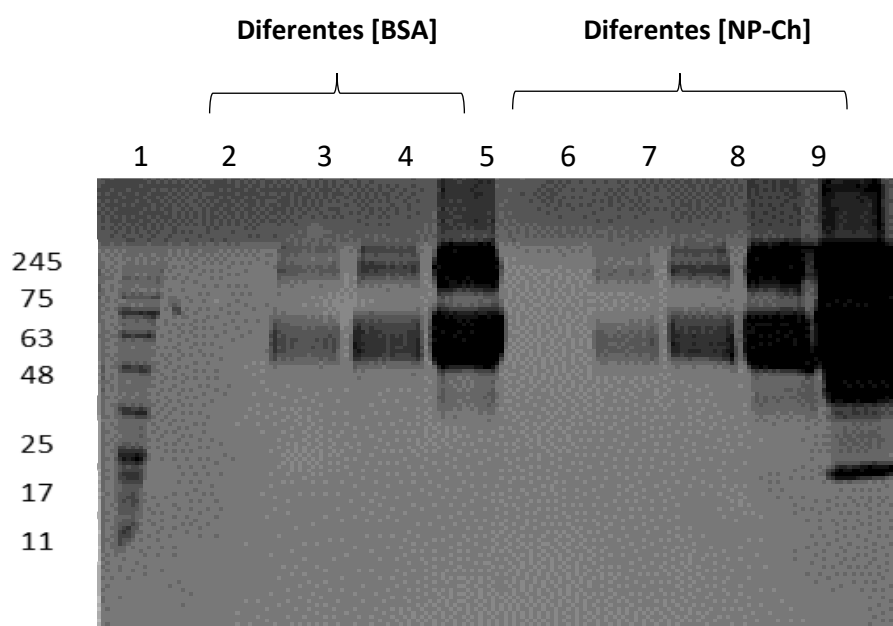


**Figura 17.** SDS- PAGE de Np-Ch con diferentes concentraciones de BSA (100µg/ml de Np-Ch), y diferentes concentraciones de Np-Ch (5 µg/ml de BSA) por el método de **unión covalente**. **1.** MPM, **2.** 1 µg/ml de BSA, **3.** 5 µg/ml de BSA **4.** 10 µg/ml de BSA, **5.** 20 µg/ml de BSA **6.** BSA sin Np-Ch, **7.** BSA 12.5 µg/ml de Np-Ch, **8.** BSA con 25 µg/ml de Np-Ch, **9.** BSA con 50 µg/ml de Np-Ch, **10.** BSA con 200 µg/ml de Np-Ch.

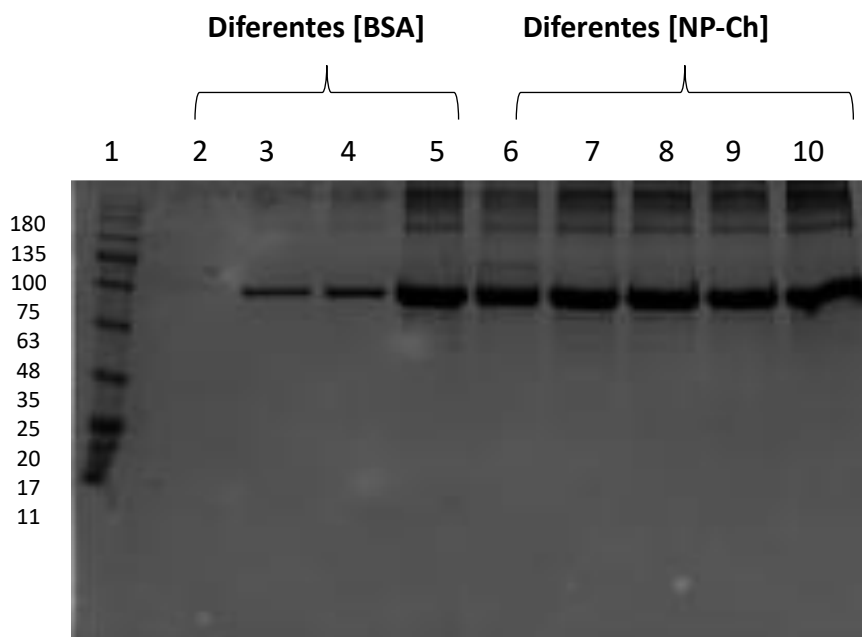


**Figura 18.** SDS –PAGE de **sobrenadantes** con diferentes concentraciones de BSA (100µg/ml de Np-Ch) y diferentes concentraciones de Np-Ch (5 µg/ml de BSA) por el método de **unión covalente**. **1.** MPM, **2.** 1.0 µg/ml de BSA **3.** 5 µg/ml de BSA **4.** 10 µg/ml de BSA, **5.** 20 µg/ml de BSA, **6.** BSA sin Np-Ch, **7.** BSA con 12.5 µg/ml de Np-Ch, **8.** BSA con 25 µg/ml de Np-Ch, **9.** BSA con 50 µg/ml de Np-Ch, **10.** BSA con 200 µg/ml de Np-Ch.

