



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

“GENERACIÓN DE UN MÉTODO DE SELECCIÓN CLONAL ES-
PECÍFICO DE ANTÍGENO Y SU APLICACIÓN PARA LA IDEN-
TIFICACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA
EL SARS-COV-2”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

ROCIO QUINTO MANZANARES

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Hilda Minerva González Sánchez

CUERNAVACA, MORELOS

FEBRERO 2023

Jurado del examen profesional

Dr. Iván Martínez Duncker Ramírez

Presidente

Centro de Investigación en Dinámica celular

UAEM

Dra. Verónica Mercedes Narváez Padilla

Secretario

Centro de Investigación en Dinámica celular

UAEM

Dr. Víctor Hugo Bermúdez Morales

Vocal

Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas

INSP

Dr. Ramón Antonio González García-Conde

Suplente

Centro de Investigación en Dinámica celular

UAEM

Dra. María Angélica Santana Calderón

Suplente

Centro de Investigación en Dinámica celular

UAEM

Comité tutorial

Dra. Hilda Minerva González Sánchez

Directora de tesis

Centro de Investigación sobre enfermedades infecciosas

INSP

Dra. María Angelica Santana Calderón

Tutora de seguimiento y asesora

Centro de Investigación en Dinámica Celular

UAEM

Dr. Ramón Antonio González García-Conde

Asesor

Centro de Investigación en Dinámica Celular

UAEM

Dr. Víctor Hugo Bermúdez Morales

Asesor

Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas

INSP

Dra. Andrea Lina Rivillas Acevedo

Asesora

Centro de Investigación en Dinámica Celular

UAEM

Créditos Institucionales

Esta tesis se llevó a cabo en el laboratorio 1 planta baja del centro de investigación sobre enfermedades infecciosas en el Instituto Nacional de Salud Pública, bajo la dirección de la Dra. Hilda Minerva González Sánchez. Este trabajo fue financiado por el International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (CRP/MEX20-04_EC).

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado.

Agradezco a la Dra. Hilda Minerva González Sánchez por aceptarme como su estudiante de Maestría, por guiarme en todo momento, por su valioso tiempo y dedicación en mi proyecto de Maestría, le agradezco su apoyo y su paciencia durante todo este tiempo.

Agradezco al Dr. Jesús Martínez Barnetche por darme la oportunidad de hacer mi proyecto de tesis de Maestría en su laboratorio.

Agradezco al Dr. Juan Téllez, por su gran apoyo y consejos en el laboratorio.

Agradezco al Dr. Humberto Valdovinos, la Dra. Tina Godoy, la Biól. Sara Bahena y a M.Sc. Edgar Aguilar por sus consejos en cada seminario.

Agradezco al Dr. Arturo Galván Hernández por su valioso tiempo al analizar e interpretar resultados presentados en este trabajo.

Agradezco a la Biól. Erika Isabel Melchy Pérez por su valioso tiempo en la asesoría del uso del Citómetro de Flujo. Así como de su ayudantía para el análisis de muestras.

Agradezco a la Dra. Alba Neri Lecona por su ayuda en el procesamiento de muestras por MET.

Agradezco a mi comité tutorial la Dra. Santana, Dr. Ramón González, Dr. Víctor Bermúdez, por los consejos y aportaciones durante todo mi proyecto.

Agradezco a mi madre Julieta Manzanares por su apoyo incondicional, su amor y su paciencia. A mi padre Cutberto Quinto por sus sabios consejos por darme el mejor regalo, creer en mí.

Agradezco a mi esposo Luis Manuel Hernández por ser el apoyo perfecto para mi vida y por estar siempre conmigo.

Agradezco a Dios y a la vida por darme la fuerza y el valor de culminar esta etapa.

Resumen

El sistema inmune tiene la capacidad de responder a una amplia variedad de antígenos al generar un amplio repertorio de receptores de células B (BCR). Sin embargo, la generación de anticuerpos de alta afinidad y alta capacidad neutralizante requiere de la formación de centros germinales (CG) en un proceso dependiente de antígeno y de células T. Los CG son regiones sub-anatómicas en donde las células B que reconocen al antígeno, se activan, proliferan y diferencian a células plasmáticas productoras de anticuerpos o a células de memoria de vida larga. Estas estructuras son elementales para la eficacia de la respuesta humoral y para generar memoria inmunológica para la defensa contra los patógenos. Por lo tanto, la generación de CG *in vitro* brinda una oportunidad para favorecer la generación de anticuerpos antígeno específico contra patógenos. Por otro lado, un factor de importancia para la generación de CG *in vitro* es favorecer las condiciones que permitan una adecuada estimulación y selección de células B específicas. El objetivo de este trabajo fue la generación de un método de selección clonal específico de antígeno, de SARS-CoV-2 para células B humanas, que permita la producción de anticuerpos contra el virus. La estrategia experimental fue generar nanopartículas de quitosán (Np-Ch) encapsulando un vector codificante para el gen Bcl-6 (regulador maestro de la reacción de CG) y acopladas a antígeno específico de SARS-CoV-2, para activar a células B humanas aisladas de sangre periférica. Se generaron Np-Ch empleando como antígeno el dominio de unión al receptor ACE2 recombinante (RBD) de SARS-CoV-2, así como Np-Ch que contenían proteína A de *Staphylococcus aureus* y Np-Ch conjugadas con albúmina de suero bovino como control positivo y negativo, respectivamente. Se caracterizó la forma, tamaño y carga de todas las preparaciones generadas. Independientemente de su contenido, las nanopartículas (Np) tenían una forma esférica uniforme, con diámetros promedio entre 118 nm a 224.5 nm con carga negativa. La evaluación *in vitro* se realizó en presencia de células B aisladas de voluntarios recuperados de COVID-19 para su estimulación. Empleando Np-Ch conjugadas con isocianato de fluoresceína (FITC), evaluamos si éstas se unían o se incorporaban a las células B determinando la proporción de células B FITC⁺ a diferentes tiempos y concentraciones. Evaluamos

la viabilidad, la producción de IgG total e IgG específicas de antígeno, así como la presencia de células secretoras de anticuerpos anti-RBD en células estimuladas con las Np-Ch y las comparamos con la estimulación con el antígeno monovalente y soluble. Se determinó que: 1) la presencia de Bcl-6 en las Np-Ch aumentó la viabilidad de las células B estimuladas; 2) la estimulación con el antígeno multimerizado en Np-Ch tiende a incrementar la proporción de anticuerpos anti-RBD, y consecuentemente, una mayor concentración de anticuerpos monoclonales específicos en comparación con el antígeno soluble. Concluimos que el método de selección clonal específico de antígeno presentado en este trabajo es una estrategia prometedora para la expansión selectiva de células B y para la identificación de anticuerpos contra diversos patógenos.

PALABRAS CLAVE: nanopartículas, linfocitos B, centros germinales, RBD de SARS-CoV-2, anticuerpos monoclonales.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	10
Pandemia por COVID-19 e intervenciones basadas en inmunoterapia pasiva.	10
Los anticuerpos de alta afinidad se generan en los centros germinales.	11
Bcl-6, regulador maestro de los CG	13
Presentación del antígeno: elemento clave para una reacción de CG eficiente.....	14
Las nanopartículas son eficaces para la presentación antigénica.	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	17
ANTECEDENTES	18
JUSTIFICACIÓN	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVO GENERAL	25
METODOLOGÍA	26
1. Preparación de las nanopartículas.	26
1.1 Purificación de la construcción de pIRES2-EGFP/Bcl-6.	26
1.2 Generación de nanopartículas de quitosán.	26
2. Caracterización de las nanopartículas.....	27
2.1 Eficiencia de unión de proteína.	27
2.1.1 Ensayo de BCA.....	28
2.1.2 SDS-PAGE.	28
2.2 Tamaño y forma de las nanopartículas por microscopía electrónica de transmisión (MET).	29
2.3 Carga superficial de nanopartículas de quitosán.	30
3. Obtención de células B derivadas de pacientes recuperados de COVID-19.31	
3.1 Obtención de muestras sanguíneas de voluntarios.	31
3.1.1 Reclutamiento de voluntarios.	31
3.1.2 Toma de muestras de sangre.....	31
3.2 Obtención de muestras procedentes de buffy coats.....	32
4. Análisis de anticuerpos anti-RBD por ELISA.	32

5.	Separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).	33
5.1	Separación de células a partir de tubos CPT.	33
5.2	Separación de células a partir de Buffy Coats.	33
6.	Purificación de células B empleando perlas magnéticas.	34
7.	Ensayos de incorporación de Np-Ch en células B.	35
7.1	Preparación de Np-Ch acopladas a fluoresceína.	35
7.2	Análisis de la incorporación de Np-Ch en células B por citometría de flujo.	35
7.3	Microscopía Confocal	36
8.	Análisis de viabilidad de las células B en presencia de Bcl-6.	36
9.	Estimulación <i>in vitro</i> de células B con RBD/Np-Ch	37
10.	Detección de anticuerpos liberados por células B.	38
10.1	ELISA IgG total en sobrendantes de cultivo.	38
11.	Detección de células productoras de anticuerpos.	38
	RESULTADOS	42
	DISCUSIÓN	65
	CONCLUSIONES	74
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
	ANEXOS	82

INTRODUCCIÓN

Pandemia por COVID-19 e intervenciones basadas en inmunoterapia pasiva.

La pandemia actual de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) causada por el coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave tipo 2 (SARS-CoV-2) ha generado alarma mundial debido a su alta morbilidad y mortalidad. Al no existir tratamientos específicos, al inicio de la pandemia, la administración de suero de pacientes convalecientes surgió como una opción para la prevención y el tratamiento de la enfermedad COVID-19. Una alternativa al suero convaleciente es la identificación y la producción recombinante de anticuerpos monoclonales (mAbs) neutralizantes contra el SARS-CoV-2, basando el tratamiento en el mismo principio de inmunoterapia pasiva.

Los anticuerpos neutralizantes son un componente clave de la inmunidad protectora para la mayoría de las enfermedades virales (Marovich et al., 2020), aquellos neutralizantes contra SARS-CoV-2 tienen potencial para aplicaciones tanto terapéuticas como profilácticas y pueden guiar el diseño y desarrollo de vacunas (Marston et al., 2018a). Avances significativos en el descubrimiento de anticuerpos neutralizantes humanos han dado como resultado el desarrollo de inmunoterapia con posible aplicación clínica para pacientes con COVID-19. Diversas técnicas como la clonación de genes de anticuerpos, la tecnología de hibridomas, la inmortalización de células B, el despliegue de fagos, los ratones transgénicos con inmunoglobulina humana y la secuenciación de células B individuales, han sido utilizadas con este fin (Casadevall & Pirofski, 2020) Durante la pandemia de COVID-19 en curso, la mayoría de los anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2 se han obtenido mediante la secuenciación de células B individuales (Chen et al., 2023). Además, la inmunización con proteínas RBD o con la proteína Spike (S), así como la infección directa de ratones con el sistema inmunitario humanizado genéticamente también pueden generar anticuerpos neutralizantes humanos completos contra SARS-CoV-2 (Hansen, J. 2020).

La mayoría de los anticuerpos monoclonales neutralizantes contra SARS-CoV-2

se dirigen al dominio RBD de la proteína S, lo cual evita que el virus entre en contacto con el receptor ACE2 (Ju et al., 2020; Pinto et al., 2020).

Algunos de los mAbs contra SARS-CoV-2 que ha recibido autorización de la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos para su uso en humanos son bamlanivimab / etesevimab, casirivimab/imdevimab (REGEN-COV), sotrovimab y bebtelovimab, así como tixagevimab / cilgavimab (Evusheld) para la profilaxis previa a la exposición (Marston et al., 2018b). Sin embargo, debido a que las nuevas variantes como ómicron y algunas de sus subvariantes se han vuelto resistentes a los mAbs, todas las autorizaciones de uso de emergencia han sido revocadas. Entre los mAbs que están en desarrollo se encuentra IBIO123 que es una combinación de tres mAbs dirigidos a dominios diferentes y más estables en la proteína S (incluida la hélice del tallo potencialmente menos mutable) fabricado por Immune Biosciences; y el mAb Regdanvimab dirigido contra RBD de la proteína S, el cual se encuentra en fase clínica 3 (Strohl et al., 2022). Una revisión de Cocharane concluyó que el Regdanvimab puede reducir el riesgo y hospitalización o muerte en pacientes con COVID-19 de leve a moderado (Kreuzberger et al., 2021).

Los anticuerpos de alta afinidad se generan en los centros germinales.

El sistema inmune tiene la capacidad de responder a una amplia variedad de antígenos al generar un repertorio de receptores de antígeno de células B (BCR) mediante recombinación VDJ en células B en desarrollo, de una manera independiente del antígeno. Sin embargo, el ambiente necesario para la generación de mAbs de alta afinidad requiere la formación de centros germinales (CG). Los CG 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 (Calado, 2017). Estas estructuras se forman solo en respuesta a los

antígenos y son elementales para la eficacia de la respuesta humoral y la formación de memoria inmunológica y, en consecuencia, para la defensa contra los patógenos. Los CG se producen entre 4 y 7 días después del inicio de una respuesta del linfocito B dependiente de linfocitos T al antígeno. 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 frente al antígeno (Figura 1). Dentro de cada CG se distinguen dos regiones, una zona oscura (DZ) llena de un cúmulo denso de linfocitos B que proliferan y se les conoce como centroblastos; y una zona clara (LZ) donde los linfocitos B (aquí llamados centrocitos), interactúan con el antígeno presentado por las células dendríticas foliculares (CDF), (Gars et al., 2020) Tras su interacción con las células B, las CDF liberan citocinas como IL-6 y BAFF, mientras que el antígeno es reconocido por el BCR específico. La célula B también interactúa con el linfocito T cooperador folicular (TFH), el cual libera citocinas como interleucina (IL)- 21 e IL-4, y reconoce al antígeno por medio de su receptor específico de células T (TCR), (Gars et al., 2020; Nojima et al., 2011).

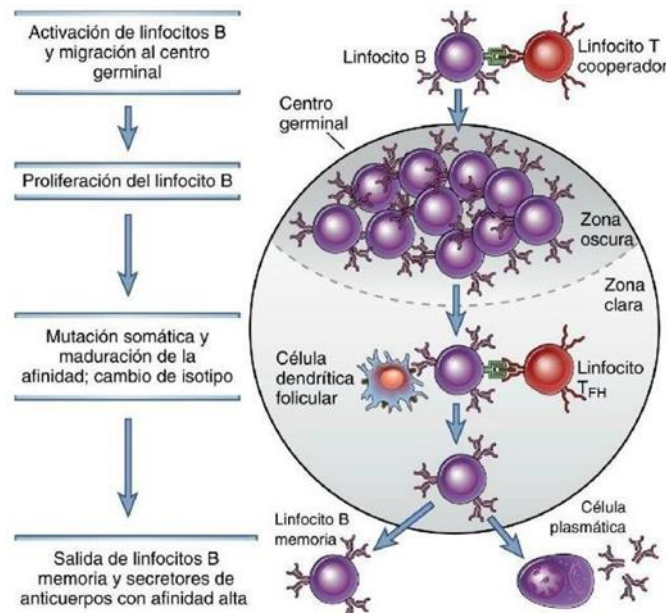


Figura 1. Reacción del centro germinal. Los linfocitos B activados migran al folículo y proliferan, formando la DZ del CG, estos linfocitos B sufren un cambio de isotipo extenso e hipermutación somática de los genes V de Ig y migran hacia la LZ donde se encuentran con las células dendríticas foliculares que presentan el antígeno y con los linfocitos T

cooperadores foliculares. Se seleccionan a los linfocitos B con los receptores Ig de afinidad más alta para que sobrevivan y se diferencien en linfocitos secretores de anticuerpos o linfocitos B de memoria. Las células secretoras de anticuerpos salen y residen en la médula ósea en forma de células plasmáticas de vida larga y los linfocitos B de memoria entran en la reserva linfocítica recirculante (modificado de Abbas, 2015).

El fenotipo linfocitario incluye diferentes marcadores específicos de linaje en la superficie de la membrana celular, entre los marcadores comúnmente utilizados para la identificación de los linfocitos B humanos se encuentran CD19 y CD20, mientras que el fenotipo del pre-CG se identifica por la expresión de CD38 en ausencia de CD27, el fenotipo de las células B del CG es CD38⁺ CD27⁺, y para plasmablastos es CD38⁺⁺⁺ CD27⁺ (Wagar et al., 2021).

Bcl-6, regulador maestro de los CG

Una pieza fundamental 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). En particular, Bcl-6 se expresa en células B de CG pero no en otro tipo de células B (Bunting & Melnick, 2013). 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. La regulación positiva de la expresión de Bcl-6 es esencial para el inicio de la reacción del CG, ya que las células B precursoras del CG deficientes en Bcl-6 no logran ingresar al folículo (Bannard et al., 2013). Las funciones biológicas de Bcl-6 incluyen facilitar la rápida proliferación y tolerancia del daño genómico que ocurre durante la expansión clonal y la hipermutación somática. Bcl-6 además regula la expresión de la enzima desaminasa inducida por activación (AID), responsable del cambio de isotipo y del proceso de hipermutación somática e inhibe la expresión del gen PR /SET dominio 1 (PRDM1), que es crucial para el desarrollo de células plasmáticas (Basso & Dalla-Favera, 2012). Por lo tanto, la expresión de Bcl-6 es uno de los factores determinantes para que una célula B activada se convierta en una célula plasmática o una célula de memoria (Basso & Dalla-Favera, 2012) y es de suma importancia considerarlo en la generación de CG *in vitro*.

Presentación del antígeno: elemento clave para una reacción de CG eficiente.

En los CG, una densa red de CDF muestra antígenos que son reconocidos por las células B con un BCR específico. La interacción BCR de alta afinidad es un factor determinante en la eficiencia de la reacción CG, ya que promueve señales de supervivencia más fuertes que hacen que las células B específicas de antígeno sean más capaces de competir por las señales de THF (Figura 2). Por ello, 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 (Chattopadhyay et al., 2017).

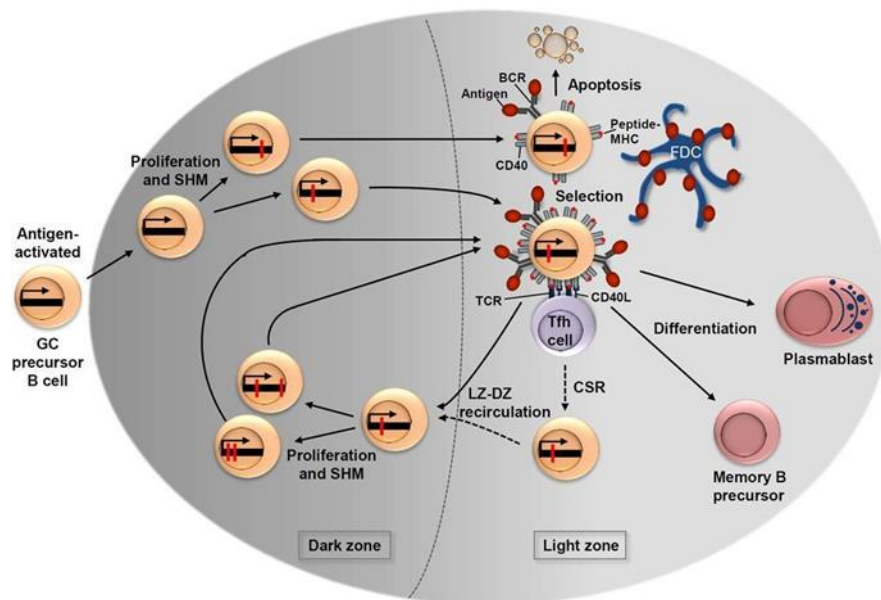


Figura 2. Dinámica de la reacción de CG y selección de mutantes de anticuerpos de alta afinidad. El CG maduro se caracteriza por la presencia de la DZ y la LZ. Durante la proliferación de las células B, el proceso de hipermutación somática (SHM) introduce cambios de pares de bases en la región VDJ de los genes de la región variable de inmunoglobulina (IgV, puntos rojos). Entonces las células B de la DZ con su BCR mutado se mueven hacia la LZ. Entre las células B de la LZ que expresan mutantes de BCR (resultantes de la SHM), una mayor afinidad BCR se asocia directamente con una mayor captura de antígeno. Esto a su vez conduce a una mayor densidad de complejos péptido- MHC presentados en la superficie de la célula B. Por otro lado, las células B de la LZ recién generadas que expresan un anticuerpo desfavorable, se vuelven incapaces de capturar suficiente antígeno y sufren apoptosis. La recirculación entre la LZ y LA DZ facilita varias rondas iterativas de mutación y selección, y en poco tiempo conduce la generación de células B de memoria de alta afinidad y células plasmáticas (De Silva & Klein, 2015).

Las interacciones multivalentes promueven la agrupación y señalización del BCR

y facilitan la internalización del antígeno mediada por el receptor. La interacción con el antígeno permite la señalización a través del BCR y su captación en un proceso llamado endocitosis mediada por BCR. En este proceso 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 THF por medio del TCR (Figura 3) (Abbas, 2004).