Al preparar las Np-Ch con BSA por el método covalente, cuando añadimos NaOH la muestra se precipitaba formando grumos, y nos era difícil trabajar con ella, así que probamos prepara las Np-Ch sin NaOH. La ausencia de este paso no debía afectar porque se usa para una mayor desacetilación del quitosán, sin embargo el quitosán que empleamos tiene un grado de desacetilación alto, cercano al 80%. Corrimos un SDS-PAGE para ver si afectaba, y observamos que fue la misma unión de proteína con el quitosán, y que no afecto nuestro procedimiento, así que proseguimos a prepararlas sin NaOH (Figura 19).



**Figura 19.** SDS- PAGE de Np-Ch con diferentes concentraciones de BSA (100µg/ml de Np-Ch), y diferentes concentraciones de Np-Ch (5 µg/ml de BSA) por el método de **unión covalente sin NaOH**. **1.** MPM, **2.** 1 µg/ml de BSA, **3.** 5 µg/ml de BSA **4.** 10 µg/ml de BSA, **5.** 20 µg/ml de BSA **6.** BSA sin Np-Ch, **7.** BSA 12.5 µg/ml de Np-Ch, **8.** BSA con 25 µg/ml de Np-Ch, **9.** BSA con 50 µg/ml de Np-Ch, **10.** BSA con 200 µg/ml de Np-Ch.



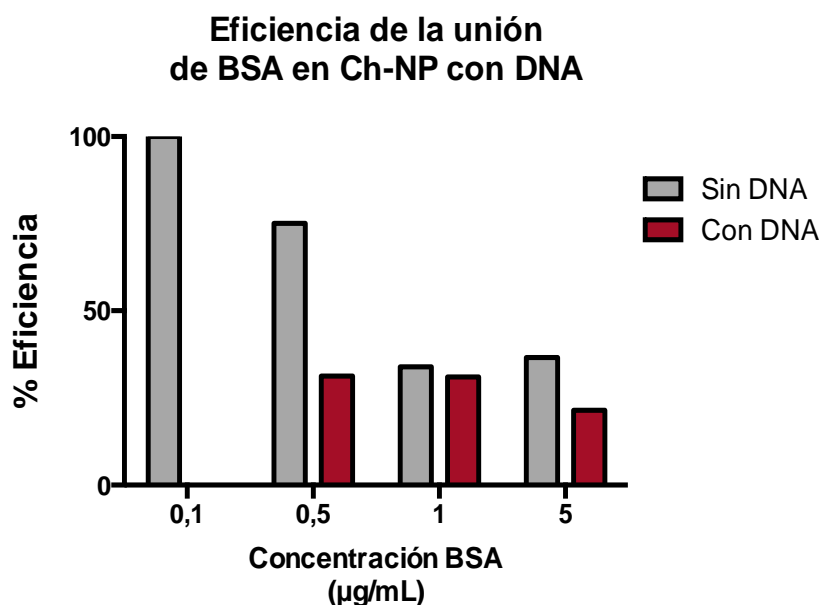
**Figura 20.** SDS –PAGE de **sobrenadantes** con diferentes concentraciones de BSA (100µg/ml de Np-Ch) y diferentes concentraciones de Np-Ch (5 µg/ml de BSA ) por el método de **unión covalente sin NaOH**. **1.** MPM, **2.** 1.0 µg/ml de BSA **3.** 5 µg/ml de BSA **4.** 10 µg/ml de BSA, **5.** 20 µg/ml de BSA, **6.** BSA sin Np-Ch, **7.** BSA con 12.5 µg/ml de Np-Ch, **8.** BSA con 25 µg/ml de Np-Ch, **9.** BSA con 50 µg/ml de Np-Ch, **10.** BSA con 200 µg/ml de Np-Ch.

### **Preparación de nanopartículas de quitosán que encapsulan DNA cubiertas de antígeno.**

Se prepararon Np-Ch al 2% con DNA (12.5 µg) y BSA, usando las siguientes concentraciones de BSA:

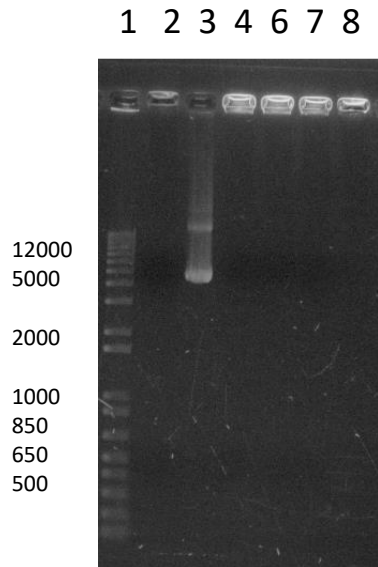
[BSA]	Vol. del stock de BSA [100 mg/mL] ( $\mu$ l)	Vol. Np-Ch ( $\mu$ l)	PBS ( $\mu$ l)
5 $\mu$ g/ mL	50	200	750
1 $\mu$ g/ mL	10	200	790
0.5 $\mu$ g / mL	5	200	795
0.1 $\mu$ g/mL	1	200	799
0	0	200	800

Se realizó el ensayo de BCA para saber la concentración de proteína que se quedaba en los lavados y la que se pegaba al quitosán pero ahora Np-Ch con DNA, observamos que hay menos unión de la proteína al quitosán cuando el quitosán tiene DNA, lo que muestra que hay una competencia por los grupos funcionales con el quitosán (Figura 21). Durante la preparación de estas Np-Ch corroboramos su unión con el DNA corriendo un gel de agarosa al 1% (Figura 22).