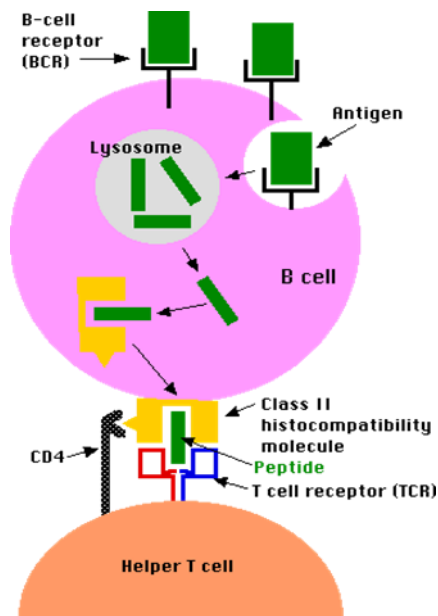


Figura 3. Endocitosis mediada por receptor. Las células B reconocen al antígeno por medio del BCR, lo endocitan, y es llevado al lisosoma para su degradación a péptidos. Estos péptidos son rpresentados por el MHC-II al TCR de la célula T cooperadora (Tomado de Kimball, 2022).

Las nanopartículas son eficaces para la presentación antigénica.

Se ha encontrado que la presentación de antígenos en nanopartículas mejora las respuestas de anticuerpos al inducir una agrupación eficiente de BCRs (Chattopadhyay et al., 2017). Estudios de inmunización de ratones con Np han demostrado su mayor eficacia en comparación con los antígenos solubles (Kanekiyo et al., 2019; Korangath et al., 2020) y su capacidad para transportar moléculas co-estimuladoras (Zilker et al., 2017). Además, la estimulación de las células B de ratón *in vitro* con microperlas magnéticas unidas a CD40L y empleando un antígeno multimérico mejoró la proliferación de células B e indujo la

expresión de fenotipos de CG (Roh et al., 2018). Entre los diversos materiales que se utilizan para la generación de Np, se encuentra el quitosán, el cual es un polímero biocompatible, biodegradable y de baja toxicidad. El quitosán puede formar películas, hidrogeles, andamios porosos, fibras, micro y Np en condiciones y medios ácidos suaves (Elvira Pujalte, 2001), por ello, las nanopartículas de quitosán (Np-Ch) pueden ser una alternativa inocua para acoplar el antígeno y la estimulación a linfocitos B para favorecer su activación e inducción de anticuerpos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Una nueva variante de coronavirus se propagó en Wuhan, China, en diciembre del 2019. Este virus fue denominado SARS-CoV-2, ya que está genéticamente relacionado con el virus SARS-CoV perteneciente a la misma familia y causante del síndrome respiratorio agudo severo que tuvo un brote en China en 2002-2003 (Brüssow, 2020). Este virus ha planteado graves amenazas para la salud mundial y la economía. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en enero del 2023 determinó que la infección por SARS-CoV-2 ha provocado 665 millones de casos de COVID-19 confirmados y 6.71 millones de muertes en todo el mundo (OMS, 2023). En la actualidad existen vacunas contra el SARS-CoV-2, sin embargo, el enfoque es preventivo, no detienen la infección por este virus. Así mismo, se desconoce la eficacia de las vacunas a largo plazo y su actividad contra nuevas variantes del virus. Por ello, debemos considerar otras opciones terapéuticas y profilácticas como la investigación y el desarrollo de mAbs neutralizantes humanos.

Un método que ha sido propuesto para la producción e identificación de mAbs es a través de la estimulación *in vitro* de linfocitos B, lo cual puede lograrse mediante diferentes protocolos. Un factor de importancia para la generación de CG *in vitro* es lograr una adecuada estimulación y selección de células B específicas. La administración de agentes estimulantes de forma soluble en el medio de cultivo induce la activación de células B con diversas especificidades. Por ello, proponemos la generación de un método de estimulación antígeno-específico que permita la propagación selectiva de los linfocitos B de interés. Este método de selección clonal está basado en generar Np recubiertas de antígeno y conteniendo señales de co-estimulación para los linfocitos B, con el objetivo de estimular la formación de CG *in vitro*. Esto nos lleva a plantearnos la siguiente pregunta de investigación: ¿la aplicación de un método de selección clonal basado en Np-Ch unidas a un antígeno de SARS-CoV-2 aplicadas en un cultivo de células B humanas permitirá la activación y expansión selectivas de las células B y la generación de anticuerpos contra SARS-CoV-2.

ANTECEDENTES

Una variedad de protocolos han sido descritos para la proliferación de las células B, así como su diferenciación hacia células plasmáticas y células de memoria *in vitro*. En estos modelos, células B humanas o murinas son estimuladas con citocinas como IL-4, IL-21 y CD40L, añadidas al medio de cultivo. 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 (Kwakkenbos, 2010). Los principales hallazgos y los protocolos empleados para los modelos de CG *in vitro* se resumen en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Protocolos reportados para la estimulación de células B de memoria humanas y plasmáticas *in vitro*.

Modelo humano				
Referencia	Fuente de células B y aislamiento.	Estímulo	Protocolo	Resultados
Kim 2022 Biomaterials	Amígdala	FGF-2 FGF-10 R-spondin-1 (RSPO1).	Formación de organoides con matrigel. 6X10 ⁴ células epiteliales de las amígdalas.	Remdesivir suprimió el número de copias de RNA viral intracelular. Organoides de amígdala desarrollaron estructuras epiteliales estratificadas a los días 10 y 15.
Waggar 2021 Nat Med	Amígdala	BAFF Anti-CD40 IL-4 IL-21	1.6x10 ⁴ células. Organoides 7 días de estimulación.	-Sistema organotípico funcional con fenotipo de CG. - Transición temprana a un fenotipo pre-CG.
Schmidt 2020 EBioMedicine	Amígdalas faríngeas	CD40L Super antígeno (Cytostim). IL-4	1.4x10 ⁶ células/pozo. P96. 8 µg/ml de anti-CD40L. 8 µg/ml de anti-CD40L. 20 ng/ml de rhIL-4.	-El bloqueo de CD40L reduce las células B del CG. - La inhibición de JAK reduce la expresión de Bcl-6.
Franke 2020 Cells	-PBMCS de sangre periférica humana. -Utilizando leucoferesis bajo el IRB de Hemacare.	R848 IL-2 Anti-CD40 IL-4 IL-21	2X10 ⁶ Células /mL en P24. Durante 5 días 1 µg/mL R848 10 ng/mL IL-2 1 µg/mL Anti-CD40.	IL-21 junto con Anti-CD40 e IL-4 constituyen una estimulación policlonal para la producción de anticuerpos de células

			30 ng/mL IL-4. 50 ng/mL IL-21.	B de memoria. Mientras que R848 e IL-2 lo hace a partir de células Naive.
Kwakkebos 2010 Nat Med	-Sangre periférica, amígdala. -Selección positiva, células de memoria	CD40L IL-4 IL-20 IL-21	Tansfección de Bcl-6 y Bcl-XL a células de memoria. 2x10 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 observó cambio de isotipo, y baja frecuencia de hipermutación somática. La transfección disminuyó la producción de IgG. Las células transfectadas sobreviven varios meses.
Cao 2010 J. Imm Meth	Sangre periférica, médula ósea, amígdalas. Aislamiento células B con el Kit II Miltenyi.	CD40L IL-21 CpG Células no B.	Células B 3x10 ⁵ . Células no B 5.7 x10 ⁶ . CD40L 500 ng/mL. IL-21 50 ng/mL. CpG 6 µg/mL. Incubación de 3 a 6 días.	Diferentes fuentes/localización de células B específicas (TT+ encontrados en amígdalas)
Traggiai 2004 Nat Med	Sangre periférica. 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 immortalizaron con EBV. El uso de sangre periférica de un paciente con SARS permitió la recuperación de Abs neutralizantes.
Pound 1997 Blood	Células B humanas de amígdala.	IL-4 IL-3 IL-6 IL10	20 ng/mL de citoquinas. Células B: 10 ⁶ cel/mL.	IL-2 estimuló la síntesis de DNA de células B del CG.
Arpin 1995 Science	Amígdalas	IL-2 IL10	Células B 25 000. 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 2. Protocolos reportados para la estimulación de células B de memoria murinas y plasmáticas *in vitro*.

Modelo murino				
Referencia	Fuente de células B y aislamiento.	Estímulo	Protocolo	Resultados
Kramer 2022 Adv. NanoBio-med Res	células B Naive aisladas de ratones negros C57BL/6J de 6 a 12 semanas de edad. Selección negativa, Miltenyi.	IL-4 L-21 CD40L BAFF	Células B Naive 2×10^5 /pozo. P24 En el día 3 se reemplazó IL-4 por IL-21. CD40L en microesferas. 100 ng/mL	Liposomas de 50-800 nm. Mayor proliferación celular con antígeno unido a liposomas que con el antígeno soluble.
Purwada 2019 Biomaterials	Bazos de ratones C57BL/6. Cell Isolation Kit de Stem Cell Technologies.	IL4 Anti- FAS Antígeno NP. BAFF	Tejido sintético con 7.5% PEG-MAL.	Co-cultivo 2D mostró distribución mas escasa de Células B.
Robinson 2019 Immunol Cell Biol	Células B de Bazo de ratón C57BL/6.	BAFF IL-4 IL-21 Anti CD40	8×10^4 células B /pozo. P6. 1 ng/ml IL-4 1ng/ml IL-21 Anti CD40 2 ug/ml.	Fenotipo de células B activadas. IL-21 aumento la proliferación celular. IL-4 e IL21 generaron células B del CG.
Roh, 2018 Biomaterials.	Sangre periférica, bazo. Selección negativa, Miltenyi	CD40L IL-4 BAFF IL-21 Antígeno	Células B Naive 10^5 /pozo. CD40L (100 ng/mL)	CD40L funciona mejor que anti-CD40. Perlas unidas a CD40L y antígeno (Ag) unido a perlas son mejores que el Ag soluble.
Purwada 2017 ACS Biomaterials	Células B Naive de bazo de ratón. Selección negativa, EasySep Mouse B Cell Isolation kit.	Hidrogel IL-4 Células estromales con CD40L. BAFF	Organoides de hidrogel sintético 7.5 % PEGMAL, funcionalizados con péptidos. 10 ng/mL IL-4	Las células B expresaron la integrina $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$. Organoides a base de hidrogel.
Abbott 2016 J Immunol	Ratones hembra C57BL/6J. Esplenocitos separación con Ficoll.	Inmunización con Hidróxido de aluminio. IL-4 Anti-CD40	P24 0.1×10^6 cel/mL anti-CD40 2.5 ug/mL. IL-4 10 ng/mL.	En condiciones hipóxicas se aceleró el cambio de clase y la formación de células plasmáticas y aumento la expresión de GL-7.
Purwada 2015 Biomaterials	Bazo. 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 mejor que 2D. RGD promueve la supervivencia celular a largo plazo.
Nojima 2011 Nat Comm	Bazo Sistema iMag (BD).	CD40L BAFF IL-4 IL-21	Células B Naive 5×10^5 . Células 40LB 3×10^6 .	IL-21 acelera la proliferación de células B de CG y la diferenciación parcial a

			IL-4 1 ng/mL. IL-21 10 ng/mL	plasmablastos.
--	--	--	---------------------------------	----------------

Por otro lado, 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* (Bravo, 2018). Sin embargo, al igual que en otros modelos, se encontró elevada activación policlonal. 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. Durante mi tesis de licenciatura realicé experimentos preliminares para la generación de este método. Se prepararon Np-Ch por el método de gelificación ionotrópica, el cual consiste en la mezcla de dos fases acuosas, una que es el polímero del quitosano y la otra un poli-anión que es el tripolifosfato de sodio (TPP). Esta técnica nos permite producir sistemas poliméricos múltiples, generalmente de forma esférica. De esta forma, las Np-Ch se prepararon encapsulando un vector codificante para Bcl-6. El represor transcripcional Bcl-6 se amplificó a partir de una muestra de amígdala humana, purificando el mRNA y empleando un kit de one-step PCR. Se clonó en el vector pIRES2-EGFP y la construcción se transfectó en células HEK-293T para corroborar indirectamente la expresión de Bcl-6 mediante la expresión de EGFP. Después se estandarizó el método de unión de proteína, utilizando albúmina de suero bovino (BSA) y utilizando como entrecruzador TPP, el cual se une a los grupos del quitosán y con residuos de aminoácidos de la proteína. La eficacia de unión se evaluó mediante electroforesis de proteínas en geles de acrilamida y mediante ensayos de ácido bicinonínico (BCA). Además, se prepararon complejos de quitosán con DNA, y proteína, utilizando como antígeno la proteína A de *Staphylococcus aureus* (SpA), el cual es un super antígeno que activa alrededor del 30-50% de las células B debido a que se une a regiones estructurales conservadas a las células del clan VH3 de las inmunoglobulinas (Silverman &

Goodyear, 2002), por lo cual se preparó como control positivo. En la figura 4 se resumen estos experimentos.

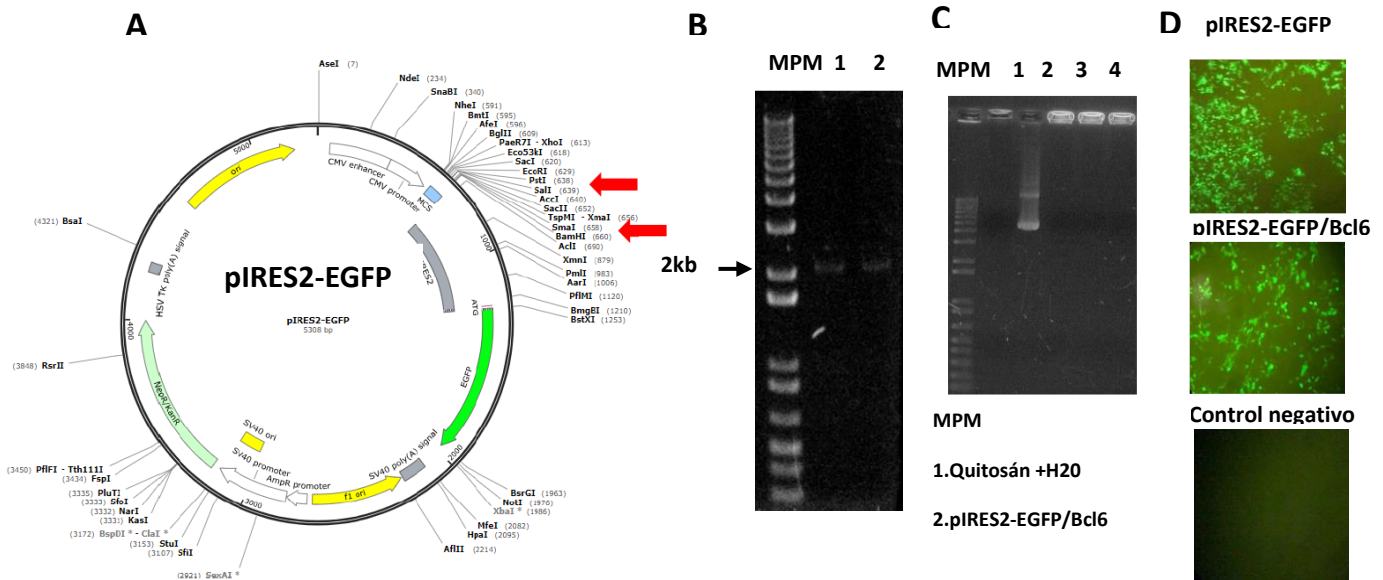


Figura 4. Bcl-6 es expresado por el constructo pIRES2-EGFP/Bcl-6. A. Vector pIRES2-EGFP, que contiene una secuencia IRES downstream del sitio de clonación múltiple y el gen reportero EGFP, bajo control del promotor de citomegalovirus. Las flechas señalan el sitio de inserción de Bcl-6. **B.** Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación (DNA) de Bcl-6 a partir de una muestra de amígdala humana (2 kb). **C.** Encapsulamiento del constructo pIRES2-EGFP/Bcl-6 y del vector vacío en Np-Ch. El quitosán y los complejos de DNA-quitosán no migran durante la electroforesis. **D** Transfección del constructo pIRES2-EGFP / Bcl-6 y el vector vacío en células HEK-293T observadas por un microscopio de fluorescencia a las 48 h posteriores a la transfección.

En el presente trabajo los complejos de Np-Ch que contienen el vector codificante para Bcl-6 unidos a proteína, se evaluaron en un cultivo de células B, comparando la proliferación de las células con complejos que contengan Bcl-6 contra vector vacío, así como también con antígeno y sin antígeno para verificar la eficacia del método de selección clonal.

Entre los diversos mAbs neutralizantes contra SARS-CoV-2, se han identificados anticuerpos que se unen al dominio N-terminal (NTD), a RBD o a ambos en la

subunidad S1, así como anticuerpos dirigidos contra las regiones hélice del tallo y al péptido de fusión en la subunidad S2 (Chen et al., 2023; Montgomerie et al., 2023). La mayoría de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 descubiertos hasta la fecha se dirigen a RBD, este dominio contiene 193 residuos de longitud y seis de sus residuos (Leu-445, Phe-486, Gln-494, Ser-494, Asn-501 y Try-505) son cruciales para la interacción de la proteína S con ACE2 como receptor (Hussain et al., 2020). En nuestro caso, optamos por el empleo de RBD como antígeno, dadas las probabilidades de que los anticuerpos dirigidos contra esta región sean neutralizantes y por la disponibilidad de la proteína.

JUSTIFICACIÓN

Los mAbs son ampliamente utilizados en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas, autoinmunes y neoplásicas. Su aplicación se extiende a la investigación, siendo empleados para la detección y cuantificación de varias moléculas. La generación de un método que permita reproducir la reacción del CG humano donde se formen y seleccionen los mAbs para el tratamiento de enfermedades ofrece un potencial invaluable. Este modelo será útil para aumentar la comprensión de la biología de las células B y la memoria inmunológica y sobre todo contribuirá al desarrollo de mAbs con potencial terapéutico. Sin embargo, un factor importante en el diseño y generación de CG, es la activación policlonal generada por la estimulación *in vitro* de las células B, por lo que se requiere del desarrollo de métodos que permitan la estimulación y selección de células B específicas. Además, en el contexto de la actual pandemia de COVID-19 usaremos un antígeno del SARS-CoV-2 para identificar mAbs humanos contra el SARS-CoV-2 para generar una opción de prevención y tratamiento de la enfermedad. Por otro lado, conocidas las características de los antígenos multivalentes para inducir una respuesta inmune más robusta, proponemos el diseño y aplicación de un método de selección antígeno-específico que mejore la presentación antigénica y multimerización de un antígeno en Np. Al mismo tiempo, aprovechando el proceso de endocitosis asociada al reconocimiento de BCR, las Np pueden ser utilizadas como nanoacarreadores para un vector codificante de Bcl-6 para estimular la diferenciación de las células al fenotipo de CG.

HIPÓTESIS

La aplicación de un método de selección clonal específico de antígeno en un cultivo de células B humanas permitirá la activación y expansión selectivas de células B, así como la generación de mAbs contra el antígeno de interés (RBD de SARS-CoV-2).

OBJETIVO GENERAL

Generar un método de selección específico de antígeno para células B humanas que permita la producción de anticuerpos contra SARS-CoV-2.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1)** Generar y caracterizar nanopartículas de quitosán conjugadas con un antígeno de SARS-CoV-2 y un plásmido codificante para Bcl-6 (RBD/Np-Ch/Bcl-6).
- 2)** Evaluar la incorporación de las nanopartículas conjugadas a antígeno en células B específicas.
- 3)** Comparar la eficacia en la generación de anticuerpos contra SARS-CoV-2 entre células B estimuladas con las nanopartículas RBD/Np-Ch/Bcl-6 y con el antígeno soluble.

METODOLOGÍA.

Objetivo 1. Generar y caracterizar nanopartículas de quitosán conjugadas con un antígeno de SARS-CoV-2 y un plásmido codificante para Bcl-6 (RBD/Np-Ch/Bcl-6).

1. Preparación de las nanopartículas.

1.1 Purificación de la construcción de pIRES2-EGFP/Bcl-6.

Se crecieron bacterias de *E. coli* DH5 α que contienen el plásmido pIRES2-EGFP/Bcl6 en placas de medio solido Luria Bertani (LB) con antibiótico kanamicina (30 mg/ml) y se creció durante 24 horas. Después, se tomó una colonia aislada y se sembró en 3 ml de medio LB líquido con kanamicina, a 37°C en agitación a 180 rpm por 8 horas. Transcurrido este tiempo se pasó 1 ml del cultivo a 100 ml de medio fresco LB con kanamicina, se dejó durante 16 horas a 37° C a 180 rpm y se realizó la purificación con el kit Pure Yield Plasmid Midiprep System (Promega) de acuerdo con las instrucciones del kit. Brevemente, se resuspendió el pellet de bacterias con una solución que contiene 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA pH 8, 100 μ g/mL de RNasa A, después se le agregó la solución de lisis celular (0.2 M NaOH y 1% SDS) se deja incubando a temperatura ambiente (TA) durante 20 min o hasta que se perciba transparentoso, después se le agregó la solución de neutralización que contiene 4 M clorhidrato de guanidina pH 4.2, 760 mM acetato de potasio y 2.1 M de ácido acético glacial. Posteriormente, se centrifugó a 4900 rpm por 30 min a TA, luego la solución de lisis se pasó por la columna azul y el filtrado colectado se pasó después por la columna blanca, ésta se lavó con la solución de lavado libre de endotoxina y después con la solución de lavado de columna que contiene 163 mM de acetato de potasio, 22.6 mM de Tris-HCl, 0.1 mM de EDTA pH 8, diluido a 1X con etanol al 95%. Por último, el DNA se eluyó con agua destilada previamente calentada (65°C).