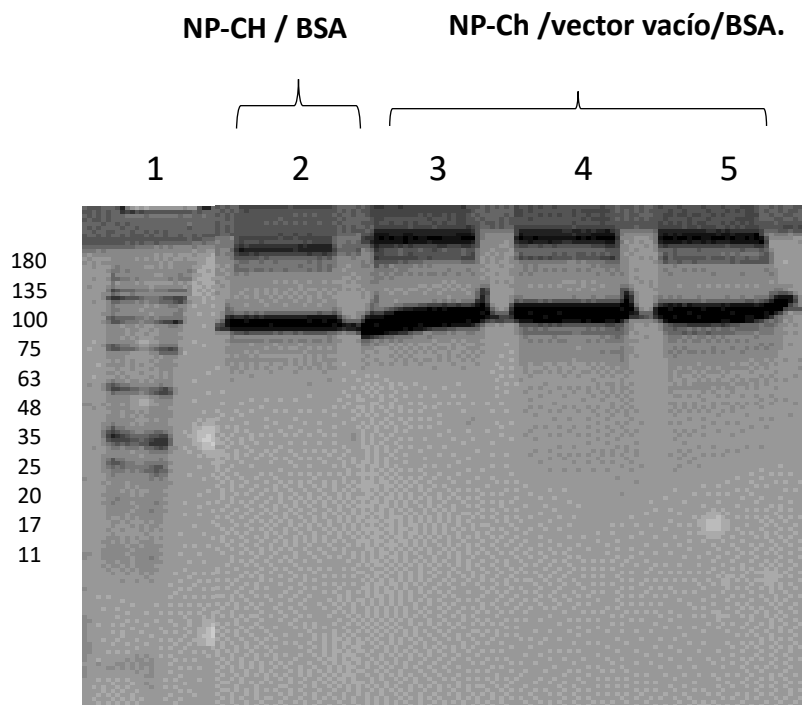
**Figura 21.** Comparación del porcentaje de eficiencia de la unión de BSA a Np-Ch con DNA y sin DNA.



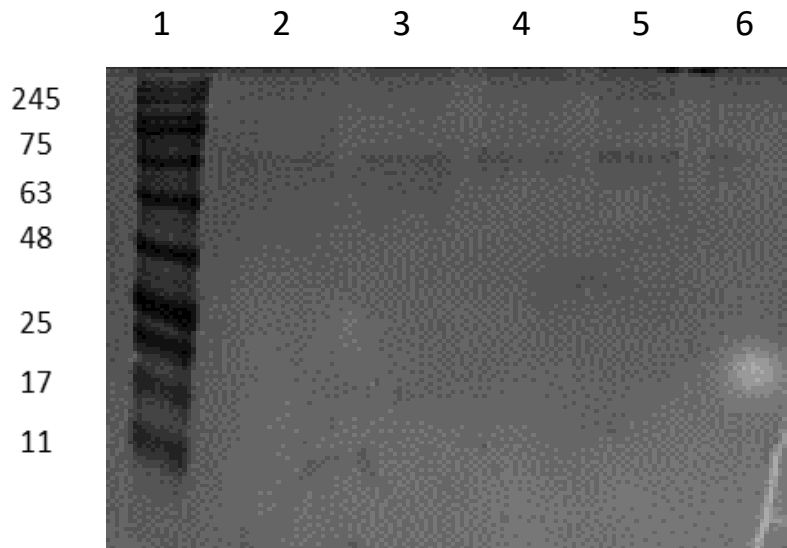


**Figura 22.** Electroforesis del gel de agarosa al 1% de las Np-Ch con DNA, usando 12.5  $\mu$ g de DNA, 1. Marcador de peso molecular, 2. Quitosán más H<sub>2</sub>O, 3. DNA (PIRES-2EGFP), 4, 5,6 y 7. Np-Ch con DNA. Se cargaron muestras de triplicado.

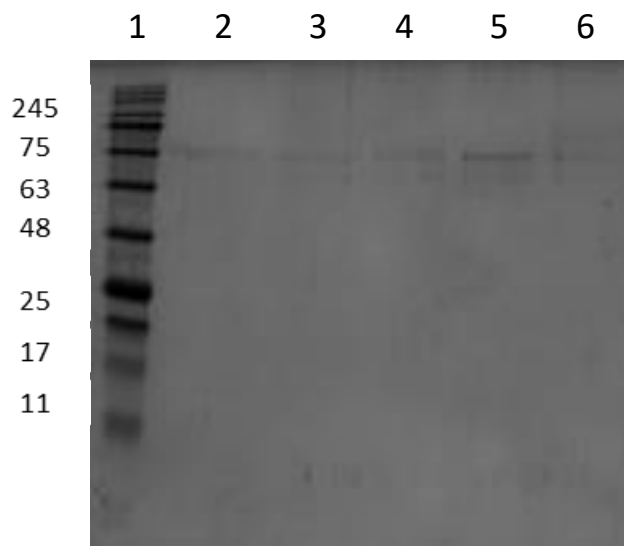
Se realizó SDS-PAGE para Np-Ch con DNA y BSA, al igual con los lavados y se comprobó que hay una menor unión de la proteína al quitosán cuando hay DNA (Figura 23). Se realizaron nuevas Np-Ch preparadas por el método covalente Figura 24 y 25.



**Figura 23.** SDS-PAGE de Np-Ch con DNA y BSA por el método de adsorción 1. MPM, 2. NP-Ch con 10 µg/ml de BSA, 3, 4 y 5. Np-Ch con 12.5 µg/ml DNA y 10 µg/ml BSA.



**Figura 24.** Np-Ch con 12.5 µg de DNA y diferentes concentraciones de BSA por el método covalente. 1. Marcador de peso molecular, 2. Np-Ch sin BSA, 3. Np-Ch con 12.5 µg de DNA más 0.1 µg/ml de BSA, 4. Np-Ch con 12.5 µg/ml de DNA más 0.5 µg/ml de BSA, 5. Np-Ch con 12.5 µg de DNA y 1 µg/ml de BSA, 6. Np-Ch con 12.5 µg de DNA y 5 µg/ml de BSA.



**Figura 25. Sobrenadantes de Np-Ch con 12.5 µg de DNA y diferentes concentraciones de BSA por el método covalente.** 1. Marcador de peso molecular, 2. Np-Ch sin BSA, 3. Np-Ch con 12.5 µg de DNA más 0.1 µg/ml de BSA, 4. Np-Ch con 12.5 µg/ml de DNA más 0.5 µg/ml de BSA, 5. Np-Ch con 12.5 µg de DNA y 1 µg/ml de BSA, 6. Np-Ch con 12.5 µg de DNA y 5 µg/ml de BSA.

De esta manera deducimos que la proteína BSA se une covalentemente a Np-Ch, pero con una menor eficiencia cuando Np-Ch tiene DNA, cabe mencionar que todos los experimentos de la preparación para la unión de la proteína a Np-Ch se hicieron por triplicado.

### Discusión

En este trabajo se informa la amplificación y clonación del gen Bcl-6 y su encapsulación en nanopartículas de quitosán conjugado a antígeno con el objetivo de dirigir su liberación hacia células B humanas. En las células B el incremento en la expresión del represor transcripcional Bcl-6 promueve su rápida proliferación y la formación de agregados que maduran hacia la generación de centros germinales (CG). Asimismo Bcl-6 provee un ambiente tolerante para la hipermutación de los genes de inmunoglobulina. Por ello, la expresión de Bcl-6 en las células B es crítica para la formación *in vitro* de CG, que pueden servir de modelos para el estudio de la memoria inmunológica. El objetivo de este trabajo fue generar un método de encapsulación y liberación de DNA exógeno codificante para la proteína Bcl-6 para ser utilizado como una forma de transfección y marcaje para células B con un BCR específico. La interacción con el antígeno permite la señalización a través del BCR y su captación en un proceso llamado endocitosis mediada por BCR, en el cual el antígeno es endocitado, y al estar unido a la nanopartícula conteniendo el vector codificante para Bcl-6, éste también será endocitado.

La amplificación y clonación del gen Bcl-6 representó un desafío, primeramente, tomando como base la secuencia de referencia de Bcl-6, se diseñaron oligonucleótidos que flanqueaban el dominio deseado dejando fuera las secuencias no codificantes (UTR). El tamaño esperado del amplicón fue de 2 Kb, sin embargo, se encontró amplificación de otros productos incluyendo uno en gran concentración

de aproximadamente 1.3 Kb. A pesar de diversas estrategias que empleamos para mejorar la especificidad de la PCR, siempre se encontró la amplificación de este producto, el cual fue secuenciado y podría corresponder a una forma cortada de Bcl-6 o una variante de menor tamaño. En un estudio de Shen, et al 2008 se diseñaron oligonucleótidos similares a los nuestros empleando la secuencia de referencia y se encontró también la amplificación de una variante corta de alrededor de 1.8 Kb. En dicho estudio se emplearon diversas líneas celulares de linfocitos B para el aislamiento de los transcritos, en cambio en este trabajo para la amplificación de Bcl-6 se realizó cDNA de RNA de sangre periférica pero dado que no se obtuvo la banda deseada probamos otros tejidos en donde se ha encontrado mayor expresión del gen Bcl-6 como en amígdala y apéndice. Es posible que la expresión de diferentes variantes dependa del tejido del cual se obtengan, por ejemplo una isoforma de Bcl-6 de alrededor de 300 pb ha sido reportada en hipocampo humano (Shen et al. 2008). Dado que no se han reportado isoformas de 1.3 Kb, es probable que se trate de un producto cortado de Bcl-6 generado durante la PCR.

Aun empleando muestras de tejido, la cantidad de transcritos presentes para la amplificación de Bcl-6 era muy baja y no obteníamos resultados favorables así que nos propusimos aumentar la concentración de mRNA, purificando los mensajeros, pero obteníamos una banda muy tenue. Posteriormente decidimos realizar el cDNA y PCR en un solo paso realizando One Step - PCR, teóricamente al realizar estos procedimientos obtenemos mayor concentración y finalmente pudimos amplificar el gen. La importancia de utilizar estos reactivos para la amplificación del gen, es que en un mismo pozo se lleva a cabo los pasos de la transcripción reversa y PCR, esto reduce el número de manipulaciones de la muestra requeridas, el tiempo para obtener resultados, y menor riesgo de contaminación, este kit es ideal para la detección rápida de la expresión génica.