1.2 Generación de nanopartículas de quitosán.

Se prepararon Np-Ch por el método de gelificación ionotrópica, primero se preparó una solución de quitosán de bajo peso molecular (Sigma, cat 448869-50G) al 2% disuelto en ácido acético al 5%. Después, se mezcló con 10 μ g de DNA (pIRES2-

EGFP/Bcl-6 o vector vacío) y 10 µg proteína (RBD de SARS-CoV2, BSA o SpA), con ayuda de un agitador magnético. Se agregó TPP al 2 %, (Sigma, Cat.238503-25G), concentración final de 3.3 mg/mL, este se agrega una gota cada 12 minutos hasta cumplir 1 hora. Todo esto se realizó a TA seguido de dos lavados para retirar las impurezas. Para ello, se centrifugaron las Np-Ch a 3000 rpm durante 30 min, el sobrenadante se separó del sedimento (que contenía las Np-Ch) y se añadió agua destilada. Se repitió el procedimiento recolectando el sobrenadante de la primera y segunda centrifugación para analizar la eficiencia de pegado del DNA y de las proteínas. En la tabla 3 se muestran los complejos y su composición.

Nombre del complejo	DNA	Proteína
RBD/Np-Ch/Bcl-6	pIRES2-EGFP/Bcl-6	RBD de SARS-CoV2
RBD/Np-Ch/∅	pIRES2-EGFP	RBD de SARS-CoV2
RBD/Np-Ch	Sin DNA	RBD de SARS-CoV2
SpA/Np-Ch/Bcl-6	pIRES2-EGFP/Bcl-6	SpA
SpA/Np-Ch/∅	pIRES2-EGFP	SpA
SpA/Np-Ch	Sin DNA	SpA
BSA/Np-Ch/Bcl-6	pIRES2-EGFP/Bcl-6	BSA
BSA/Np-Ch/∅	pIRES2-EGFP	BSA
BSA/Np-Ch	Sin DNA	BSA

Tabla 3. Preparación de Np-Ch. Se prepararon los complejos de Np-Ch con distintos componentes, Np-Ch con DNA de la construcción pIRES2-EGFP/Bcl-6 y la proteína RBD, o bien con la proteína SpA, o la proteína BSA, de la misma manera se prepararon Np-Ch que contenía DNA de la construcción pIRES2-EGFP sin Bcl-6 (vector vacío). Vector vacío es representado con el símbolo ∅. Concentración final de proteínas y DNA: 40 µg/mL.

2. Caracterización de las nanopartículas.

2.1 Eficiencia de unión de proteína.

Se realizaron ensayos de ácido bicinonínico (BCA) en los sobrenadantes generados durante la preparación de las Np-Ch (lavados) para obtener la eficiencia de pegado de proteína, también se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) para la identificación de la proteína que no fue retenida. El contenido de proteína en los sobrenadantes, que representa la

cantidad total de proteína que no se unió a las Np, se determinó usando un ensayo de BCA y electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

2.1.1 Ensayo de BCA.

Este ensayo de proteínas depende de la reacción de biuret como primer paso, donde 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. Biuret reacciona con el cobre para formar un complejo tetradentado de color azul. La absorbancia de este complejo se analizó a 562 nm con concentraciones crecientes de proteínas.

-Se prepararon los estándares (1 mL) 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 2 mg/mL.

-Se preparó el reactivo de trabajo (WR) de acuerdo al Kit "Pierce™ BCA Protein Assay" con una relación de 50:1, es decir, 50 partes del reactivo A por cada parte del reactivo B.

-Para la preparación de las muestras a analizar se mezclaron 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 la placa un par de minutos a TA y se midió la absorbancia a 562 nm en un lector de placas (Biotek).

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

$$\% \text{ eficiencia} = \frac{[\text{proteína añadida}] - [\text{proteína en sobrenadante}]}{[\text{proteína añadida}]}$$

2.1.2 SDS-PAGE.

Se prepararon geles de acrilamida al 10% con un espesor de 1 mm, de un tamaño de 8 x10 cm. La polimerización se llevó a cabo a TA y los geles se dejaron reposar 10 minutos antes de su utilización.

- Para preparar el gel separador se mezclaron 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 persulfato de amonio 10%, 6 µl de TEMED y agua BD.
- Para preparar el gel concentrador se mezclaron 0.66 mL de la mezcla de acrilamida /bis acrilamida (30%:0.8%), 416.66 µl de tris- HCl 1 M pH 6.8, 33.33 µl de SDS 10%, 16.66 µl de persulfato de amonio al 10%, 3.33 µl de TEMED y agua BD.

Las muestras se desnaturalizaron diluyéndolas 1:1 (V:V) con buffer reductor (Tris 120 mM, glicerol 10%, SDS 6%, beta- mercaptoetanol ≥99.0%, azul de bromofenol 0.05%) / buffer no reductor (tris 120 mM, gricerol 20%, SDS 4%, azul de bromofenol 0.1%). Se cargaron las muestras en el gel con un volumen final de 25 µl en cada pozo y se corrieron a 115 V por 120 minutos. Después se tiñó el gel con tinción de Comassie que contiene azul de comassie R-250 0.1%, ácido acético 10%, metanol 40% y agua, por 12 horas y se destiñó con solución desteñidora a base de metanol 40%, ácido acético 10% y agua.

2.2 Tamaño y forma de las nanopartículas por microscopía electrónica de transmisión (MET).

Para determinar el tamaño y la morfología de la superficie de las Np-Ch se utilizó un microscopio electrónico de transmisión Tecnai 200 kV D2360 Super Twin de Thermo Fisher Scientific. Para el análisis se colocó una gota de la muestra en rejillas de cobre cubiertas con una película de carbono fornvar y se dejó reposar durante 20 minutos a TA, en una placa de petri cerrada para evitar que la muestra se secase. Posteriormente, se eliminó el exceso de la gota y se fijó la muestra adherida a la rejilla con glutaraldehído al 2.5 % en buffer de cacodilato de sodio (0.1M, pH 7.4) durante 10 minutos. Las rejillas se lavaron con agua bidestilada y se contrastaron con acetato de uranilo al 2.5% en solución acuosa durante 5 minutos, se dejó que la rejilla se secase por 10 minutos y se examinó bajo el MET. Se tomaron fotografías con el sistema de captura a 10 000 X, 80 000X y 100 000X. Se determinó el tamaño de las Np-Ch midiéndolas directamente con el software del equipo.

2.3 Carga superficial de nanopartículas de quitosán.

Cuando una partícula está en una solución que contiene iones está rodeada por una doble capa eléctrica de iones y contraiones, el potencial que existe en el límite hidrodinámico de la partícula se conoce como potencial Z (Hembram et al., 2016). Para evaluarlo utilizamos la detección sintonizable de pulsos resistivos (TRPS) en un equipo Exoid de IZON, esta técnica utiliza la impedancia de un nanoporo en una celda de fluido electrolítico en el que se muestrea 50,000 veces por segundo. Las muestras se dispersaron en ácido acético en concentraciones que oscilaban 40 µg/mL como soluciones stock, las muestras se diluyeron 1:50 (V: V) en electrolito de medición que consiste en una solución tamponada de fosfato y un surfactante IZON para mantener húmedos los nanoporos en todo momento y evitar variaciones de corriente. Las mediciones se realizaron con un sistema Exoid de IZON Science (Izon Science Ltd, Medford, MA, United States) equipado con una celda de fluido que contiene dos electrodos Ag/AgCl para permitir el flujo de corriente eléctrica a través del electrolito acuoso. Las mediciones se realizaron utilizando la solución de electrolito de medición. El estiramiento de la membrana se mantuvo en 46 mm y el voltaje se ajustó para tener una corriente de referencia entre 100 y 130 nA (típicamente alrededor de 400 mV). Los datos se adquirieron utilizando Exoid Control Suite V1.0.0.181. Para cada muestra se obtuvieron registros de paso de al menos 100 Np. El tamaño de las Np y el potencial zeta se calcularon después de la medición de las soluciones de partículas calibradas (CPC200 de IZON) con Nanopore NP250 (IZON) que permite medir un rango de tamaño total entre 90 y 500 nm según el proceso de calibración. Los resultados se determinaron utilizando el software IZON Data Suite 1.0. Los resultados se reportaron como histogramas con valores de media, moda y desviación estándar.

Objetivo 2. Evaluar la incorporación de las nanopartículas conjugadas a antígeno en células B específicas.

3. Obtención de células B derivadas de pacientes recuperados de COVID-19.

Al iniciar el proyecto, dado el limitado número de individuos que se habían infectado con SARS-CoV-2, planteamos el reclutamiento de voluntarios con un diagnóstico previo de COVID-19 para la donación de muestras sanguíneas que serían utilizadas para la purificación de las células B. Posteriormente, con el avance de la pandemia en nuestro país, la probabilidad de encontrar voluntarios con las características solicitadas se incrementó. Por lo cual, se estableció una colaboración con el Centro Estatal de Transfusión Sanguínea del Estado de Morelos para la donación de “buffy coats” derivados de paquetes globulares, que son productos de desecho de los bancos de sangre.

3.1 Obtención de muestras sanguíneas de voluntarios.

Se reclutaron 50 voluntarios (muestreo a conveniencia del investigador), de los cuales fueron seleccionados cinco con los títulos más altos de anticuerpos anti-RBD de SARS-CoV-2, para una nueva donación de muestras sanguíneas con el objetivo de aislar células B a partir de éstas. El consentimiento informado se encuentra en el anexo 1 y 2.

3.1.1 Reclutamiento de voluntarios.

Se realizó una invitación vía Twitter (@inspmx) a personas que tuvieron COVID-19 (30-40 días después del inicio de los síntomas) en el área metropolitana de Cuernavaca, Morelos, para participar voluntariamente en el estudio. Se les pidió que proporcionaran un diagnóstico verificado de SARS-CoV-2 por RT-PCR de los Servicios de Salud del Estado de Morelos o de otro laboratorio certificado. Se reclutaron hombres y mujeres, mayores de 18 y menores de 60 años, previamente sanos y sin comorbilidades. Las mujeres embarazadas fueron excluidas del estudio.

3.1.2 Toma de muestras de sangre.

Se obtuvieron muestras sanguíneas de los voluntarios con un ayuno de al menos 8 horas. Los voluntarios recibieron una carta de consentimiento informado para

leer y firmar. Las muestras de sangre se tomaron mediante venopunción en el antebrazo con un sistema Vacutainer. La muestra inicial consistió en 1 tubo de 5 mL (suero), que se utilizó para analizar los títulos de anticuerpos RBD por ELISA. A los voluntarios seleccionados, se les invitó a donar una segunda muestra sanguínea de cuatro tubos CPT (Becton-Dickinson, 8 ml cada uno) para el aislamiento de células B. En el momento del segundo muestreo, se solicitó nuevamente el consentimiento para continuar participando.

3.2 Obtención de muestras procedentes de buffy coats.

Los paquetes leucocitarios (Buffy Coat) fueron donados por el Centro Estatal de Transfusión Sanguínea de Cuernavaca, Morelos (anexo 3). Se realizó la solicitud de paquetes leucocitarios frescos, de voluntarios de sexo indistinto, edad de entre 18 y 50 años, vacunados contra SARS-CoV-2 y/o convalecientes de COVID-19 en los últimos 6 meses. En estas muestras se verificó la fecha de obtención y se realizó una ELISA para corroborar la concentración de anticuerpos anti-RBD de SARS-CoV-2, se verificó que la OD a 490 nm fuera igual o mayor que 2.

4. Análisis de anticuerpos anti-RBD por ELISA.

Para este ensayo se utilizaron placas de ELISA de 96 pozos de alta afinidad, se cubrieron con 50 μ l por pozo de la solución de antígeno RBD en PBS 1X (2 μ g/ml), se dejaron en incubación por toda la noche a 4°C. Las muestras de suero de los voluntarios se inactivaron en baño maría a 56°C \pm 1 °C durante una hora exacta. Al día siguiente se lavaron las placas 3 veces con solución de lavado PBS-T (PBS + 0.1% (v/v) Tween 20) dando ligeros golpes sobre una toalla absorbente, en seguida se bloquearon la placa con 200 μ l por pozo de la solución de PBS-T + 5% (p/v) leche en polvo y se guardaron durante 2 horas a 4°C. Se prepararon las muestras a una dilución 1:5 en PBS 1X, y luego éstas a una dilución final 1:50 en PBS-T + 1% (p/v) leche en polvo. Acabando el tiempo de incubación con la solución de bloqueo, se tiró la solución y se secaron las placas golpeando de manera firme seis a ocho veces en una toalla absorbente, luego se transfirieron las muestras en las placas, 100 μ l por cada pozo y se incubaron por 2 horas a TA. Enseguida

se lavaron 4 veces las placas con PBS-T y se agregaron 50 µl por pozo de anti-cuerpo humano IgG-HRP conjugado (Sigma, #A0293) dilución 1:5000 disuelto en PBS-T +1% (p/v) de leche en polvo y se incubó 1 hora a TA. Por último, se realizó el revelado de las placas, para ello se lavaron 3 veces con PBS-T y se agregaron 100 µl por pozo de la solución de o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD, Thermo Scientific Alfa Aesar cat. J60354.22), disuelto en buffer de citratos que contiene Na₂HPO₄ y ácido cítrico monohidratado más H₂O₂ 30%, y se incubó a TA en obscuridad por 10 minutos. Posteriormente, se agregaron 50 µl de HCl 3N a todos los pozos para detener la reacción y se midió la absorbancia a 490 nm. El punto de corte definido para una muestra positiva a 490 nm fue de ≥ 0.3 .

5. Separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

5.1 Separación de células a partir de tubos CPT.

La sangre de los voluntarios recuperados de COVID-19 se recogió en tubos CPT y se centrifugó a 1500 g durante 30 min a TA. La fase de PBMC se recogió en medio RPMI 1640 (Gibco, cat. 31800-022) y se centrifugó a 300 g durante 15 min. Luego, el sedimento celular se lavó de nuevo usando RPMI que contenía suero fetal bovino (FBS) al 10%. Se contaron las células y se procedió a la separación de las células B utilizando el kit de aislamiento total de células B (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Solamente se realizó la purificación de las células cuando su viabilidad, determinada por azul de tripán, fue \geq a 90%.

5.2 Separación de células a partir de Buffy Coats.

El contenido de los buffy coats se vació en tubos de fondo cónico falcón de 50 mL. Las siguientes soluciones se prepararon en fresco y se esterilizaron: solución A (1 g/L de D-glucosa anhidra, 0.0074 g/L de CaCl₂ x 2H₂O, 0.1992 g/L de MgCl₂ x 6H₂O, 0.4026 g/L de KCl, 17.565 g/L de Tris) y solución B (8.19 g/L de NaCl). Se mezclaron las soluciones A y B en una proporción 1:9. Se diluyó la sangre con la mezcla de soluciones A y B en una proporción 1:1 y se agregó lentamente por la pared de un tubo que contenía Ficoll-Paque (Thermo Fisher Scientific, cat 11778538). Se emplearon 3 mL de Ficoll-Paque por cada 4 mL de sangre diluida.

Se centrifugó a 400 g por 30-40 minutos a 18-20°C. Se colectó la fase correspondiente a las PBMCs (Figura 5) y se colocó en tubo nuevo. Realizamos lavados de las PBMCs con medio RPMI sin suero, seguido de lavados con un buffer (preparado en fresco y estéril) que contenía EDTA al 0.5 mM, BSA al 1% y PBS 1x. Se contaron las células obtenidas y se procedió a la separación de los linfocitos B. Solamente se realizó la purificación de las células cuando su viabilidad, determinada por azul de tripán, fue \geq a 90%.

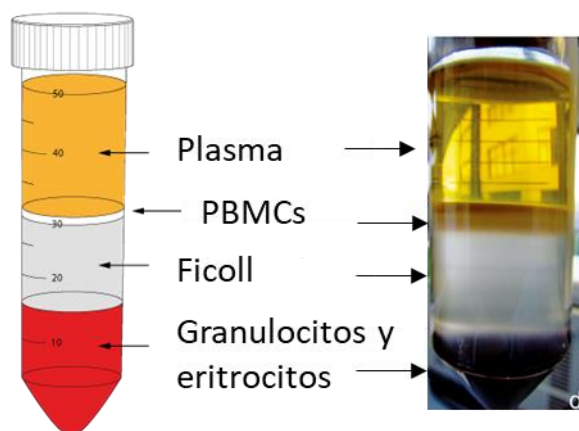


Figura 5. Separación con Ficoll. Se observan las fases que se obtienen al separar por gradiente de densidad utilizando Ficoll, la fase de hasta arriba color amarillo es el plasma, enseguida se encuentra una capa que corresponde a las células PBMCs, después el Ficoll y hasta abajo sedimentan los granulocitos y eritrocitos.

6. Purificación de células B empleando perlas magnéticas.

Se preparó el buffer para el lavado de las PBMC que contenía PBS, pH 7.2, 0.5% BSA y 2 mM EDTA (4°C, preparado justo antes de su uso). El enriquecimiento de las células B se realizó empleando el B cell Isolation Kit II, human cat. 130-091-151 y la columna MS (MACS, Miltenyi Biotec) con capacidad de 10^7 células y un máximo de 2×10^8 células. Se tomó un determinado número de células y se colocó en un tubo cónico de 15 mL en 10 mL de medio, se centrifugó a 1800 rpm y se resuspendió el pellet celular en 40 μ l de buffer por cada 10^7 células totales. Después, añadimos 10 μ l de biotin-antibody cocktail por cada 10^7 células totales, se

mezcló bien y se incubó a 4°C por 5 minutos. Se añadieron 30 µl de buffer, 20 µl de Anti-Biotin MicroBeads por cada 10⁷ células totales, se mezcló y se incubó a 4 °C por 10 minutos, después se hizo un lavado con 5 ml de buffer y se centrifugó por 5 minutos a 2,000 rpm a TA. Posteriormente, el pellet se resuspendió en 5 ml de buffer y se pasó por la columna previamente hidratada con el buffer, se colectaron las células B que pasaron por la columna, se contaron en una cámara de Neubauer para posteriormente sembrarlas en placas de 96 o placas de 24 pozos.

7. Ensayos de incorporación de Np-Ch en células B.

7.1 Preparación de Np-Ch acopladas a fluoresceína.

Se prepararon RBD/Np-Ch, BSA/Np-Ch y SpA/Np-Ch por el método descrito anteriormente, después se liofilizaron en un concentrador de vacío Savant de Thermo Scientific. Posteriormente se acoplaron con isotiocianato de fluoresceína isómero 1 (FITC, SIGMA) siguiendo el protocolo de Zhao et.al., 2006 que consiste en liofilizar las Np-Ch, disolverlas en dimetilsulfóxido (DMSO) con NaOH 0.1 M y dejar incubando con la proteína FITC 10 mg/mL por 10 horas en la oscuridad a TA. Después del tiempo de incubación se realizaron dos lavados con DMSO para eliminar residuos de FITC que no se hayan unido.

7.2 Análisis de la incorporación de Np-Ch en células B por citometría de flujo.

Se sembraron 2.0 x10⁵ células B por pozo en una placa de 96 pozos y se agregaron 2 µg/mL o 4 µg/mL de RBD/Np-Ch-FITC, BSA/Np-Ch-FITC o SpA/Np-Ch-FITC, se incubó a 37°C con 5% de CO₂ durante 8 y 24 horas. Como control negativo se incubaron células B sin Np-Ch. Después del tiempo de incubación se realizaron dos lavados con FACS buffer (EDTA 0.5mM, BSA 1% y PBS 1X) y se agregó paraformaldehído (PFA) al 4%. Las muestras se conservaron a 4 °C en oscuridad hasta su análisis. Para el control positivo, las células B fueron colocadas en buffer de permeabilización (Tritón X-100 al 0.1% en PBS) y se le añadió 0.1 µl (dilución 1:1000) de anticuerpo constitutivo primario antígeno nuclear de proliferación celular (PNCA) de conejo en 100 µl de buffer. Se mantuvo a 4°C durante 30 minutos, después se lavó con buffer de permeabilización a 300 x g por 10 minutos y se

agregaron 10 μ l de anticuerpo secundario IgG acoplado a FITC anti-conejo (dilución 1:500 en FACS Buffer) se tomaron 10 μ l en 90 μ l de buffer de permeabilización, de igual manera se incubó durante 30 min a 4°C en la oscuridad, se volvió a lavar con buffer de permeabilización a 300 x g por 10 min y se resuspendió en 300 μ l de FACS buffer. Cabe mencionar que todas las muestras fueron tratadas de la misma manera que los controles y se realizaron por duplicado. Para la adquisición de las muestras se empleó el equipo BD FACS Canto II y para el análisis de los datos el software FlowJo CE. Versión 10.

7.3 Microscopía Confocal

Se incubaron 2×10^5 células B por pozo en una placa de 96 pozos con 2 μ g/mL RBD/Np-Ch, BSA/Np-Ch y SpA/Np-Ch acopladas con FITC a 37°C con 5% de CO₂ durante 8 h. Como control negativo se incubaron células B sin Np-Ch. Después de realizar dos lavados con PBS, las células fueron fijadas con PFA 4% en hielo durante 20 min y se lavaron nuevamente con PBS. Posteriormente, se colocaron 10 μ l de la muestra en un portaobjetos, se colocó un cubreobjetos y se observaron en un microscopio Confocal Olympus MPhot invertido. Se realizaron capturas de imágenes con los objetivos de 10X y 60X, y las imágenes obtenidas se analizaron en FIJI ImageJ.

Objetivo 3. Comparar la eficacia en la generación de anticuerpos contra SARS-CoV-2 entre células B estimuladas con las nanopartículas RBD/Np-Ch/Bcl-6 y con el antígeno soluble.