Una vez que obtuvimos el gen Bcl-6 amplificado, proseguimos a clonarlo, en estudios anteriores clonaron el gen Bcl-6 para estudiar las translocaciones cromosómicas que involucran la banda 3q27 y varios sitios cromosómico ( Bihui, et al 1993) ellos clonaron en un vector del fago lambda Gem11 y posteriormente

hicieron un screening de librería empleando linfocitos humanos; en cambio, nosotros buscamos un vector que cumpliera con las características de expresión de dos proteínas diferentes, que tuviera el gen que codifica la proteína verde fluorescente para observar su expresión, y que tuviera un promotor con gran capacidad de replicación en células de mamífero como lo es el promotor citomegalovirus (CMV). En este vector las secuencias que flanquean EGFP tienen un sitio de inicio de traducción de la secuencia Kozak, es por ello que el indicado fue piRES2-EGFP. Sin embargo, la clonación en este vector era poco eficiente en el número de colonias crecidas, por lo que decidimos primero clonarlo en un vector para clonación PCR2.1. Una característica esencial del vector PCR2.1 es que permite seleccionar colonias que tienen el producto de PCR, además de que son lineales y tienen extremos 3'T (residuo de timina en el 3' del vector) por lo que su uso es inmediato, sin necesidad de digerir el inserto. El uso de estos vectores es muy frecuente ya que cualquier gen puede ser guardado, para su posterior uso en otros vectores.

Por otro lado, para el desarrollo de métodos que permitan la estimulación y selección de células B, un problema común ha sido la activación policlonal (datos no publicados). Por ello se propuso una membrana a base de quitosán que llevara en su superficie antígeno inmovilizado para un mayor reconocimiento del receptor de células B (BCR). En un trabajo anterior han reportado la producción de anticuerpos monoclonales producidos por células B plasmáticas, donde realizan transfecciones de los genes Bcl-6 y Bcl-XL empleando retrovirus [26]. Este abordaje permitió la expansión de linfocitos B y su perpetuación in vitro, además hubo diferenciación hacia células plasmáticas que produjeron mAbs contra el virus sincitial respiratorio. Este trabajo proporcionó una nueva herramienta para estudiar la biología de células B del centro germinal, la traducción de señales a través de BCR específicos de antígeno y la generación de anticuerpos monoclonales humanos de alta afinidad (Kwakembos et al 2010). A diferencia de lo que nosotros planteamos, en el trabajo de Kwakembos et. al se utilizaron células B de memoria CD27<sup>+</sup> humanas de sangre periférica, nuestro objetivo será emplear células B naive por selección negativa para evitar su activación en ausencia de antígeno, además

ellos transfectaron con Bcl-6 y Bcl-XL mediante transferencia génica mediada por retrovirus LZRS, mientras que nosotros planteamos la incorporación de las Np-Ch por endocitosis mediada por BCR, es decir, ésta será específica, no se transfectarían todas las células sino solamente las que reconocen el antígeno. Lo que tomamos de este trabajo es que la sobreexpresión de Bcl-6 y Bcl-XL confiere una alta capacidad proliferativa, lo cual es alentador para nuestro trabajo. Sin embargo, ellos, observaron que había una activación policlonal, lo cual se podría resolver con nuestro abordaje.

Para la inmovilización de proteína en las Np-Ch, nos basamos en el método descrito por Khodaei et al 2018, en este trabajo inmovilizaron la proteína A de *Staphylococcus* (SpA) en el quitosán. Ellos al preparar las Np-Ch utilizaron quitosán al 2% comparado con el estandarizado por nuestro colaborador el Dr. Víctor Hugo Bermúdez que en su protocolo utiliza quitosán al 0.1%. Decidimos utilizar el quitosán al 2% ya que cuando se quiere que el quitosán se una a una DNA y también la proteína en su superficie, es necesario más grupos funcionales del quitosán para que se puedan unir más grupos funcionales de la proteína y el DNA. En el trabajo de Khodaei et al 2018 se evaluó la inmovilización de la proteína albúmina mediante dos enfoques diferentes, primero, el acoplamiento directo de la proteína en el quitosán mediante el uso de glutaraldehído, y en segundo lugar la funcionalización de los grupos amino del quitosán con tris (2-aminoetil) para producir restos de amino de doble ramificación seguido de la activación con glutaraldehído. Nosotros nos basamos en la utilización del glutaraldehído solamente, ya que el segundo método planteaba más dificultades.

En otros estudios inmovilizan proteína unida al quitosán, usando albúmina de suero bovino (BSA) para el desarrollo de nanopartículas de quitosán como un sistema de administración de medicamentos [16]. En el estudio de Katas et al 2013 se empleó quitosán de bajo peso molecular con alto grado de desacetilación (75-85%), para una mejor unión con la proteína, sin embargo no mencionan el porcentaje de eficiencia alcanzado. Por otro lado, en el trabajo reportado por Khodaei et al 2018 inmovilizan la proteína SpA a nanopartículas de quitosán, donde tuvieron una buena

eficiencia de unión (60%). Nosotros utilizamos estos trabajos como base, ya que para la estandarización se podía usar BSA por la accesibilidad a ella, y así tener un protocolo para empezar con SpA. Katas et al 2013 usaron el método de unión a quitosán al 0.1% con sulfato de dextrano (DS) al 0.05% con concentraciones de BSA de 0.2 mg/mL y 1 mg/mL, donde tuvieron mejor concentración de pegado a Np-Ch fue con la mayor concentración de proteína 1 mg/mL, comparado con nuestros resultados que la concentración de BSA en la que mejor se unía a la proteína a las Np-Ch que contenían DNA fue de 10 mg/mL, como se menciona en la parte de resultados, esto pudo ser por la presencia del DNA que ya tenían las Np-Ch. Es por ello que en nuestro trabajo la eficiencia fue baja cuando la nanopartícula contenía el DNA (gen Bcl-6) y esto se debe a que hay una competencia por los grupos funcionales del quitosán. Entonces, requerimos emplear una concentración mayor de quitosán para tener más grupos de unión.

Durante la preparación de Np-Ch con el método covalente se utilizó NaOH el cual ayuda a la desacetilación del quitosán, al trabajar con él se formaban grumos, así que decidimos quitar este paso y observar si afectaba en la preparación de Np-Ch. Nuestros resultados fueron los mismos aún eliminando ese paso del protocolo. Esto es a que el quitosán que se utiliza tiene un alto grado de desacetilación por ello no afecta si no hay una mayor desacetilación con el NaOH.

Una vez estandarizado el protocolo para la unión de la proteína BSA a Np-Ch que encapsulan DNA, se pretende prepararlas con antígeno en su superficie, es decir con la proteína A (SpA) para así transfectarlas en células B y corroborar que las Np-Ch transfieran su contenido en las células B. Esperamos que entren en mayor cantidad las Np-Ch con antígeno en su superficie, porque las células B reconocerían por medio de su BCR al antígeno, comparado con las Np-Ch que no tengan el antígeno en su superficie. Teniendo esto, podremos comparar la proliferación de las células B que contengan el constructo con Bcl-6 y las que tengan el vector vacío y probar la eficiencia de nuestra construcción. El desarrollo de este sistema de estimulación específica de antígeno podrá ser aplicado posteriormente para la activación de las células B y la generación de un centro germinal *in vitro*.

## Conclusiones y Perspectivas

En este trabajo se logró la amplificación del gen que codifica la proteína Bcl-6 y su clonación en el vector pIRES-EGFP, lo que permite la traducción de dos proteínas con un solo promotor, y que además tiene un gen reportero, la proteína EGFP. De esta forma permite comprobar de forma indirecta la transcripción de nuestro gen de interés.

En este trabajo se usaron por primera vez Np-Ch encapsulando el vector que codifica la proteína Bcl-6, factor fundamental para la reacción del centro germinal. Se estandarizó la unión de proteína en la superficie de Np-Ch, usando la proteína BSA, quedando 10 mg/mL como la concentración más ideal para la unión al quitosán. Puesto que antígenos unidos a membrana son más eficientes para inducir la activación de células B que los antígenos solubles, nuestras Np-Ch encapsulando el constructo de Bcl-6 y unidas a antígeno son un aporte fundamental en investigaciones posteriores para la reacción del centro germinal *in vitro*. Para la formación del centro germinal son fundamentales una variedad de células, citocinas y una matriz extracelular, así como también factores que determinen la diferenciación de células plasmáticas productoras de anticuerpos como es el factor Bcl-6. Por ello, nanotransportadores como lo son nanopartículas de quitosán encapsulando Bcl-6 facilitará que células específicas se activen y puedan diferenciarse en un fenotipo de centro germinal. En estudios anteriores han creado organoides de ratón para la reproducción del centro germinal *in vitro*, lo cual permitió el aislamiento de anticuerpos monoclonales específicos de antígeno (Kyung-Ho et al 2018). Sin embargo, una de las limitaciones de ese trabajo es que los mAbs de ratón necesitan pasar por un proceso de humanización. Por ello, mi perspectiva a futuro es la generación de un organoide inmune humano para imitar la reacción del centro germinal tomando en cuenta otros componentes del microambiente (células TFH, células dendríticas, matriz extracelular, etc) y no solo células B. Esto podría ofrecer un nuevo enfoque para comprender mejor la biología del centro germinal y la generación de anticuerpos monoclonales humanos.