8. Análisis de viabilidad de las células B en presencia de Bcl-6.

Se realizó utilizando el kit MTS/PMS CellTiter 96 (Promega) que determina la cantidad total de células metabólicamente activas a través de la conversión de una sal de tetrazolio a formazán que se solubiliza y se determina espectrofotométricamente a 490 nm. Se sembraron en placas de 96 pozos, 2×10^5 células B por pozo, incubando con RBD/Np-Ch/Bcl-6 RBD/Np-Ch/ \emptyset o sin Np-Ch a 37°C con 5% de CO₂, después de 8, 24 y 48 horas de incubación se agregaron 20 μ l de la mezcla

de MTS/PMS a cada pozo y se dejó incubando a 37°C durante 4 horas, después se midió la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro BioTek ELx800. El porcentaje de actividad metabólica se calculó mediante comparación con la absorbancia media de control sin Np-Ch, que fueron células B en RPMI 10% SFB. Se realizaron al menos cuatro réplicas por cada condición.

9. Estimulación *in vitro* de células B con RBD/Np-Ch

Para el mantenimiento y proliferación de las células B, éstas se crecieron con medio RPMI 1640 suplementado con 10% SFB, 1% de HEPES (Gibco), aminoácidos no esenciales (NEAA Mixture 100 X, Lonza), 1% de piruvato de sodio (Sigma) y una mezcla de penicilina y estreptomycin al 1X (Gibco, 100X). Se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ con combinaciones de 500 ng/ml de ligando de CD40 humano (CD40L; Miltenyi Biotech), 50 ng/ml de factor de activación de células B (BAFF, R&D), 10 ng/ml de IL-21 (R&D), 10 ng/ml de IL-2 (mAbTech), 20 ng/ml de IL-4 (R&D) y 5 µg/ml anti-human anti-Fas antibody (Miltenyi Biotech). Ver tabla 4. Para la estimulación antígeno-específica de células B con el antígeno RBD se añadieron 2 µg/mL de RBD recombinante o el equivalente a 2 µg/ml de RBD contenido en las RBD/Np-Ch/Bcl-6 Se incubaron las células durante 14 días.

Referencia	Protocolo	IL-4	IL-21	BAFF	CD40L	anti-fas	Celulas No B	IL-2
Kyung-Ho, 2018	P1	[Barra azul]						
Purwada, 2015	P2	[Barra verde]		[Barra verde]				
Purwada, 2018.	P3	[Barra morada]		[Barra morada]				
Cao, 2010	P4	[Barra naranja]			[Barra naranja]		[Barra naranja]	
Nojima, 2011	P5	[Barra azul claro]			[Barra azul claro]			[Barra azul claro]
J Imm Meth, 2010.	P6	[Barra roja]					[Barra roja]	
Este trabajo	P7	[Barra azul oscuro]					[Barra azul oscuro]	

Tabla 4. Protocolos de estimulación que se probaron en células B. Las células B humanas fueron estimuladas *in vitro* con distintos protocolos encontrados en la literatura que contienen una mezcla de citocinas para la proliferación, sobrevivencia y diferenciación de las células B.

10. Detección de anticuerpos liberados por células B.

Las respuestas de anticuerpos IgG específicos de antígeno se determinaron con sobrenadantes de cultivo (100 µl sin diluir) mediante el ensayo de ELISA anti-RBD, como se describió anteriormente. El límite de detección se correspondió al promedio de diez blancos (medio de cultivo) más 3 veces su desviación estándar, mientras que el límite de cuantificación fue el promedio de diez blancos más 10 veces la desviación estándar (Miller & Miller, 2002) Con los sobrenadantes de cultivo también se realizaron ensayos de ELISA para determinar IgG total.

10.1 ELISA IgG total en sobrenadantes de cultivo.

Se recubrió una placa de 96 pozos con 50 µl/pozo de 10 µg/ml de anticuerpo primario anti-human antibody (Affinity Pure Goat Anti-Human IgG Fc fragment specific, Lot 88934 de Jackson Inmuno Research) disuelto en buffer de carbonatos (34 mM de NaHCO₃ y 15 mM de Na₂CO₃) pH 9.7 durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó la placa 3 veces con PBS-T (4°C), después se incubó con buffer de bloqueo que contiene BSA al 3% en PBS 1X por 60 minutos a TA en agitación en un Thermomixer Eppendorf (300 rpm). Se lavó la placa 3 veces con PBS-T (4°C), se agregaron 50 µl del sobrenadante del cultivo celular (como control negativo se utilizó medio RPMI y como control positivo suero de voluntarios en dilución 1:100 en PBS) y se incubó por 120 minutos en agitación en un Thermomixer Eppendorf (300 rpm). Después del tiempo de incubación se lavó 3 veces con PBS-T (4°C), se agregaron 50 µl de anticuerpo secundario conjugado con HRP (Goat anti-human IgG Fc HRP secondary antibody, Abcam cat. ab98567) y se incubó a TA por 60 minutos en agitación en un Thermomixer Eppendorf (300 rpm). Se lavó 3 veces con PBS-T (4°C), para el revelado se agregaron 50 µl de OPD 10 mg/mL disuelto en buffer de citratos pH 5 + H₂O₂ (1 µl de H₂O₂ por ml de buffer), se detuvo la reacción a los 15 minutos con 50 µl de H₂SO₄ 1M. Se leyó la placa en un lector de ELISA con filtro de 490 nm de absorbancia.

11. Detección de células productoras de anticuerpos.

Para detectar células B secretoras de inmunoglobulinas específicas de antígeno e

inmonoglobulinas totales, se utilizó una técnica de inmunopunto ligado a enzimas (ELISPOT) utilizando el kit Enzyme-Linked ImmunoSpot (ELISpot), (MabTech, Cat 354-7768.). Se emplearon placas PDVF de 96 pocillos de fondo plano (MultiScreen-IP; Millipore) que se activaron humedeciendo la membrana con 50 µl/pozo de etanol al 70% durante dos minutos. El etanol incrementa la carga neta de los poros de la membrana y mejora la sensibilidad del ensayo. Se retiró el etanol y para eliminar su exceso la placa se lavó 5 veces con 200 µl/pozo de agua estéril, posteriormente la placa se cargó con 100 µl de 10 µg/ml de RBD recombinante de SARS-CoV-2 en PBS, como control positivo se empleó el anticuerpo monoclonal MT91/145 (incluido en el kit) diluído a 15 µg/mL con PBS 1X y como control negativo se utilizó PBS 1X. La placa se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente, la placa se lavó 5 veces con 200 µl/pozo de PBS 1X (pH 7.4) para remover el exceso de antígeno. Los sitios de unión a proteínas libres se bloquearon mediante incubación con RPMI 1640 (Gibco) que contenía FBS al 10%, durante 30 minutos a TA. Para la estandarización de la cantidad de células a emplear, se sembraron diferentes cantidades de células (PBMCs o células B) incluyendo 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 y 5×10^5 células por pozo, mientras que para el control positivo se sembraron 2.5×10^4 , 5×10^4 y 10×10^4 , por duplicado. Se incubó a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 horas. A continuación, las placas se lavaron 5 veces con 200 µl/pozo de PBS 1x, seguido de incubación con 1 µg/ml de anticuerpo MT91/145 IgG anti-humano de cabra conjugado con peroxidasa (HRP, Mabtech) durante 2 h a TA. Después del tiempo de incubación la placa se lavó con PBS 1X y se le adicionaron 100 µl/pozo de una solución de Streptavidin-HRP diluida 1:1000 en PBS 1X adicionado con 0.5% SFB y se mantuvo a TA por 1 hora. Enseguida, la placa se lavó 5 veces con PBS 1X y se reveló adicionando 100 µl/pozo del substrato cromógeno TMB previamente filtrado por un periodo de 15-30 minutos, después se lavó la placa con agua del grifo (a bajo flujo) y se dejó secando en la oscuridad.

12.. Transfección de Bcl-6 en células HEK-293T.

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 µg de DNA y el método de transfección de CaCl₂. Se crecieron células HEK-293T en medio DMEM preparado con 10% de SFB, y los antibióticos penicilina y estreptomicina, incubando a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂. 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 CaCl₂, HBS 2X, cbp H₂O 40 µl; 2) para el control positivo: 1 µg de GFP, CaCl₂ 2M, HBS 2X y cbp H₂O 40 µl; y 3) para el control negativo: CaCl₂ 2M, HBS 2X y cbp H₂O 40 µl. Se mezclaron con ayuda del vórtex. Cada condición se preparó por triplicado y se aplicó sobre las células HEK-293T manteniéndolas en incubación por 48 horas. Posteriormente, se verificó la expresión de EGFP en un microscopio de fluorescencia.

12.1 Análisis de la expresión de Bcl-6 en células HEK-293T por FACS.

Después de corroborar la expresión de Bcl-6 por fluorescencia, proseguimos al marcaje de las células con el anticuerpo anti-Bcl-6 acoplado al fluoroforo ficoeritrina (PE). Para ello levantamos las células HEK-293T transfectadas con ayuda de tripsina, realizamos 2 lavados con FACS Buffer a 300 x g por 10 minutos, se re-suspendió en 1 mL de solución de fijación PFA al 4%, se incubó por 30 minutos a 4° C, después se volvieron a lavar las células con FACS Buffer y se añadió 1 mL de buffer de permeabilización (tritón 0.1 % en PBS 1X). Se centrifugó a 300 x g durante 5 minutos, se aspiró el sobrenadante y se agregaron 98 µl de buffer de permeabilización y 2 µl de anticuerpo Anti-Bcl-6-PE (dilución 1: 100, Cat 130-118-

346, MACS Miltenyi Biotec) incubando en la oscuridad por 30 minutos a 4°C. Después, las células se lavaron con buffer de permeabilización a 300 x g por 10 minutos, se aspiró el sobrenadante y se resuspendió en FACS Buffer. Como controles se utilizaron células HEK-293T sin marcar y células B marcadas con PE. Los controles fueron tratados con el mismo protocolo que las muestra problema.

13. Análisis estadístico.

Todos los análisis estadísticos y las gráficas se realizaron utilizando el software GraphPad Prism, versión 5.0 (Software GraphPad). Los datos fueron expresados como medias \pm desviación estándar. Se probó la normalidad en todos los conjuntos de datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y posteriormente se verificaron los conjuntos en busca de valores atípicos (eliminación de valores atípicos Q = 1 %) antes del análisis. Para determinar las diferencias entre dos grupos, los datos se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas no paramétrica y para más de dos grupos analizamos mediante la prueba de Kruskal-Wallis con una prueba posterior de Dunn. Diferencias significativas con un valor $p < 0.05$.

RESULTADOS

Objetivo 1. Generar y caracterizar nanopartículas de quitosán conjugadas con un antígeno de SARS-CoV-2 y un plásmido codificante para Bcl-6.

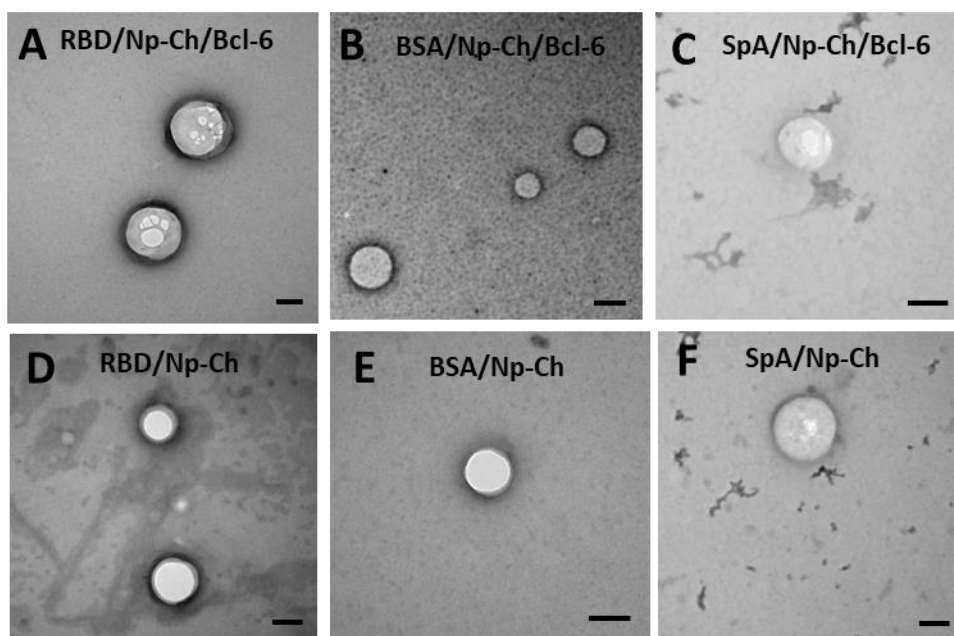
Se purificó la construcción pIRES2-EGFP/Bcl6 y se prepararon RBD/Np-Ch/Bcl-6 probando distintas concentraciones de proteína y de DNA hasta encontrar la concentración óptima que uniera la totalidad del DNA y proteína al quitosán. Se evaluó el pegado del DNA por electroforesis en geles de agarosa y el pegado de la proteína se analizó en el sobrenadante (el cual se obtuvo por medio de lavados de las Np-Ch). Se cuantificó la proteína por ensayos de BCA y se observaron las muestras por electroforesis en geles de acrilamida para confirmar la ausencia de proteína suelta. Se realizó el cálculo de eficiencia de unión de DNA y proteína al quitosán con la fórmula indicada en la sección de métodos. Se encontró que la mejor condición donde se pegaba por completo los componentes al quitosán era la relación 1:1, es decir 10 µg de DNA con 10 µg de proteína (Tabla 5).

Nanopartículas	DNA (µg/mL)	Proteína (µg/mL)	% Eficiencia de unión del DNA	%Eficiencia de unión de proteína.
Np-Ch/Bcl-6	10	-	100	-
Np-Ch/∅	10	-	100	-
BSA/Np-Ch	-	10	-	100
BSA/Np-Ch/Bcl-6	10	10	95.4	100
BSA/Np-Ch/∅	10	10	96.8	100
SpA/Np-Ch	-	10	-	100
SpA-CS-Np/Bcl-6	10	10	89.4	100
SpA/Np-Ch/∅	10	10	94.3	100
RBD/Np-Ch	-	10	-	100
RBD/Np-Ch/Bcl-6	10	10	100	76.5
RBD/Np-Ch/∅	10	10	100	78.7

Tabla 5. Eficiencia de unión de proteína y DNA en las Np-Ch. Porcentajes de eficiencia de unión de proteína (RBD, SpA y BSA) obtenidos con los ensayos de BCA y de eficiencia de unión de DNA determinados por espectrofotometría en el equipo Inplen, analizados en los sobrenadantes de las preparaciones de las Np-Ch.

Microscopía electrónica de transmisión (MET)

La morfología de las Np-Ch fue investigada por MET donde se observó que tienen forma esferoidal. Los diámetros promedio de BSA/Np-Ch y BSA/Np-Ch/Bcl-6 fueron 118 ± 29 y 224.5 ± 22 , respectivamente. Por lo tanto, la incorporación de ADN y proteína aumentó significativamente el tamaño de las Np. Las Np-Ch que contienen RBD fueron más pequeñas en comparación con BSA/Np-Ch (Figura 6G). Los diámetros medios de RBD/Np-Ch y RBD/Np-Ch/Bcl-6 fueron 124.5 ± 27 y 146.2 ± 15 , respectivamente. Esto es consistente con el tamaño de las proteínas, ya que BSA tiene un peso molecular de 66.5 kDa, mientras que RBD es de alrededor de 25 kDa. En la Figura 6 se muestran fotografías representativas de cada preparación.



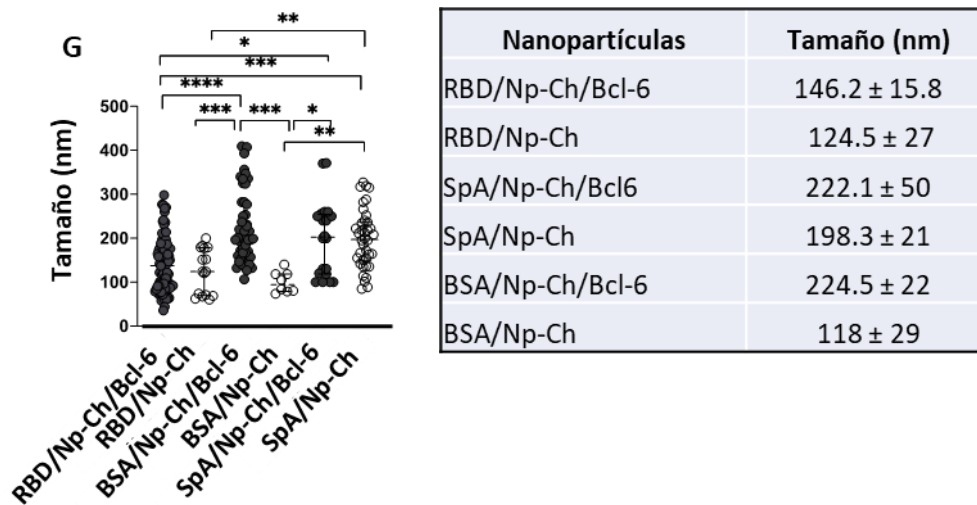


Figura 6. Las Np-Ch generadas tienen forma esférica. Se prepararon Np-Ch conjugadas con proteína (RBD de SARS-CoV-2, BSA y SpA) y con DNA (vector codificante de Bcl-6) por el método de gelificación ionotrópica. Se evaluó su morfología por microscopía electrónica de transmisión. **A-F.** Fotografías representativas de las Np-Ch/RBD/Bcl-6 (A), BSA/Np-Ch/Bcl-6 (B), SpA/Np-Ch/Bcl-6 (C), RBD/Np-Ch (D), BSA/Np-Ch (E) y SpA/Np-Ch (F). La barra de escala representa 100 nm. Las diferentes preparaciones de Np-Ch fueron observadas en el MET a la magnificación de 100 000 X y se obtuvieron mediciones del tamaño de las partículas individuales empleando el software del equipo. **G.** Comparación del tamaño de los distintos complejos medidos por MET (n=16-83/grupo). Gráfica de puntos; las barras de error indican la mediana y el rango intercuartílico. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001. Kruskal Wallis con comparaciones múltiples de Dunn. En la tabla se muestra el tamaño de los complejos de Np-Ch indicados como mediana y rango intercuartílico.

Detección de pulso resistivo ajustable (TRPS) para mediciones de tamaño y potencial zeta.

El análisis del potencial Z se realizó a través de una colaboración con el Dr. Arturo Galván Hernández del Instituto de Ciencias Físicas (ICF) de la UNAM. El análisis determinó que la media de la carga de las RBD/Np-Ch/Bcl-6 es de -31.2 mV, de RBD/Np-Ch es de -17.3 mV, de SpA/Np-Ch/Bcl-6 de -17.3 mV, SpA/Np-Ch fue de -66.6 mV, de BSA/Np-Ch/Bcl-6 fue de -17.6 mV y de BSA/Np-Ch fue de -17.0 mV (Figura 7). Como se observa, todas las cargas fueron negativas (Figura 8). Así

mismo el equipo también analizó el tamaño del diámetro de las Np-Ch tal como se muestra en la tabla 6.

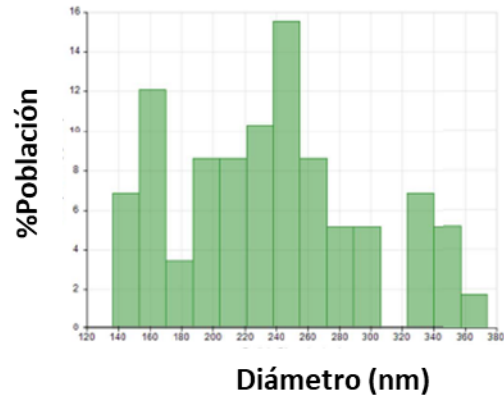
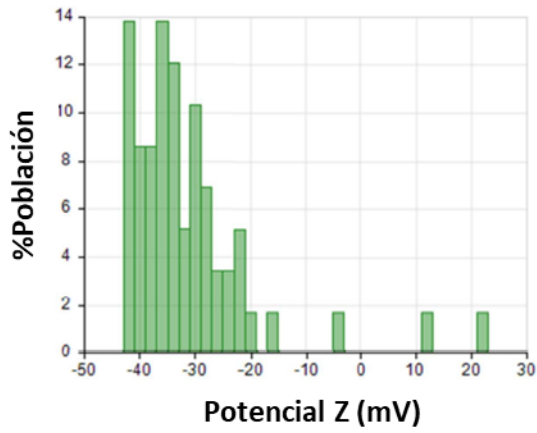
El tamaño de las Np-Ch se evaluó por estos dos distintos métodos, con TRPS se obtuvieron diámetros de 150 nm hasta de 240 nm, comparando con el tamaño que obtuvimos en MET que el promedio fue de 141.9 nm siendo un poco más pequeñas. Sin embargo, en el MET se visualiza un número limitado de Np-Ch, mientras que cientos de Np-Ch se analizan durante las mediciones con el TRPS, por lo cual este tipo de medición sería más precisa.

En resumen, logramos la preparación de las RBD/Np-Ch/Bcl-6, con un 100% de eficiencia de unión de DNA y un 76.5% de eficiencia de unión de proteína RBD, se obtuvo por MET su forma esférica y tamaño de 146.2 nm, para tener un resultado más completo analizamos su tamaño con TRPS donde obtuvimos el tamaño de 240 nm, presentaron carga negativa de -31.2 mV.

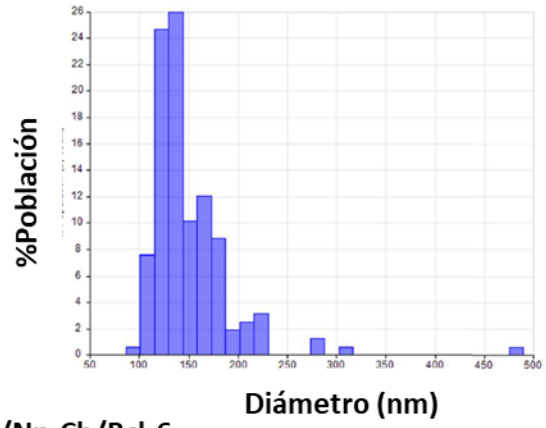
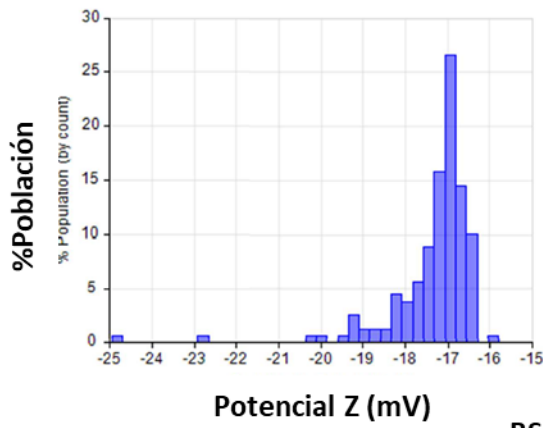
Complejo	Carga (mV)	tamaño (nm)	SD	d90/d10	SPAN
RBD/Np-Ch/Bcl-6	-31.2	240	63.7	2.15	0.75
RBD/Np-Ch	-17.3	164	53.8	2.05	0.83
SpA/Np-Ch/Bcl-6	-17.3	150	43.1	1.59	0.51
SpA/Np-Ch	-66.6	156	21.4	1.43	0.37
BSA/Np-Ch/Bcl-6	-17.6	158	64.5	1.85	0.73
BSA/Np-Ch	-17	174	72.7	2.3	1.06

Tabla 6. Carga y tamaño de los complejos de Np-Ch obtenidas por TRPS. Para los distintos complejos preparados se indica la carga en mili Volts (mV), la media del tamaño en nm, la cuarta columna se observa la desviación estándar de cada grupo, el valor d90/d10 que es la razón entre número de partículas que están al 90% y al 10% del ancho de la distribución la anchura de dispersión y la relación con la anchura de la distribución (SPAN). Los resultados corresponden a la medición de 100 nanopartículas por grupo.

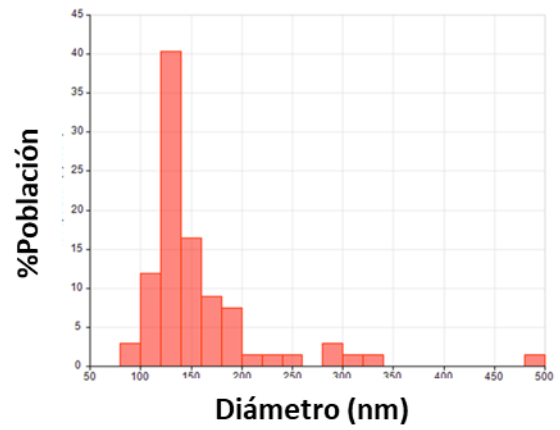
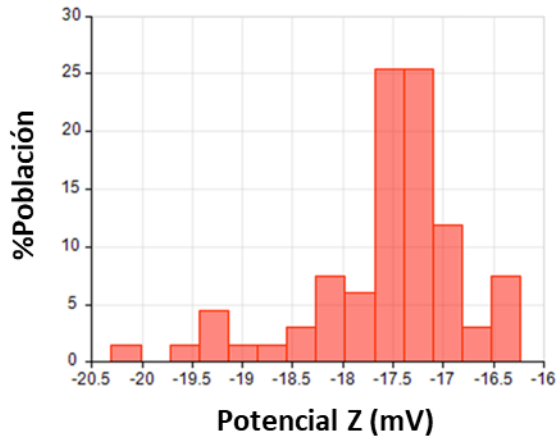
RBD/Np-Ch/Bcl-6



SpA/Np-Ch/Bcl-6



BSA/Np-Ch/Bcl-6



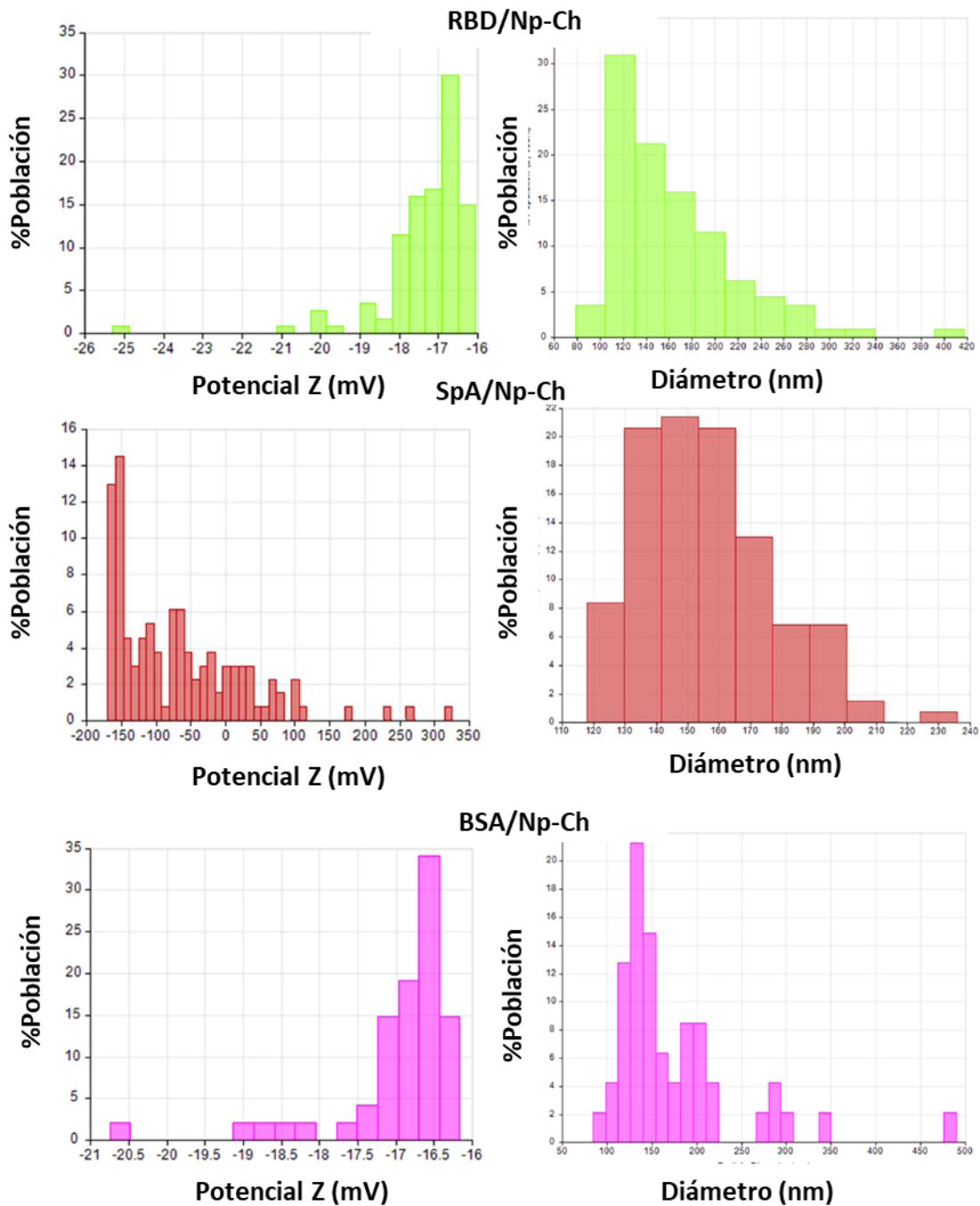


Figura 7. Distribución del potencial Z y tamaño de las diferentes preparaciones de Np-Ch. Se muestran graficas que se obtuvieron de los resultados de TRPS, en el eje Y el porcentaje de población de cada complejo, y en el eje X el potencial Z en mV y en tamaño en nm. Los distintos complejos fueron RBD/Np-Ch/Bcl-6, SpA/Np-Ch/Bcl-6, BSA/Np-Ch/Bcl-6, RBD/Np-Ch, SpA/Np-Ch y BSA/Np-Ch. De cada grupo se analizaron 100 Np-Ch, se realizó un solo experimento, se utilizó el equipo TRPS de IZON y el software versión 1.0.2.32.

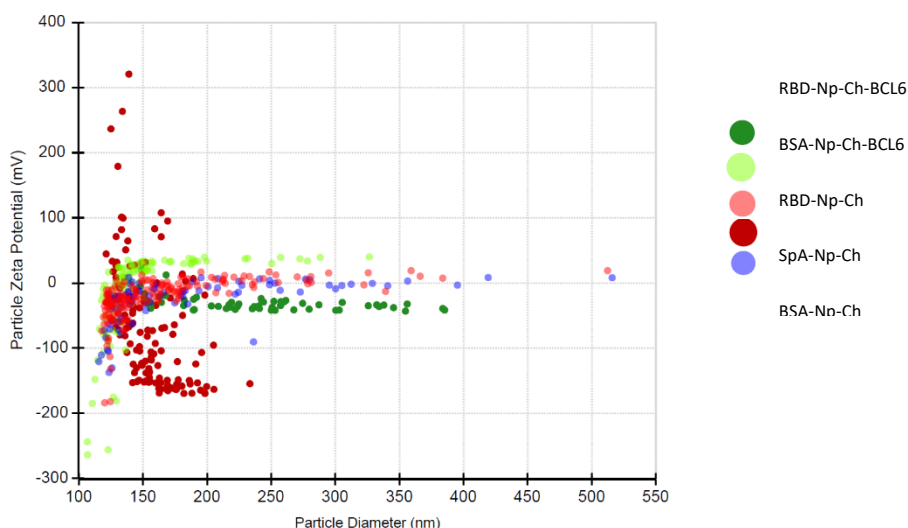


Figura 8. Las Np-Ch tienen carga negativa. Se observa el potencial Z de los distintos complejos de Np-Ch preparados, donde la mayoría tiene una carga negativa y un tamaño de diámetro entre 140 a 200 nm. En el caso de las RBD/Np-Ch/Bcl-6, BSA/Np-Ch y RBD/Np-Ch encontramos mayor dispersión en tamaño, mientras que las SpA/Np-Ch muestran un tamaño más homogéneo. Se analizaron 100 Np-Ch por cada grupo. Se realizó un solo experimento, se utilizó el equipo TRPS de IZON, y el software versión 1.0.2.32.

Objetivo 2. Evaluar la incorporación de las nanopartículas conjugadas a antígeno en células B específicas.

Separación de células B.

Se estandarizó el método para la purificación de células B, partiendo de tubos CPT con 8 mL de sangre cada tubo, se obtuvieron en promedio 1×10^6 células PBMCs por cada 1 mL de sangre y alrededor del 5% de células B a partir de células PBMCs. Estas células nos sirvieron para la estandarización de los protocolos de estimulación de células B. Posteriormente, se obtuvieron paquetes leucocitarios (Buffy Coats) con los que se obtuvo una mayor cantidad de células PBMCs, 3×10^6 por cada mL de sangre, así como una mayor cantidad de células B 5×10^5 por mL (Figura 9).

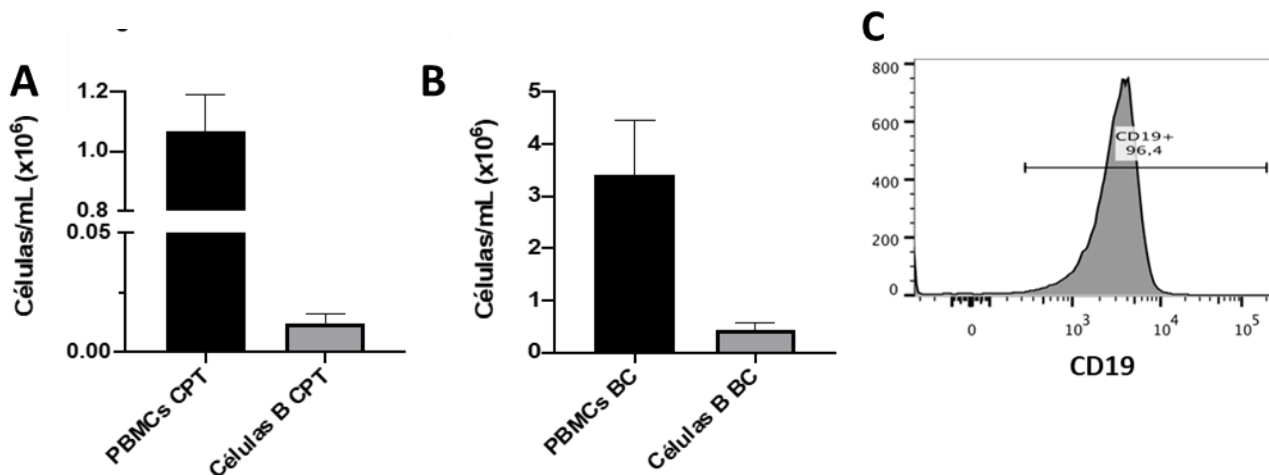


Figura 9. Separación de PBMCs y de células B a partir de tubos CPT y de buffy coats. Concentración de PBMCs y células B por mL de sangre obtenidas a partir de tubos CPT (A) y a partir de Buffy Coats (B). Los datos representan la media +/- desviación estándar, 7 muestras de tubos CPTs y 5 Buffy Coats. C. Porcentaje de pureza del enriquecimiento de las células B analizado por citometría de flujo utilizando el marcador CD19⁺ de células B.

Incorporación de Np-Ch en células B

Se evaluó la incorporación de las Np-Ch en las células B incubándolas con Np-Ch-FITC, y evaluando la frecuencia de células fluorescentes (FITC⁺) por citometría de flujo. Las BSA/Np-Ch-FITC se utilizaron como control negativo, esperando que no entraran a las células por medio del BCR y nos podrían dar un estimado de la cantidad de Np-Ch que entran inespecíficamente. Como control positivo utilizamos SpA/Np-Ch-FITC que como se ha mencionado, SpA es un super antígeno activando a las células B. Cuando incubamos las células B con las Np-Ch-FITC durante 8 horas a una concentración de 2 µg/mL el porcentaje de incorporación de las SpA/Np-Ch-FITC (47.95 ±10 %) fue mayor que con las BSA/Np-Ch-FITC (3.16 ±2.4 %), y con las RBD/Np-Ch-FITC (15.15 ±16.6 %). Estos resultados coinciden con lo esperado, ya que las SpA/Np-Ch-FITC por ser un super antígeno se incorporaría en mayor cantidad a las células B, mientras que las BSA/Np-Ch-FITC por contener un antígeno convencional se esperaría una incorporación baja en las células B. El porcentaje de incorporación de RBD/Np-Ch-FITC nos pudiera indicar que se incorporaron de forma específica de antígeno, ya que el cultivo de células B pertenecían a voluntarios que ya habían presentado la enfermedad de COVID-

19 y por ende tenían células que presentaban los BCR para el antígeno RBD.

Adicionalmente, se probó con una concentración mayor de Np-Ch ($4 \mu\text{g/ml}$) incubando por 8 horas. Encontramos que las BSA/Np-Ch-FITC entraron en un $37.7 \pm 29 \%$ de las células, las SpA/Np-Ch-FITC en $43.7 \pm 50\%$ y las RBD/Np-Ch-FITC en $71.35 \pm 6 \%$. Esto nos puede indicar que al aumentar la concentración de las Np-Ch aumenta la probabilidad de que estas entren a las células de manera no específica. También evaluamos la incorporación de las Np-Ch a las 24 horas con estas dos mismas concentraciones $2 \mu\text{g/ml}$ y $4 \mu\text{g/ml}$ y se obtuvo una incorporación mayor en todos los casos de los complejos, esto nos dice que al incrementar el tiempo de incubación de las Np-Ch en el cultivo tienden a incorporarse o bien pudieran estar adhiriéndose a las células. Por lo cual interpretamos que la mejor condición probada para la incorporación específica de las Np-Ch es a las 8 horas utilizando $2 \mu\text{g/mL}$ (Figura 10 y 11).

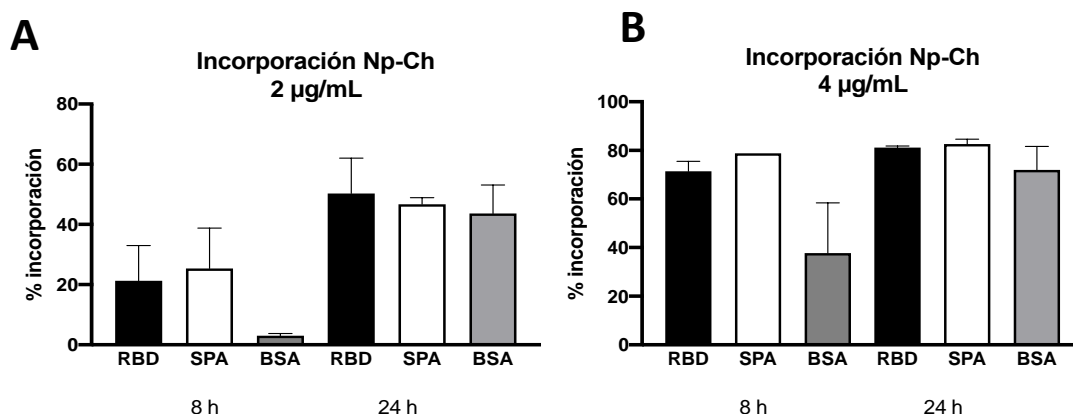


Figura 10. La especificidad de la incorporación de Np-Ch en las células B disminuye conforme la concentración de las Np-Ch y el tiempo de incubación aumentan. Las células B fueron incubadas con $2 \mu\text{g/mL}$ (A) y $4 \mu\text{g/mL}$ (B) de RBD/Np-Ch-FITC, BSA/Np-Ch-FITC, SpA/Np-Ch-FITC y evaluado el % de células B FITC⁺ a las 8 y 24 horas por citometría de flujo. Los datos representan la media \pm desviación estándar, de dos experimentos con dos réplicas cada uno.

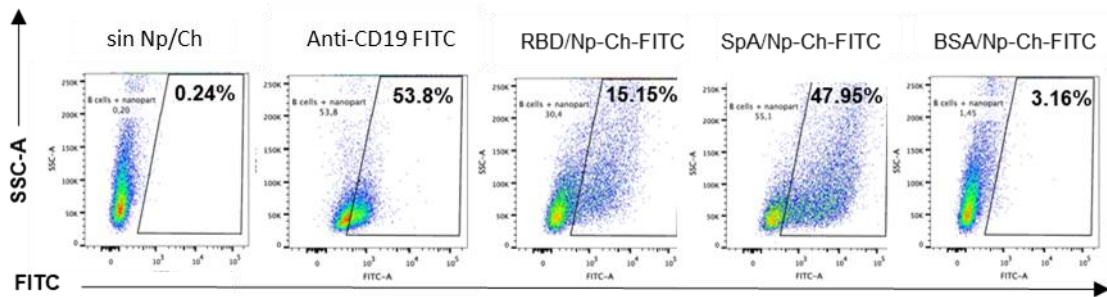


Figura 11. Las Np-Ch son incorporadas por células B específicas. Plots representativos del análisis de la incorporación de RBD/Np-Ch-FITC en células B por FACS a las 8 h empleando 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Np-Ch. Se emplearon como controles células sin Np-Ch (negativo) y células B marcadas con anticuerpo anti-CD19 FITC (positivo).

Para corroborar si las RBD/Np-Ch-FITC se encontraban dentro de la célula y no solo adheridas en su membrana, se evaluó por microscopía confocal. Se observó fluorescencia en los diferentes cortes analizados (Figura 12), por lo que estos resultados sugieren que las Np-Ch/FITC con proteína RBD se encontraban en toda la célula, tanto en la membrana celular como en citoplasma, por lo cual es probable que sean internalizadas por las células B.

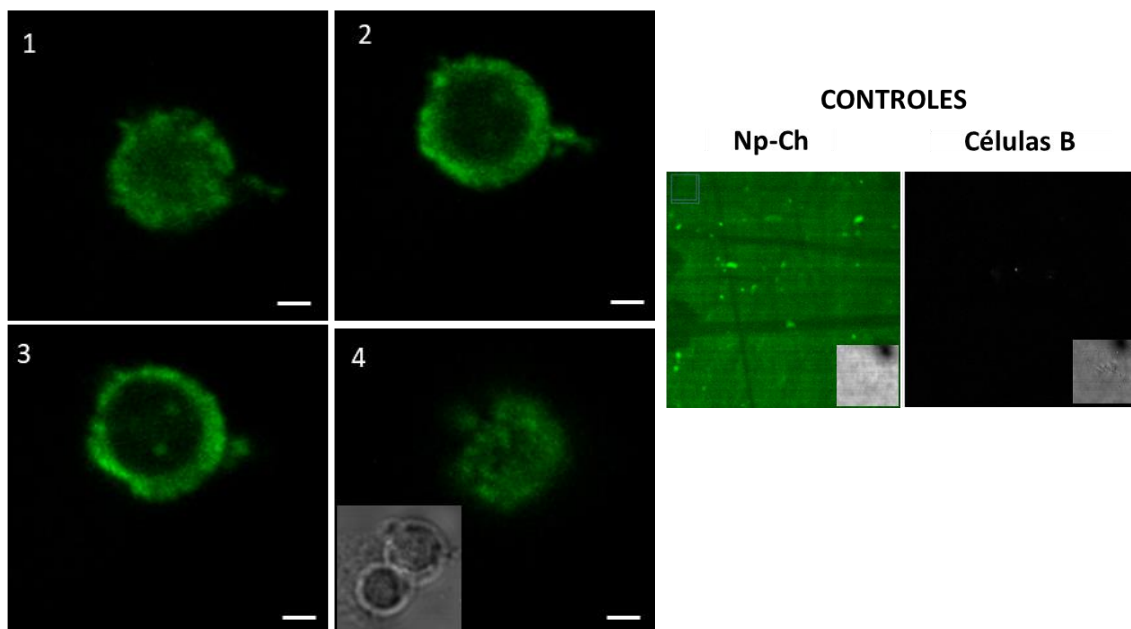


Figura 12. Análisis de la incorporación de las RBD/NP-Ch-FITC en células B humanas. Fotografías representativas de la microscopía confocal de las células B que fueron estimuladas RBD/Np-Ch-FITC (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a las 8 h, se muestran distintos cortes de imagen. En el recuadro

inferior derecho se observa una imagen en contraste de fases tomada en el mismo campo. Como control negativo se emplearon células B sin Np-Ch. Barra de escala de 2 μm . Para su análisis se utilizó Fiji ImageJ

Viabilidad celular

Para evaluar la viabilidad de las células B después de la exposición a Np-Ch se realizaron ensayos de MTS/PMS, utilizando dos concentraciones de RBD/Np-Ch/Bcl-6 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, incubando con células B durante 24 horas (Figura 13). Posteriormente, se repitió el procedimiento alargando el periodo de incubación con las Np-Ch hasta 7 días, donde observamos que Bcl-6 induce la proliferación y supervivencia celular, ya que las células B tienden a proliferar más cuando están en presencia de antígeno unido a Np-Ch que contienen el vector codificante para Bcl-6, que cuando tienen el vector vacío o sin Np-Ch (Figura 13).