## References

- [1] Abbas A. K Lichtman A.H. and Pober J. S. 8° Ed “*Cellular and Molecular Immunology*”, Sanunders-elsevier. (2004).
- [2] Pavón Romero, Lenin; Jiménez Martínez, Maria C.; Garcés Alvarez, Maria Eugenia. “*Inmunología molecular, celular y traslacional*”. Editorial Wolters Kluwer, Barcelona: 2016.
- [3] Rojas E. Oscar, “*Inmunologia (de memoria)*”. Editorial Panamericana, México 2017.
- [4] Dinis Pedro Calado (ed.), Germinal Centers: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1623, DOI 10.1007/978-1-4939-7095-7\_1, © Springer Science+Business Media LLC 2017.
- [5] 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.
- [6] Basso K., Dalla F.R., 2012, Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells, *immunological Reviews*, 247, 172–183.
- [7] 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.
- [8] Linn Fagerberg, Bjorn M. Hallstro, Per Oksvold y Caroline Kampf, 2018, Tejidos normales HPA RNA-seq, NCBI, tomado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=604>.
- [9] Karen L Bunting, and Ari M Melnick, New effector functions and regulatory mechanisms of BCL6 in normal and malignant lymphocytes, *ELSEVIER*, 2013, 25:339-346.
- [10] Huang CX, Melnick A. Mechanisms of action of BCL6 during germinal center B cell development. *Sci China Life Sci*, 2015, 58: 1226–1232, doi: 10.1007/s11427-015-4919-z.
- [11] Mark J. Kwakkenbos, Pauline M. van Helden, Tim Beaumont, and Hergen Spits. Stable long-term cultures of self-renewing B cells and their applicatios. *Immunological Reviews*, 2016, 270; 65-77.
- [12] Phan RT y Dalla-Favera R. The Bcl-6 proto-oncogene suppresses p53 expresion in germinal- centre B cells, *Nature*, 2004 Dec 2;432(7017):635-9.
- [13] Lee CH, et al. Regulation of the germinal center gene program by interferón (IFN) regulatory factor 8 / IFN consensus sequence binding protein. *J Exp Med* 2006; 203:63
- [14] Nanoparticle Vaccines Adopting Virus-like Features for Enhanced Immune Potentiation. Saborni Chattopadhyay, Jui-Yi Chen, Hui-Wen Chen, Che-Ming Jack Hu, 2017.06.09. doi: 10.7150/ntno.19796.
- [15] 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.

- [16] Development of Chitosan Nanoparticles as a Stable Drug Delivery System for Protein/siRNA Haliza Katas, Maria Abdul Ghafoor Raja, and Kai Leong Lam, August 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/146320>.
- [17] Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. Hai-Quan Maoa, Krishnendu Roya, Vu L. Troung-Leb, Kevin A. Janesa, Kevin Y. Lina, Yan Wanga, J. Thomas Augustb, Kam W. Leong. 18 November 2000.
- [18] Antigen-Loaded Upconversion Nanoparticles for Dendritic Cell Stimulation, Tracking, and Vaccination in Dendritic Cell-Based Immunotherapy. Jian Xiang, Ligeng Xu, Hua Gong, Wenwen Zhu, Chao Wang, Jun Xu, Liangzhu Feng, Liang Cheng, Rui Peng, and Zhuang Liu. *ACS Nano* **2015** 9(6), 6401-6411 DOI: 10.1021/acsnano.5b02014.
- [19] G J Silverman, M Sasano and SB Wormosley, "Age-associated changes in binding of human B lymphocytes to a VH3-restricted unconventional bacterial antigen", *J Immunol*, 1993.
- [20] Khodaei Simin, Ghaedmohammadi Samira, Mohammadi Mehdi, Rigi Garshasb, Ghahremanifard Parisa, Zadmard Reza, and Ahmadian Gholamreza, "Covalent Immobilization of Protein A on Chitosan and Aldehyde Double-Branched Chitosan as Biocompatible Carriers for Immunoglobulin G (Igg) Purification", *JCS*, 2018.
- [21] Febriana Catur Iswanti, Indah Nurulita, Samsuridjal Djauzi, Mohamad Sadikin, Arief Budi Witarto & Tomohiko Yamazaki (2019): Preparation, characterization, and evaluation of chitosan-based nanoparticles as CpG ODN carriers, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, DOI: 10.1080/13102818.2019.1578690
- [22] Shen Yulei, Ge Baosheng, Ramachandrareddy Himabindu, "Alternative splicing generates a short BCL6 (BCL6S) isoform encoding a compact repressor" Elsevier, 2008.
- [23] Kenichi Tahara, Makiko Takizawa, Arito Yamane, Yohei Osaki, Takuma Ishizaki, Takeki Mitsui, Akihiko Yokohama, Takayuki Saitoh, Norifumi Tsukamoto, Morio Matsumoto, Hirokazu Murakami, Yoshihisa Nojima and Hiroshi Handa, "Overexpression of B-cell lymphoma 6 alters gene expression profile in a myeloma cell line and is associated with decreased DNA damage response." *Cáncer Science*, 2017.
- [24] Bihui H. Ye, P. H. Rao, R. S. K. Chaganti, and Riccardo Dalla-Favera<sup>2</sup>, Cloning of bcl-6, the Locus Involved in Chromosome Translocations Affecting Band 3q27 in B-Cell Lymphoma<sup>1</sup>, *American Association for Cancer*, 1993.
- [24] Ariane C. Gomes, Mona Mohsen and Martin F. Bachmann, "Harnessing Nanoparticles for Immunomodulation and Vaccines", *vaccines*, 2017.
- [25] Schubert Max, Siham Agdour, Rainer Fische, Yvonne Olbrich, Helga Schinkel and Stefan Schillberg. A Monoclonal Antibody That Specifically Binds Chitosan In Vitro and In Situ on Fungal Cell Walls, *J. Microbiol. Biotechnol.* (2010).

[26] Kwakkenbos Mark J. Sean A. Diehl, Etsuko Yasuda, Arjen Q. Bakker, Caroline M.M. van Geelen, Michaël V. Lukens, Grada M. van Bleek, Myra N. Widjoatmodjo, Willy M.J.M. Bogers, Henrik Mei, Andreas Radbruch, Ferenc A. Scheeren, Hergen Spits and Tim Beaumont, "Generation of stable monoclonal antibody-producing BCR+ human memory B cells by genetic programming", *Nature medicine*, 2016.