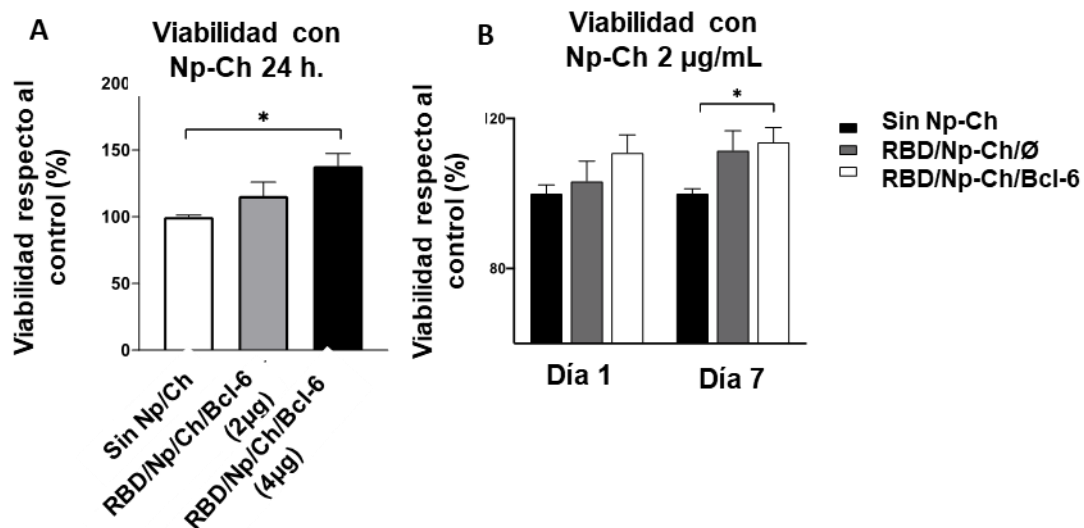


Figura 13. Viabilidad de las células B en presencia de Np-Ch. **A.** Porcentaje de viabilidad de células B en presencia de RBD/Np-Ch/Bcl-6 utilizando 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ comparando con células sin Np-Ch. Observamos que aumenta la proliferación de células B conforme aumentamos la concentración de RBD/Np-Ch/Bcl-6. **B.** Porcentaje de viabilidad de las células B en presencia de RBD/Np-Ch/Bcl-6 y RBD/Np-Ch/ \emptyset utilizando 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ comparando con células sin Np-Ch. Observamos que aumenta la proliferación de células B en presencia de RBD/Np-Ch/Bcl-6. Los datos representan la media \pm desviación estándar de dos experimentos, con 4-5 réplicas cada uno. * $P < 0,05$; Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn.

Expresión de Bcl-6 en células HEK-293T

Se corroboró la expresión del gen Bcl-6, transfectando en células HEK-293T como se describió en los métodos. Se observaron células transfectadas después de 24 horas de cultivo con el constructo pIRES2-EGFP/Bcl-6, tras la observación de la expresión de la proteína EGFP en el microscopio de fluorescencia (Figura 14A). Dado que el gen codificante para EGFP se encuentra unido a la secuencia IRES río arriba de la región codificante para Bcl-6, interpretamos que, si EGFP se expresó, Bcl-6 también debió de ser expresado. Para demostrar directamente la expresión de Bcl-6, realizamos citometría de flujo a las células transfectadas y las marcamos con el anticuerpo anti-Bcl-6-PE. Observamos que la eficiencia de la transfección fue baja, pues menos de 30% de las células expresaban EGFP, y en aquellas transfectadas con el vector codificante de Bcl-6, se pudo detectar la expresión de esta proteína, aunque con baja frecuencia, a diferencia de las transfectadas con el vector vacío, en cuyo caso la expresión de Bcl-6 fue nula (Figura 14).

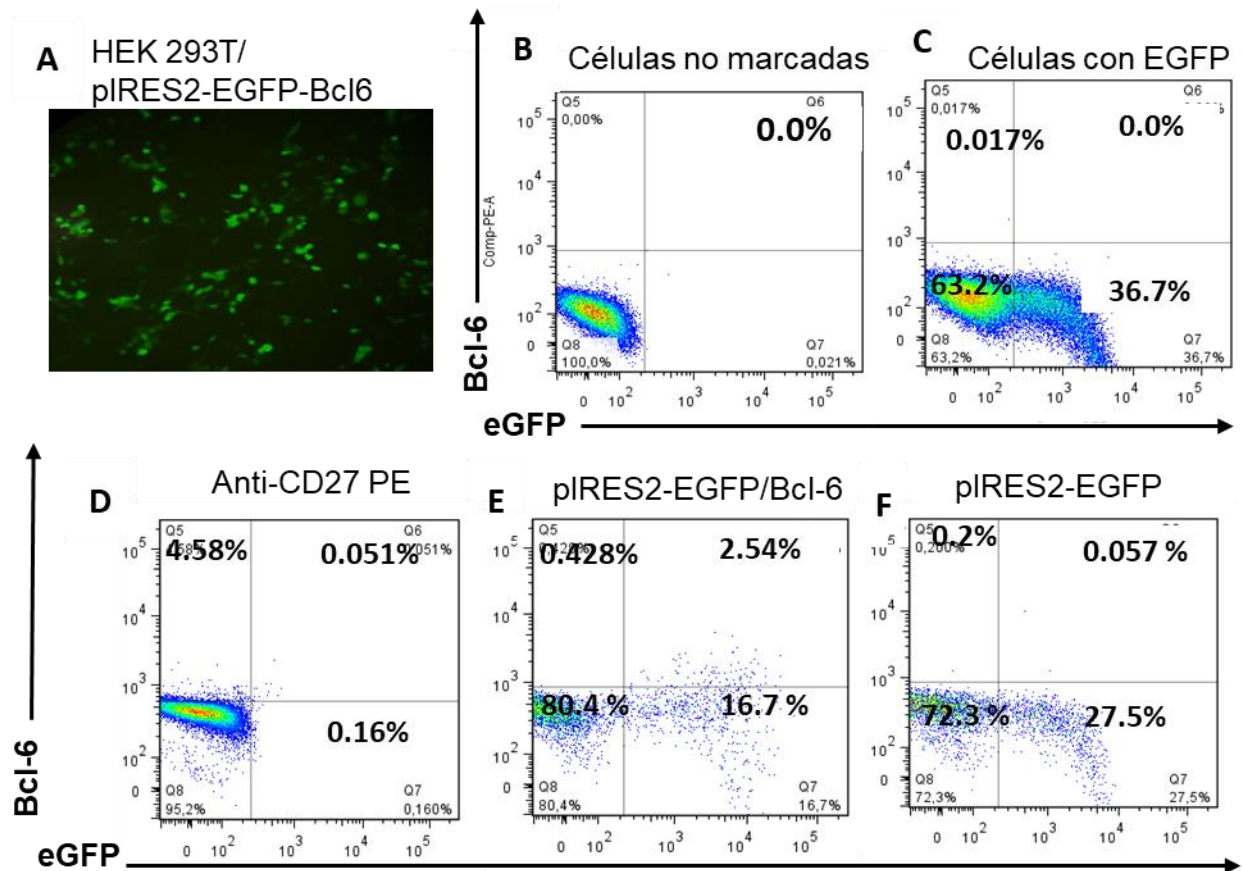


Figura 14. Expresión de Bcl-6 en células HEK-293T transfectadas. A. Células HEK-

293T a las 24 horas de transfección con el constructo pIRES2-EGFP/Bcl-6 observado en microscopio de fluorescencia. Análisis de la expresión de EGFP y Bcl-6 en células sin transfectar (control negativo) (**B**), células transfectadas con la proteína eGFP (control positivo) (**C**), células B marcadas con ficoeritrina (PE) (control positivo para tinción intracelular) (**D**), células HEK-293T transfectadas con pIRES2-EGFP/Bcl-6 marcadas con el anticuerpo anti-Bcl-6-PE (**E**), células HEK-293T transfectadas con pIRES2-EGFP marcadas con anti-Bcl-6-PE (**F**), por citometría de flujo. Solo se realizó un experimento por duplicado. En el caso de la transfección se realizaron 3 experimentos por separado cada experimento por triplicado.

Objetivo 3. Comparar la eficacia en la generación de anticuerpos contra SARS-CoV-2 entre células B estimuladas con las nanopartículas RBD/Np-Ch/Bcl-6 y con el antígeno soluble.

Estimulación de células B con RBD soluble.

De los distintos protocolos de estímulos que probamos (Tabla 4), algunos se encontraron en la literatura y otros se generaron a partir de nuestra experiencia. Los protocolos contienen un coctel de citocinas que incluye la estimulación proporcionada por las FDC (presentación de antígenos BAFF) y células THF (CD40L, IL-4, IL-21) como se producen *in vivo*. En algunos protocolos se incluyeron células no B que corresponden a las células mononucleares obtenidas durante la separación de las células B. Al cuarto día de cultivo en todos los protocolos se observó que había mayor agregación celular comparada con el cultivo que no contenía estímulos de ningún tipo (control). Los protocolos se probaron sin antígeno y con antígeno, observando en todos los cultivos estimulados con el coctel de citocinas, que aún en ausencia de antígeno ocurría la formación de rosetas. Seleccionamos como mejor protocolo aquel que contiene IL-4, IL-21, IL-2, BAFF, CD40L y células no B, ya que con esta mezcla de nutrientes las células sobrevivían por más tiempo en cultivo y había más formación de rosetas (Figura 15).

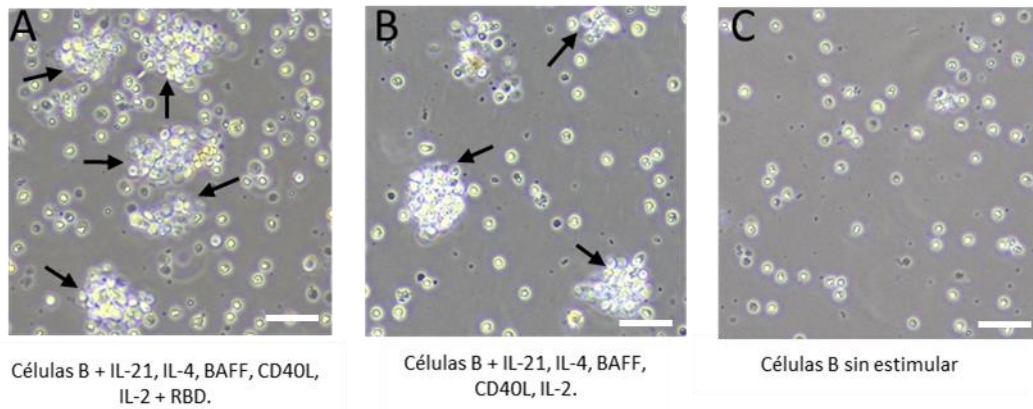


Figura 15. Estimulación de las células B *in vitro*. Las células B fueron cultivadas en medio RPMI adicionado con SFB 10% y estimuladas por 4 días con IL-21, IL-4, BAFF, IL-2 y RBD (A), IL-21, IL-4, BAFF, IL-2 sin RBD (B), o mantenidas sin estimulación (C). Se observa la formación de rosetas (flechas) que corresponden a agregados de células en proliferación. Magnificación 20X, barra de escala 50 μ m.

Estimulación de las células B con nanopartículas.

Posteriormente, se procedió a estimular el cultivo con el antígeno unido a Np-Ch es decir RBD/Np-Ch comparándolo con el cultivo que contenía RBD soluble. Dejamos el cultivo durante 7 días, al tercer día se agregó más medio con el correspondiente de estímulos y observamos una formación de rosetas desde el cuarto día (Figura 16 B) comparada con el cultivo que contenía RBD de forma soluble, ambos protocolos presentaban mayor número de rosetas que el cultivo control que

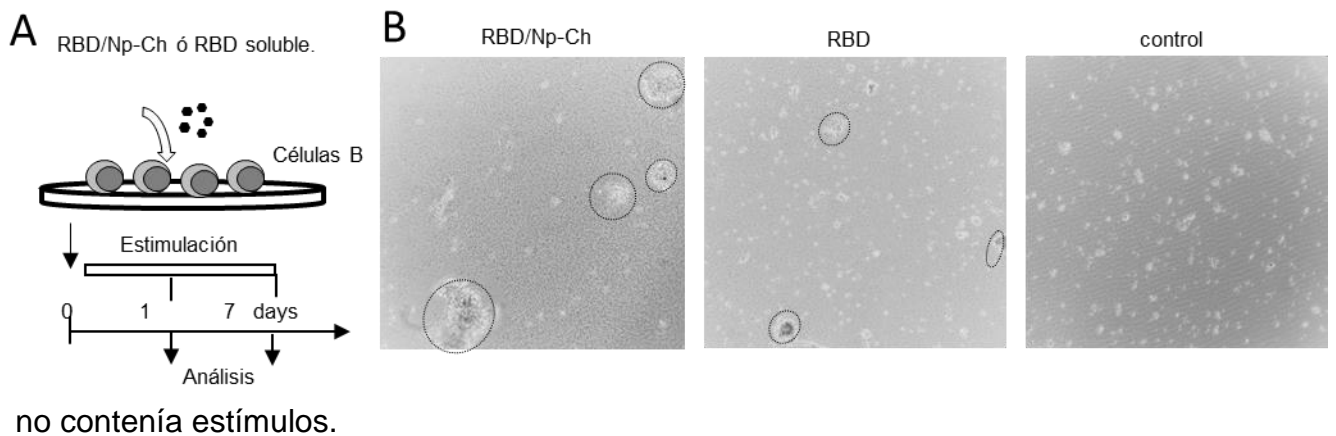


Figura 16. Cultivo de células B estimuladas con RBD/Np-Ch. **A.** Se observa el esquema de estimulación de células B con antígeno RBD soluble y con RBD/Np-Ch, dejando el cultivo con estímulos hasta por 7 días. **B.** Fotografías del cultivo al cuarto día de estimulación con IL-2, IL-4, IL-21, BAFF, CD40L y células no B, se adicionó el antígeno unido a las nanopartículas (RBD/Np-Ch, panel de la izquierda) o de forma soluble (panel central). En el panel de la derecha se muestra el cultivo control que no contiene estímulos ni antígeno (control negativo). La formación de rosetas se identifica con un círculo.

Se estimularon las células B y PBMCs en presencia de estímulos (IL-4, IL-21, BAFF, CD40L, IL-2 y células no B) y se analizó por ELISA la producción de anticuerpos IgG totales y anti-RBD en los sobrenadantes de las células estimuladas y sin estimular. Los resultados de IgG total nos indicaron que las células producen anticuerpos IgG y el ensayo de ELISA para RBD nos muestra los anticuerpos específicos contra el dominio RBD de SARS-CoV-2. Para el límite de detección se analizaron 10 muestras blanco y se obtuvo el promedio más 3 veces la desviación estándar de los blancos, mientras que para el límite de cuantificación se obtuvo el promedio de los blancos más 10 veces la desviación estándar del blanco.

Se realizó una prueba preliminar para la estimulación con las Np, empleando tres de los protocolos que favorecían más la sobrevivencia de las células, estimulando PBMCs con el coctel de citocinas correspondiente (Tabla 4) y RBD soluble o acoplado a las RBD/Np-Ch/Bcl-6. Encontramos que la producción de IgG total era más alta con uno de los protocolos en comparación con los otros, además de que al parecer algunos protocolos favorecen más la estimulación al añadir las Np-Ch que con el antígeno soluble (Figura 17).

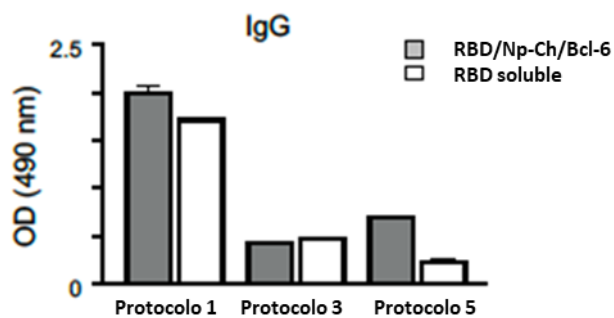


Figura 17. Anticuerpos anti-IgG presentes en el sobrenadante del cultivo de células

PBMCs estimuladas con RBD. Determinación de la IgG total en sobrenadantes de cultivo de células PBMCs estimuladas con RBD/Np-Ch/Bcl-6 y RBD soluble (día 7), probando 3 protocolos diferentes, protocolo 1 contiene IL-2, IL-4, IL-21, BAFF y CD40L, protocolo 2 que contiene IL-4, BAFF y CD40L y el protocolo 5 que contiene IL-2, IL-4, IL-21 y CD40L analizadas por ELISA a una densidad óptica de 490 nm. Resultados de un solo experimento cada muestra por triplicado.

Primeramente, se realizó un análisis longitudinal de la estimulación en PBMCs para determinar a partir de qué día podíamos detectar producción de anticuerpos. Se emplearon diferentes preparaciones de Np-Ch y se comparó la producción de anticuerpos totales entre las células con antígeno soluble (RBD y SpA) y con Np-Ch (RBD/Np-Ch/Bcl-6 y SpA/Np-Ch/Bcl-6). Se tomaron sobrenadantes a los 3, 5 y 10 días (Figura 18). Los resultados mostraron que tras la estimulación hubo producción de anticuerpos IgG totales en todos los casos, detectable a partir del día 3 y hasta el día 1 con una tendencia a ser mayor al día 5 (Figura 18). Al comparar la estimulación de SpA con la de las SpA/Np-Ch/Bcl-6 se observó una tendencia a mayor producción de IgG en las células estimuladas con las Np. Sin embargo, en el caso de RBD, la detección de IgG total fue similar al estimular con el antígeno soluble o con las Np a los días 3 y 5, mientras que al día 10 se detectó mayor producción de IgG en el caso del antígeno soluble.

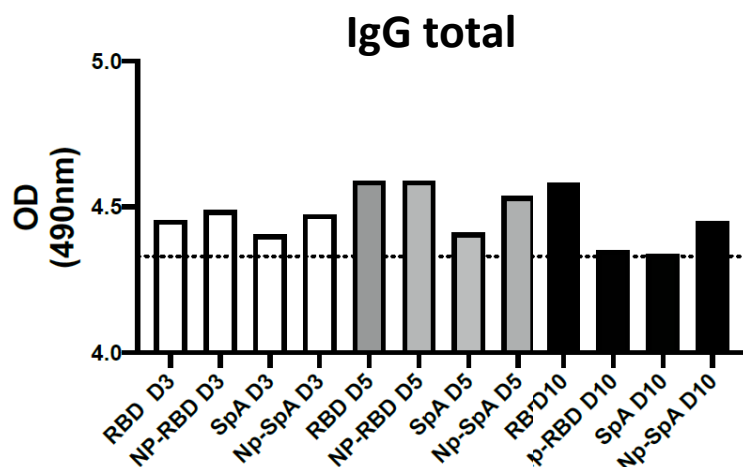


Figura 18. Detección de anticuerpos IgG totales en sobrenadantes de cultivo de PBMCs estimuladas. ELISA para IgG total de sobrenadantes de las células PBMCs estimuladas con el protocolo 7 y con RBD/Np-Ch/Bcl-6, RBD soluble, Np-Ch/Bcl6/SpA y SpA

soluble, al día 3, día 5 y día 10. La línea punteada muestra el punto de corte el cual se obtuvo con las desviaciones estándar de las muestras control que fueron medio RPMI. Resultados de un experimento.

Una vez que verificamos que había producción de anticuerpos en las células estimuladas, realizamos el ensayo de ELISA contra RBD en los sobrenadantes de las PBMCs. En presencia de SpA soluble se observó mayor producción de anticuerpos anti-RBD que cuando el antígeno se encontraba unido a las Np-Ch. Al comparar las RBD/Np-Ch/Bcl-6 con el RBD soluble no se observaron diferencias, Se observó, como era de esperarse, que la estimulación con el superantígeno SpA indujo mayormente la producción de anticuerpos contra RBD en comparación con la estimulación con el antígeno específico (Figura 19).