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 el C. **QUINTO MANZANARES ROCÍO** con número de matrícula **20154010504** cuyo título es:

**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 antígeno-específicas.**

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 10 de agosto del 2020

Atentamente  
Por una universidad culta

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

**DRA. VERÓNICA NARVÁEZ PADILLA**  
**DRA. MARIA ANGÉLICA SANTANA CALDERON**  
**DRA. HILDA MINERVA GONZÁLEZ SÁNCHEZ**  
**DR. RAMÓN ANTONIO GONZÁLEZ GARCÍA-CONDE**  
**DR. IVÁN MARTÍNEZ DUNCKER RAMIREZ**

**PRESIDENTE**  
**SECRETARIO**  
**VOCAL**  
**PRIMER SUPLENTE**  
**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

**IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha:2020-08-10 12:08:35 | Firmante**

AZof/UHsEzHXIAvrTseibw40SayE5eVlslVg8NShSUCq8qTs6AaQEIN46j8avvQ8iLNVAsdr9do+uwfULt7kUHHz5hcaBBbu9f/LRTPxLowWV9NGr1lcqUm3tzg0Gn86UXPOsn5MKTxsX4w4dw1mUekUeXH1qozyB1Z7bjmlEwPlsfBa5G1QTGN02fcilv9lZZbqeLeYMQSATwmpKeddfB4pxSY6rww4MbePDx5dHA1P2YQ6U1wiz76zGSxwZaVDUoPjnY4QWE+sV7ghxin28UjUcLmnpUu9c3QTH9vmjFL39IU1/rnWtYtTctD4qsONS427GPZr0ddu84z+4muUQ==

**HILDA MINERVA GONZÁLEZ SÁNCHEZ | Fecha:2020-08-10 12:10:53 | Firmante**

P8PANmTfny4K8tMsjrzSzxy8fdFbSd9ahT/8pvRJ2UcwqWRitzNaz+MgbfqKNzmlc28CnBuwOQeCurB8Q0atrSnmL7o4rEf9jqNM1Eyc1xBzNAprz9M+FW3U8q369+xTxeXqXSulGyECfQcHyD+uk0WzEeHM8TSRRWIQCvUxA11SpOssE7LlV8DWr69f7hEb42BD4pVYM+YFD0DqUIV4YKomNRnNElGuVjdiYUdHNPpH87+c1Opa09+DvE8ZE2cWdp7izR3l85VvWtwjG8UUnYzywUl+AmCn/0j+3XDgWv7/pxyRqkr8rEftul+chHuXRaxQe6Y6WKEFzXO2MlhA==

**MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2020-08-10 12:18:24 | Firmante**

zqHEaHHzC8RwplA4XqpxJLrY1lwwRpuiNgCUzAyWmkpF8/Qn1JAraYDAVBLc6LucaV+tQDgfpE7zG4KRYGJ7QyKlONiGbDM51T2odvf8OY/kLHVlJzkyZfDmSVvdlZZ7qR1e5qjclty8ksQ43ti0DjkDWzUJ/jC4pwwB85rzW2yfp+8uOAZO13mc8FLYN1GF2g2We5j9ay9/xj5GA0SZxmshwNnnJalvbNodWockQupUTrkKUKXOFGeXeQ825Mgmz4ekASyblttiN2gSu0kXZUUnqP4I3Sklo/vaJ2t3Yg0n8+KqEX/vWgFh0UqLw9Zjcc48jQx8ESerq/t9yDg==

**VERONICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA | Fecha:2020-08-10 19:44:24 | Firmante**

bEoC/ekK3Y3Y0paPEI1A2xlGhMskcC85YS2mmQAOMJwflZ5Xkfa2plvGlu8FefoA3pIMzzNkQR9pPHG2/Fypmev+dwkJudY93BfBRTg9vzzxbaHrehDXwjBs76H6Ea+BUPvhIDhL7S5TlIXve9nlo9i99jzsEMBFLrTZERtrx6j4tMlKa7f/8Cz0BYwekSowKJvEByc8SzFMjRcmwe+Yw7XFoeAmSEuZyNSX3k4wjLT01bvzPVjRFC8WEAo+4VX/BNv5YJbH9QpG1YUtsostPYaxXHGUl5n3am7izCNPc2HU8l8lrkkTK/Sz7J/fmFqtVccPPM+xR6HDSIPu3w==

**RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE | Fecha:2020-08-12 20:32:03 | Firmante**

nBU+kOPZv4+FKdRAIJM1/LNp+9fFd0qiMY8vTZBLQa6/QWNYkxNg/sgemWgcMQwXg43OzJwwOPHSn6aWSq4j/s9oXnTW6oT2zQzup4rvnSm30D5O/LWcUqd+G3no9gWTKOsxeags5PXPpsXfzlhkZM/oqem3e8EQfLh4Y0YdtnVKQLdXculY6/2eth64X+qOzp4zTl9bdLz6YgfzvpMPtn7TeDzmX0pcEYNIe2kZ2ZohPHx1qzbTbutgTV2gC7gmu2v14zMhovbWFSn1KDqKf7cUQg3jh6dbRRiQJtmGvppzGr/KEihOmQ9+FHNSAQp/vxhBkv9b7kzUc2+aGV+y3Q==

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



R7mzln

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/l2xzebJWwEGNIqDhV3dDjhARjZlp1kBL>