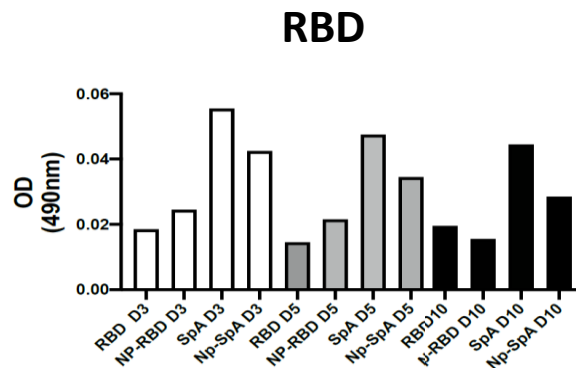


Figura 19. Detección de anticuerpos anti-RBD en sobrenadantes de cultivo de PBMCs estimuladas. ELISA para RBD de sobrenadantes de las células PBMCs estimuladas con el protocolo 7 (IL-2, IL-4, IL-21, BAFF y CD40L) y con antígeno Np-Ch/Bcl6/RBD, RBD soluble, Np-Ch/Bcl6/SpA y SpA soluble, al día 3, día 5, y día 10. El punto de corte es de DO ≥ 0.01 que fue obtenida con las muestras blanco que fueron medio RPMI. Se realizo solo un experimento cada muestra por triplicado.

Posteriormente, se realizó la estimulación en células B. Se sembraron y estimularon con Np-Ch/RBD, RBD soluble, SpA soluble, Np-Ch/SpA en medio RPMI y los estímulos correspondientes al protocolo 7. Se dejaron proliferar 7 días, se tomó el sobrenadante y se realizó el ensayo de ELISA tanto para IgG total como para RBD.

En todas las condiciones estimuladas hubo producción de anticuerpos IgG totales incluyendo en aquellas células en las que no se adicionó antígeno, en especial al estimular con SpA (Figura 20 panel A). Por otro lado, en el caso de la ELISA para RBD, se observó la producción de anticuerpos específicos para RBD cuando las células B se crecieron con el protocolo que contiene IL-2, IL-4, IL-21, BAFF, CD40L, células no B, y cuando el antígeno estaba unido con Np-Ch, comparado con la estimulación con antígeno soluble (Figura 20 panel B).

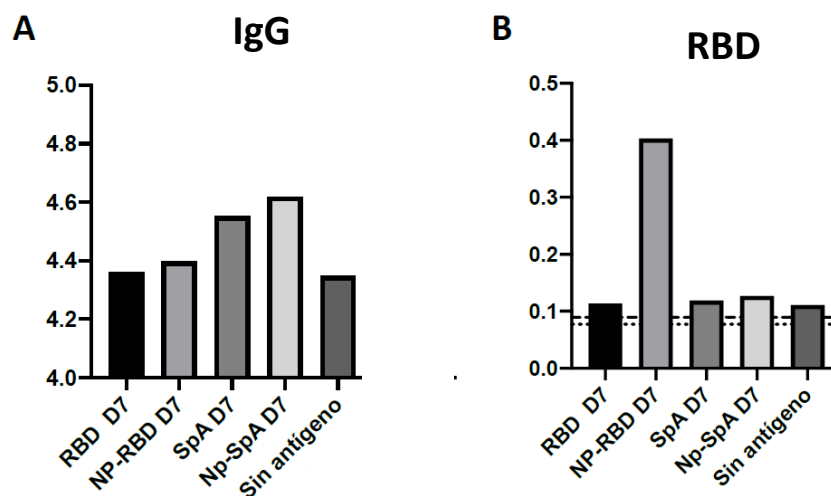


Figura 20. Detección de anticuerpos IgG totales y anti-RBD en los cultivos de células B humanas estimuladas. **A.** Determinación de anticuerpos IgG producidos en células B estimuladas con el protocolo 7 y con Np-Ch/RBD, RBD soluble, Np-Ch/SpA y SpA soluble, a los 7 días de estimulación, analizados por ELISA. **B.** Anticuerpos contra RBD de células B estimuladas con el protocolo 7 y con Np-Ch/RBD, RBD soluble, Np-Ch/SpA y SpA soluble, a los 7 días. Resultados de un experimento por duplicado.

Detección de células productoras de anticuerpos por ELISPOT.

Para determinar la presencia de células secretoras de anticuerpo se realizó la técnica de ELISPOT en las células B. Primero estandarizamos la cantidad de células para el control positivo (Figura 21), donde observamos que con 25,000 células hay formación de spots y los campos no se observan tan saturados como con concentraciones mayores de células, por lo que decidimos ocupar esa cantidad para los futuros ensayos. También evaluamos células B estimuladas con el protocolo seleccionado (IL-2, IL-4, IL-21, BAFF, CD40L y células no B), con antígeno soluble y en Np-Ch. Para ello sembramos 2.5×10^4 células por pozo para

RBD y para el control positivo, por duplicado. Al revelar la placa de ELISPOT se observó la formación de spots en todos los controles positivos (Figura 22 A). Mientras que para el ensayo de ELISPOT para RBD el cultivo estimulado no presentó spots (Figura 22 B), por lo que decidimos aumentar la densidad de células.

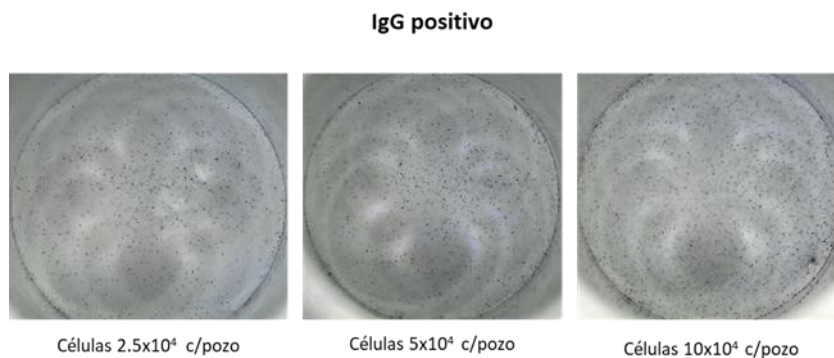


Figura 21. Estandarización del ensayo de ELISPOT. Para el control IgG positivo se utilizaron distintas concentraciones de células B: 2.5×10^4 , 5.0×10^4 y 10×10^4 en cada pozo, se realizó un solo experimento por duplicado.

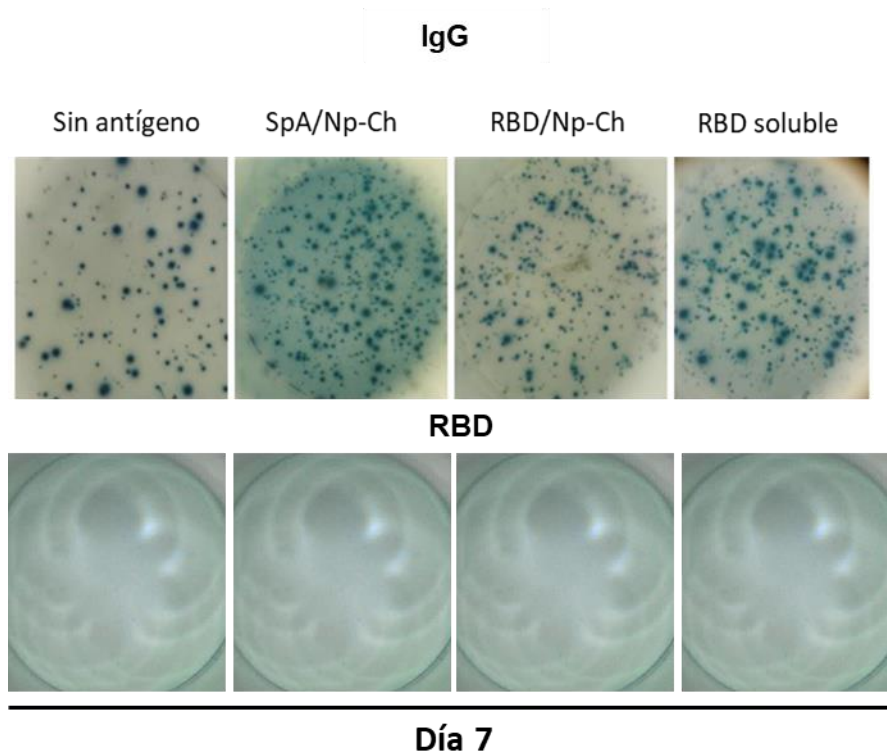


Figura 22. Detección de células secretoras de anticuerpos IgG totales y anti-RBD a partir de células B estimuladas. Ensayo de ELISPOT que muestran los spots formados por las células B estimuladas con el protocolo que contiene IL-21, IL-4, IL-2, BAFF, CD40L

y células no B, al día 7. El cultivo celular se estimuló con antígeno SpA/Np-Ch, RBD/Np-Ch, y RBD soluble. En los paneles superiores se observa la detección de células secretoras de IgG total, mientras que en los paneles inferiores observamos que no hubo detección de células productoras de anticuerpos anti-RBD. Solo se realizó un experimento por duplicado. Las fotos fueron tomadas con Digital Microscope RoHS.

Al no detectar spots en la ELISPOT de RBD, aumentamos el número de células B a una densidad de 1×10^5 para la detección de anticuerpos específicos y probamos otros protocolos de estimulación encontrados en la literatura (Tabla 7). Probamos estimular el cultivo con antígeno RBD soluble, dejamos el cultivo durante 7 días y observamos la formación de rosetas más robustas comparadas cuando el cultivo de células no contenía estímulos ni antígeno (Figura 23), en el protocolo 7 se muestra un gran número de células y la formación de 2 a 3 rosetas por campo, mientras que en los protocolos 8 y 9 la mayoría de células estaban formando rosetas. Al realizar el ensayo de ELISA del sobrenadante obtuvimos que había producción de anticuerpos contra RBD en el cultivo de células que contenían el protocolo de estimulación 2, del trabajo de Su, 2016 (Figura 24) mientras que en los otros protocolos no presentaron absorbancias positivas.

En el ensayo de ELISPOT observamos que las células B estimuladas con el protocolo 7 que es el protocolo seleccionado anteriormente propuesto por nosotros que contiene IL-2, IL-4, IL-21, BAFF, CD40L y células no B, presentó spots en la muestra de IgG positivo es decir que el cultivo sí produjo células productoras de anticuerpos, mientras que, en la muestra problema que es para RBD positivo también mostró la formación de spots, aunque en una menor cantidad comparada con el control. Para el protocolo 9 de (Roh et al., 2018) que contiene IL-4, BAFF, IL-21 y CD40L donde IL-21 se agrega al tercer día de estimulación y es restituida por IL-4, contiene un significativo número de spots comparado con el control IgG positivo el cual también tiene un gran número de spots, lo que nos puede indicar que las células estimuladas con este protocolo y con el antígeno RBD está produciendo anticuerpos específicos contra RBD. En el caso del protocolo 8 (Su et al., 2016) que incluye IL-2, IL-4, IL-21, BAFF y CD40L la diferencia con el 9 es que la citocina IL-21 se agrega desde el inicio del cultivo y al cuarto día se agrega

más medio con el estímulo correspondiente, observamos en las imágenes que se aprecian la formación de spots para RBD positivo, y una mayor cantidad de spots para el control IgG positivo. Los protocolos 8 y 9 utilizados mostraron un mayor número de spots comparado con el protocolo 7, esto pudo ser porque se agregó la misma cantidad de células en todos los protocolos, pero en el caso del protocolo 7 tenía una menor cantidad de células B porque incluía también células no B, y como resultado un menor número de spots (figura 25).

Referencia	Protocolo	IL-2	IL-4	IL-21	BAFF	CD40L	Cel No B
Este trabajo	7						
Su, 2016	8						
Roh, 2018	9						

Tabla 7. Protocolos de estimulación para células B. Se observan protocolos de estimulación encontrados en la literatura, el estímulo IL-21 en el protocolo de Su, 2016 se agrega desde el primer día de cultivo, mientras que en el protocolo de Roh, 2018 se agrega al tercer día y es sustituido por IL-4. El primer protocolo es propuesto por nosotros mencionado anteriormente.

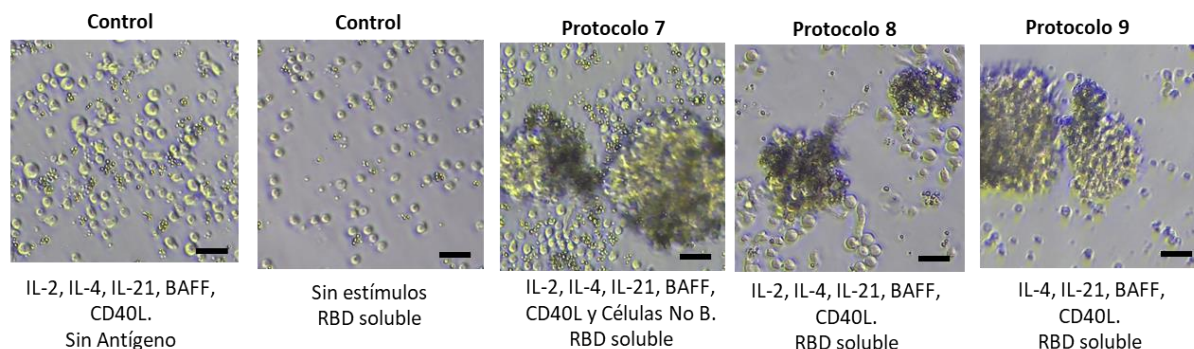


Figura 23. Las células B forman rosetas en presencia de estímulos y antígeno RBD soluble. Se observan el cultivo de células B con los distintos protocolos utilizados de la tabla 7 y con RBD soluble. El protocolo 7 propuesto por este trabajo, contiene IL-2, IL-4, IL-21, BAFF, CD40L y células No B, el protocolo 8 de Su, 2016 contiene IL-2, IL-4, IL-21, BAFF y CD40L, el protocolo 9 de Roh, 2018 contiene IL-4, IL-21, BAFF y CD40L. Como controles fueron cultivo celular con estímulos sin antígeno y cultivo celular sin estímulos y con antígeno. Barra de escala de 100 µm.

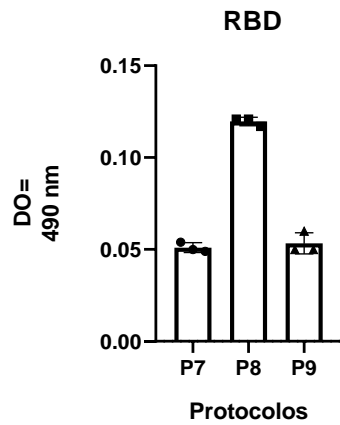


Figura 24. El cultivo de células B en presencia del protocolo 8 produjo anticuerpos anti RBD. Se observa los resultados del ensayo de ELISA de los sobrenadantes del cultivo estimulado con los distintos protocolos 7, 8 y 9 descritos en la tabla 7 Resultados de un solo experimento por triplicado.

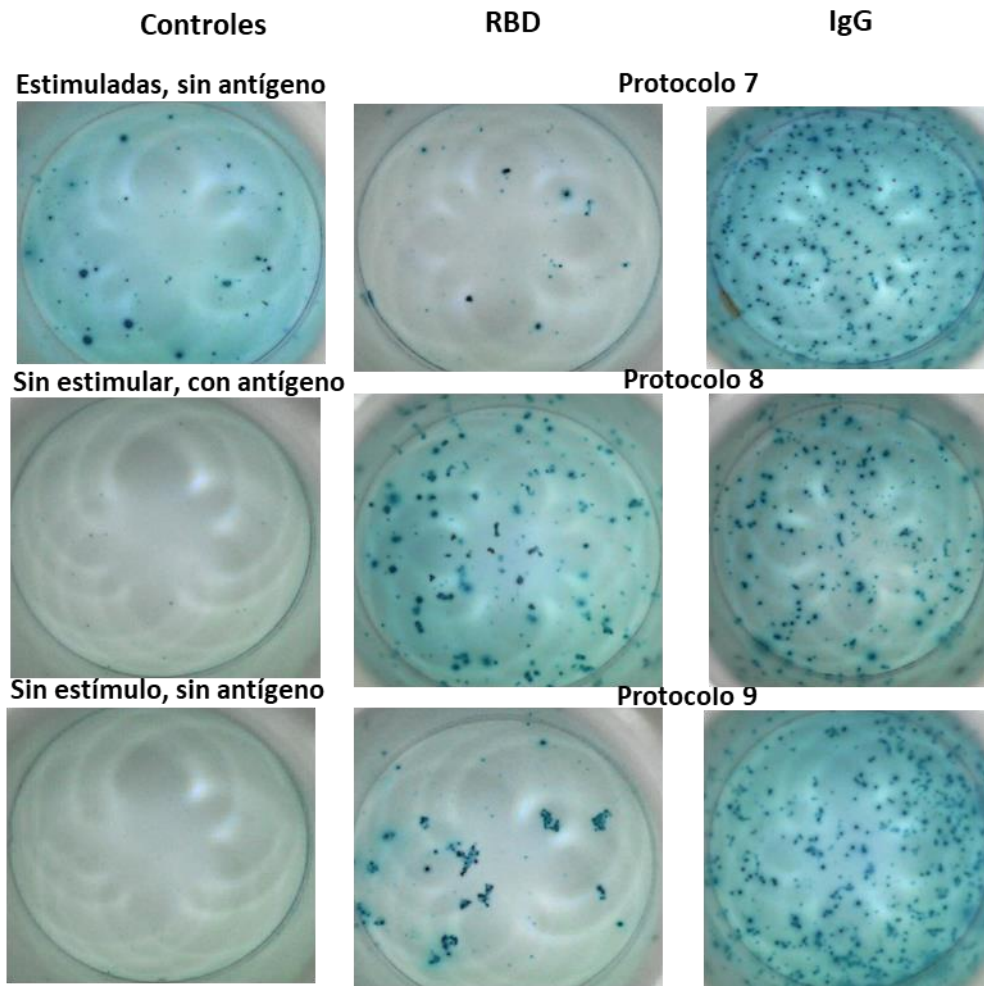


Figura 25. Spots formados por células en cultivo con estímulos y RBD soluble. Se

observan la formación de spots formados por las células en cultivo estimuladas con 3 distintos protocolos, protocolo 7 propuesto por nosotros, que contiene IL-2, IL-4, IL-21 (agregada al tercer día de cultivo), BAFF, CD40L, y células no B. Protocolo 9 de (Roh et al., 2018) que contiene IL-4, BAFF, IL-21 (agregada y restituida por IL-4 al tercer día de cultivo), CD40L, y protocolo 8 de (Su et al., 2016) que contiene IL-2, IL-4, IL-21, BAFF y CD40L. Se incubaron las células B por 7 días, se tomaron las células y se sembraron en la placa de ELISPOT. Se fijó el antígeno RBD e IgG como control positivo en la placa de ELISPOT. Se realizó solo un experimento, sin replicas. Las fotos fueron tomadas con Digital Microscope RoHS.

Se prosiguió a realizar el ensayo de ELISPOT a las células en cultivo estimuladas con IL-2, IL-4, IL-21, BAFF CD40L, células no B y con RBD/Np-Ch. Se observaron spots tanto para IgG positivo como para RBD, aunque se observa una menor cantidad de spots comparada con el antígeno soluble. Sin embargo, seguimos trabajando en ello, debido a que solo se ha realizado un experimento sin réplicas todavía. Hasta ahora los resultados muestran que el cultivo de células B estimulado con las distintas citocinas producen células productoras de anticuerpos específicos de antígeno, y que cuando el cultivo esta estimulado con RBD/Np-Ch también hay formación de spots para IgG positivo como para RBD positivo.

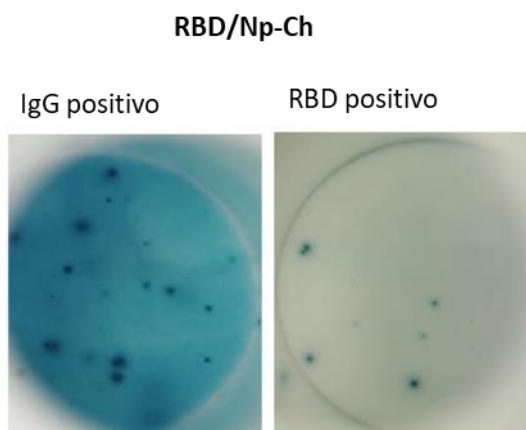


Figura 26. Formación de spots en cultivo de células B estimuladas con RBD/Np-Ch. Se observan los spots formados por las células que estaban cultivadas con IL-2, IL-4, IL-21 BAFF, CD40L y células no B. Y el antígeno en RBD/Np-Ch. Hubo formación de spots para IgG positivo (control) como para RBD. Se utilizaron 1×10^5 células, se realizó un solo experimento sin replicas. Las fotos fueron tomadas con Digital Microscope RoHS.

DISCUSIÓN

En general el uso de las Np como medio de transporte o vacunas han arrojado beneficios como lo es la presentación de antígenos multivalentes y la administración coordinada de antígenos y adyuvantes (Chattopadhyay et al., 2017). Algunos de los materiales que habitualmente se utilizan para su preparación son los polímeros, éstos tienen una gran ventaja ya que permiten una liberación controlada de biomoléculas, la cual se regula con la composición del polímero y el peso molecular (Li et al., 2001). En el caso del quitosán, un polímero derivado de la quitina, tiene la facilidad de modificación de la forma y tamaño deseable (Akagi et al., 2011). Además de que su preparación es sencilla y de bajo costo, por lo cual este material fue seleccionado en este proyecto para la preparación de Np-Ch como medio de transporte de proteínas y DNA.

En este trabajo se logró la preparación y la caracterización de diversas preparaciones de Np-Ch con la finalidad de evaluar la capacidad de entrar en células B específicas. Nuestro interés principal fue la generación de Np-Ch conjugadas con un antígeno de SARS-CoV-2 y con un plásmido codificante para Bcl-6 (RBD/Np-Ch/Bcl-6), con el objetivo de favorecer la activación de las células B específicas y para la obtención de anticuerpos anti-SARS-CoV-2. Preparamos además Np-Ch conjugadas con las proteínas SpA y BSA para ser utilizadas como controles y para la estandarización. De acuerdo a la medición de las Np-Ch realizada por MET, obtuvimos un tamaño variado de acuerdo al tipo de proteína que contenían, por ejemplo, las Np-Ch que llevaban BSA solían ser un poco más grandes comparadas con las que llevaban la proteína RBD, lo cual coincide con el tamaño de las proteínas (BSA 66.5 kDa, RBD 25 kDa). Sin embargo, en este estudio no consideramos relevante que tengan un tamaño igual entre diferentes grupos de Np-Ch, mientras que el rango de tamaño sea similar, para que el mecanismo por el cual se internalicen también lo sea. No obstante, consideramos importante que las preparaciones sean homogéneas dentro del mismo grupo para asegurar la reproducibilidad de los experimentos.

En general, el diámetro de las Np-Ch es importante porque nos permite entender cómo interactúan con la célula y cómo podrían entrar en ella. El sistema inmunitario contiene células con varias vías endocíticas incluidas la fagocitosis, la pinocitosis, la endocitosis mediada por receptores y las caveolas, que permiten la captación de antígenos extraños para su procesamiento y presentación (McShane & Malinova, 2022). Las vías de entrada de las Np a las células por distintos procesos depende del tipo celular, según (Behzadi et al., 2017) las células HeLa tienden a incorporar Np por medio de la proteína Clatrina; las células del músculo liso, células endoteliales, adipocitos, fibroblastos y neumocitos 1 tienden a incorporarlas por endocitosis dependiente de caveolas; mientras que las células neuronales, leucocitos y Hep22 no pueden internalizar sustancias por endocitosis mediada por caveolas, ya que estos tipos celulares carecen de caveolin-1 (Fujimoto et al., 2000). En el trabajo de (Minguet et al., 2017) informan sobre la ausencia de caveolin-1 en linfocitos B. Entonces este mecanismo de entrada celular no podría estar sucediendo para el caso de la incorporación de las Np-Ch en los linfocitos B de nuestro cultivo celular. Un punto importante sobre la entrada de Np es la forma de éstas. En el trabajo de (Chithrani et al., 2006) encuentran que Np de oro esféricas tienen una mayor incorporación comparada con las Np de oro en forma de bastón en macrófagos, así mismo utilizando células HeLa se observó que éstas absorben Np de oro con una tasa de 3.75 veces más alta que las Np de oro en forma de bastón. Chithrani et. al. explica que se puede deber a que la envoltura de la membrana para las Np en forma de bastón lleva más tiempo en cubrir, comparado si las Np son esféricas. Por otro lado, en el trabajo de Behzadi et.al., 2017 mencionan que la endocitosis mediada por clatrina es el mecanismo más favorable para las Np esféricas mientras que Np de forma de bastos/varilla es por medio de micropinocitosis o fagocitosis. Las Np-Ch generadas en este trabajo son de forma esférica por lo que, en teoría, es más fácil su incorporación.

En referencia a la preparación de las Np-Ch, el método utilizado de gelificación ionotrópica, el cual es un método que permite formar Np-Ch de tamaño homogé-

neo (Hembram et al., 2016), además de ser sencillo y no se necesita equipos automatizados. Para las Np, la homogeneidad de la preparación se observa con un análisis de polidispersidad, en nuestro caso los resultados proporcionados por el TRPS nos indican un índice d_{90}/d_{10} (razón entre el número de partículas que están al 90% y 10% del ancho de la distribución) que iba de 1.43 a 2.3. Además, muestran un valor SPAN aceptable (alejadas al valor 1). En el caso de las SpA/Np-Ch y de SpA/Np-Ch/Bcl-6, el valor SPAN fue el más bajo de entre las diversas preparaciones, por lo que podemos decir que presentan una menor dispersidad y mayor homogeneidad en el tamaño, mientras que las BSA/Np-Ch y las RBD/Np-Ch fueron las que presentaron un mayor grado de dispersidad. Podemos decir que la muestra del complejo con menor grado de dispersión fueron las SpA/Np-Ch, mientras que presentaron mayor polidispersidad fueron BSA/Np-Ch lo que puede deberse a que BSA es una proteína que actúa como acarreadora, por lo que tiene la característica de adhesión, por ello podría estar formando agrupamientos de Np-Ch.

Otro aspecto importante en la evaluación de las Np-Ch es su carga, ya que ésta influye en la agregación, estabilidad y entrada celular (Ozturk et al., 2020; Shang et al., 2014). Por medio del análisis por TRPS en las Np-Ch generadas, se observó que los valores positivos son menos frecuentes que los valores negativos, siendo la media de -27.8 mV con una desviación estándar baja. Esto nos indica que las Np al incubarse con las células B tienen poca probabilidad de ser incorporadas por carga, ya que se repelarían con la membrana plasmática de los linfocitos. Además, la carga de las Np-Ch nos permite saber qué tan agregadas pueden estar, así como su estabilidad, Np con carga de 30 a 60 mV presentan excelente estabilidad según (Ozturk et al., 2020). Si las Np-Ch en suspensión tienen valores de carga negativos o positivos elevados tienden a repelarse entre sí y no hay tendencia a la agregación; por el contrario, si las Np-Ch tienen valores bajos del potencial Z entonces no hay suficiente fuerza repulsiva y las partículas tienden a aglomerarse (Hembram et al., 2016). La aglomeración de las Np-Ch sería desfavorable, ya que aglomeradas aumentarían el tamaño y la homogeneidad de la suspensión y eso

afectaría la entrada a la célula y la reproducibilidad de los resultados.

Por medio del análisis de TRPS se encontró que la distribución de tamaños es bastante similar para todas las preparaciones de Np. En la mayoría de las muestras el promedio de los diámetros varía entre 150 y 240 nm. Observamos que las mediciones del tamaño de las Np-Ch determinadas por TRPS fueron un poco distintas de aquellas en el MET. Empleando TRPS, la distribución de tamaños fue más uniforme, siendo solo las RBD/Np-Ch/Bcl-6 más grandes que el resto. En este caso no se observó la diferencia de tamaños de acuerdo con el peso de la proteína, por lo que posiblemente, las diferencias que habíamos observado en el MET sean producto de la preparación de las muestras. Por otro lado, la distribución de las cargas también fue similar para las diferentes preparaciones, excepto para las RBD/Np-Ch/Bcl-6 y para las SpA/Np-Ch cuya carga fue más negativa. Posiblemente, en este caso, las Np hayan captado mayor cantidad de DNA.

Además, observamos que al disminuir el tamaño de las Np-Ch de 148-180 nm éstas tienden a tener una carga positiva, lo que permitiría la entrada a la célula de forma no específica, sin embargo, hay una poca cantidad de Np-Ch que presentaron carga positiva (menos del 10%). Esta pequeña población de Np-Ch de tamaño pequeño y carga positiva pudieran estar entrando a las células por medio de endocitosis mediada por clatrina. En el trabajo de Bannunah, 2014 realizaron pruebas en las que demostraron que la entrada de Np de látex con carga positiva en células epiteliales de intestino no ocurría cuando eran incubadas en presencia de clorpromazina (inhibidor de clatrina), mostrando que ésta podría ser la principal vía de ingreso para Np con carga positiva. Sin embargo, en nuestro caso la mayoría de las Np-Ch tienen carga negativa, por lo que se esperaría que estén entrando solo aquellas que reconocen el BCR específico.

Los resultados obtenidos al incubar las Np-Ch con las células B durante 8 horas sugieren que las Np-Ch están entrando de forma específica, ya que de lo contrario

entrarían en la misma proporción, sin importar el antígeno, sin embargo, para demostrarlo necesitaríamos de ayuda de otros métodos como el bloqueo de BCR. Al aumentar el tiempo de incubación a las 24 horas, obtuvimos que las Np se incorporaban aproximadamente en el mismo porcentaje. Algo similar sucedía cuando se incubaban las células con el doble de la cantidad de Np-Ch. Esto puede deberse a que a mayor tiempo de incubación o mayor concentración las Np-Ch podrían estar entrando por otra vía y no por receptores BCR. En soporte a esta hipótesis, en el trabajo de Bannunah y colaboradores, se hicieron pruebas para demostrar la adhesión e incorporación en células epiteliales del intestino y encontraron que las Np de látex aminado con carga negativa entran a las células epiteliales por endocitosis mediada por caveolas, mientras que aquellas con carga positiva entran por medio de clatrina y macropinocitosis (Bannunah et al., 2014). En el caso de las células B no se han descrito trabajos de investigación de este tipo.

Considerando que la adición de las Np-Ch podría generar toxicidad en los cultivos de las células B, adicionamos concentraciones crecientes de Np-Ch y realizamos ensayos de viabilidad de los linfocitos B. Los resultados indicaron que las células en presencia de Np-Ch no morían, sino que aumentaban su proliferación respecto al control que fueron células B sin Np-Ch. Por lo cual, las concentraciones adicionadas de Np-Ch no son tóxicas para las células B en las condiciones probadas en estos experimentos. Por otro lado, aunque no pudimos demostrar de forma confiable la expresión de Bcl-6 (se observó poca expresión por FACS) encontramos que las RBD/Np-Ch/Bcl-6 inducían más proliferación que las RBD/Np-Ch/ \emptyset , comprobando que Bcl-6 ayuda a la proliferación de células B. Esto es coincidente con lo descrito por Kwakkenbos y colaboradores, quienes estimularon células plasmáticas y las transfectaron con genes de Bcl-6 y Bcl-XL, este abordaje permitió la expansión de linfocitos B *in vitro*, además hubo diferenciación celular y producción de anticuerpos monoclonales (Kwakkenbos et al., 2016).

Una vez que observamos que las Np-Ch eran incorporadas a las células y que no inducían muerte celular, sino proliferación, evaluamos las condiciones de

estimulación de las células B. Para ello primero estimulamos cultivos de células B en presencia de diferentes cócteles de activadores policlonales, observando que algunos de los protocolos de estimulación favorecían la sobrevivencia de las células y otros la producción de anticuerpos. En cuanto a las mezclas de citocinas empleadas para la estimulación de las células B, se sabe que la IL-2 mejora la proliferación y la secreción de Inmunoglobulinas (Ig) por las células B humanas activadas (Bansal et al., 2012); mientras que la IL-4 induce el cambio de isotipo preferentemente a IgG1, IgG4 e IgE (Armitage, Maliszewski, et al., 1993), e IL-21 dirige la diferenciación de células B y la producción de anticuerpos (Bansal et al., 2012). IL-21 se ha descrito como un regulador fundamental de la diferenciación de células B y se sabe que al actuar en conjunto con IL-4 aumenta la expresión de Bcl-6 (Robinson et al., 2020). La importancia de incluir todos estos estimuladores de células B en nuestro cultivo se debió a que la interacción CD40/CD40L induce la activación, la blastogénesis y la proliferación de las células B sin promover la producción de anticuerpos (Armitage, Tough, et al., 1993), mientras que IL-2 con R848 promueven la activación de células plasmáticas productoras de anticuerpos. Por otro lado, la mezcla de anti-CD40, IL-4 e IL-21 son un potente régimen de estimulación policlonal para la producción de anticuerpos por parte de células B de memoria (Franke et al., 2020). También se ha observado que agregando a los cultivos BAFF el cultivo de células B sobrevive por más tiempo, debido a que BAFF regula la supervivencia de células B a través de la activación de factores anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 también actúa como coestimulador de la proliferación de células B y T (Robinson et al., 2020). En este trabajo, además se optó por la adición de células no B que incluyen células T, monocitos y células dendríticas, obtenidas durante la separación negativa de los linfocitos B, lo cual de acuerdo a (Cao et al., 2010) favorece la estimulación de las células B.

De acuerdo a la literatura, CD40L e IL-4 promueven la activación de células naive (Jahnmatz et al., 2013) y en diversos trabajos se ha visto que tanto el empleo de CD40L como de anti-CD40 estimula la proliferación de las células B, por lo cual suele emplearse indistintamente; sin embargo, recientemente se ha visto que los

efectos de estos componentes pueden ser diferentes. En el trabajo de Roh y colaboradores, se encontró que CD40L favorece el fenotipo de CG, mientras que anti-CD40 favorece el cambio de isotipo (Roh et al., 2018). Por ello, en este proyecto se optó por el empleo de CD40L, esperando que se favorezca la diferenciación de las células B a un fenotipo de CG.

Estandarizamos las condiciones de estimulación en las células B utilizando como antígeno RBD de SARS-CoV-2 y evaluamos la producción de anticuerpos IgG totales, así como la presencia de células secretoras de anticuerpo. Nuestros resultados indicaron que se logró activar a los linfocitos B, proliferaron y se diferenciaron a células plasmáticas productoras de anticuerpos, los cuales pudieron ser detectados en el sobrenadante de cultivo por medio de una ELISA para IgG total. En todas las condiciones de estimulación observamos generación de anticuerpos totales, esto es porque utilizamos células B totales que incluye células B de memoria y plasmáticas, sin embargo, el interés es que la adición de las RBD/Np-Ch incrementara la cantidad de células B específicas, para lo cual se realizaron ensayos de ELISA y ELISPOT buscando células secretoras de anticuerpos anti-RBD. Para la identificación de células productoras de anticuerpos presentes en el cultivo, nos basamos en el ensayo de ELISPOT, esta técnica es más sensible para detectar la secreción de analitos, ya que el analito se captura muy cerca de la célula secretora antes de que pueda diluirse en el sobrenadante del cultivo, dejando una huella para cada célula secretora antes de que pueda diluirse en el sobrenadante del cultivo, mientras que en el ensayo de ELISA el analito se mide en el sobrenadante del cultivo. En los ensayos de ELISPOT se lograron observar la formación de spots en todos los controles positivos que consistían en anticuerpos contra IgG totales, sin embargo para RBD mostraban muy pocos o había ausencia de spots, por lo que se pudo deber a la baja concentración en la que se encuentran células productoras de anticuerpos específicas en sangre periférica, cerca de 0.01% para un antígeno convencional (Perez-Andres et al., 2010), Además, en un estudio reciente se reportó bajo número de spots a partir de células B totales obtenidas de PBMCs

de personas recuperadas de COVID-19 (Byazrova et al., 2021). Esto podría explicar porque en los ensayos de ELISPOT que realizamos hubo una baja detección.

Posteriormente, comparamos la estimulación en presencia de RBD/Np-Ch/Bcl-6 y de antígeno soluble, para evaluar si la estimulación con las Np-Ch favorecía la producción de anticuerpos anti-RBD. En uno de los ensayos encontramos que la estimulación con SpA/Np-Ch favorecía la producción de anticuerpos totales, pero no así los anti-RBD, mientras que la presencia de RBD/Np-Ch estimuló la producción de anticuerpos específicos. Desafortunadamente, tuvimos un problema con la purificación del plásmido codificante para Bcl-6, por lo cual no se pudo repetir este ensayo de ELISA y los resultados no pudieron ser corroborados. De igual forma, en uno de los ensayos en los que estimulamos a las células B con las RBD/Np-Ch y comparamos con el antígeno soluble, observamos que hubo generación de spots en presencia de las Np y la cantidad fue menor empleando el antígeno soluble, sin embargo, por la falta del plásmido de Bcl-6 no pudimos repetir el experimento.

Por otro lado, con el objetivo de incrementar la detección de células secretoras de anticuerpos específicos, repetimos los ensayos de ELISPOT probando otras mezclas de activadores policlonales en presencia del antígeno soluble. El coctel de estimuladores (protocolo 8) descrito por Su y colaboradores, contiene los mismos activadores policlonales que el protocolo propuesto por nosotros, a diferencia que cambia la concentración de IL-2 aumentado a 50 ng/mL y disminuyendo la concentración de IL-4 a 10 ng/mL (Su et al., 2016), también en este protocolo agregan a IL-21 desde la siembra de las células, mientras que nuestro protocolo se agregaba al tercer día. Los resultados mostraron una mayor detección de spot específicos de antígeno, esto pudiera indicar que esas concentraciones de los estímulos serían más adecuadas para la producción de anticuerpos contra RBD, quedando pendiente la comparación de la estimulación con las RBD/Np-Ch/Bcl-6 y con el antígeno soluble, en estas condiciones para completar el objetivo 3.

Anterior a este trabajo, se han realizado estudios similares en los cuales se busca la funcionalización de las Np para dirigir las a un blanco de interés, o bien para la incorporación de estímulos a las células B. Por ejemplo, en el trabajo de Sokolova, 2010 y colaboradores, quienes diseñaron Np de fosfato de calcio que encapsulan ligandos de receptores de tipo Toll, así como también el antígeno hemaglutinina para inducir la maduración de células dendríticas y activación de células T. En dicho trabajo demuestran que las Np cargadas con oligonucleótidos pueden activar a las células dendríticas mejor que los oligonucleótidos libres en solución; y sugieren que dependiendo de los antígenos que contengan las Np, éstas pueden convertirse en vacunas debido a su capacidad para inducir una potente inmunidad celular específica de antígeno (Sokolova et al., 2010). Otro ejemplo es el trabajo de (Hočevár et al., 2019) donde ocupan Np de oro como herramienta dirigida a las células B, obteniendo que las Np revestidas de polímero polietilenglicol (PEG) no afectaron a la viabilidad celular, probando concentraciones altas y por periodos largos (20 µg/mL por 24 horas). Además, mencionan que las Np tampoco afectaron a los distintos marcadores de activación de los linfocitos B naive, ni provocó un aumento en las citocinas proinflamatorias. Evaluaron también la forma de las Np, encontrando que las de forma de varilla deterioraron la producción de citocinas como IL-6 en linfocitos B estimulados por TLR7, sugiriendo que la forma de Np controla la interferencia con eventos tempranos de activación independiente de antígeno en los linfocitos B (Hočevár et al., 2019).

A diferencia de los trabajos anteriores, el objetivo de este proyecto además de dirigir un agente (vector codificante para Bcl-6) para la estimulación de las células B, es la obtención de anticuerpos específicos de antígeno. Por ello, la detección de anticuerpos contra RBD en nuestro método de selección, es un avance hacia la formación de un CG *in vitro* y no dudamos en la mejoría de este método a futuro, para poder obtener anticuerpos contra una gran variedad de patógenos.

LIMITACIONES

Algunas de las limitaciones de nuestro estudio fueron las pocas réplicas y el número limitado de células B. Esto se debió a la poca disponibilidad de donadores al inicio del proyecto, lo cual se resolvió con la donación de buffy coats tras el avance de la pandemia. Además, en cuanto a la obtención de células B de los donadores, encontramos que variaba la cantidad de células obtenidas dependiendo del voluntario, así como la proporción de células B específicas de antígeno, lo cual no determinamos directamente pero que observamos al realizar los ensayos de ELISA y ELISPOT anti-RBD. Por otro lado, durante el transcurso del proyecto nos enfrentamos con dificultades técnicas en la purificación del plásmido codificante de Bcl-6, por lo cual no nos fue posible repetir experimentos clave.

CONCLUSIONES

En este trabajo se logró la generación de Np-Ch conjugadas con antígenos proteicos (BSA, SpA, RBD) y con un vector codificante para Bcl-6 para utilizar como un método de selección específico de antígeno para células B humanas. Las Np-Ch generadas son de forma esférica, su tamaño varía de acuerdo a sus componentes, en un rango de 118 nm a 224.5 nm y su carga es negativa (-17 a -66.66 mV). Los valores de Span y el índice d90/d10 de los conjugados indican que la distribución de sus tamaños es variado, poco homogéneo y que las partículas tienden a agregarse, por ello tuvieron que mantenerse en ácido acético para su conservación y ser lavadas con agua estéril previo a su uso.

La presencia del antígeno permite que sean incorporadas las Np-Ch de forma específica en las células B, dado que aquellas Np-Ch conjugadas con SpA ingresan en mayor cantidad a las células B como era de esperarse de un superantígeno, mientras que las Np-Ch conjugadas con RBD y BSA tienen el comportamiento esperado para un antígeno convencional. Al incrementar la concentración de las Np-Ch o el tiempo de incubación la especificidad de incorporación disminuye. Debido

a las características que presentaron las Np-Ch como la carga negativa nos acercamos a la idea que no se unen a la membrana celular por interacción electrostática sino por endocitosis mediada por BCR. Para estar seguros que las Np-Ch estuvieran dentro de las células, lo demostramos con microscopía confocal en el cual observamos que las Np-Ch se encuentran en toda la célula y no solo adheridas a la membrana.

La incorporación del plásmido codificante para Bcl-6 es importante dado que esta proteína es fundamental para la formación de centros germinales. Se demostró la expresión de la proteína, aunque en baja proporción, ya que la eficiencia de la transfección fue baja. Sin embargo, cuando se estimularon las células B con las RBD/Np-Ch conteniendo el plásmido vacío o con Bcl-6, las que contenían Bcl-6 tendieron a proliferar más. Además, fue de gran importancia la evaluación de la viabilidad celular en presencia de Np-Ch, nuestro trabajo demuestra que estas Np-Ch no dañan a las células, sino al contrario cuando las dejamos en presencia de Np-Ch/Bcl-6 tienden a proliferar más. Por esta razón el transporte de antígenos por medio de Np-Ch es inocua para las células.

Para poder mantener un cultivo de células B humanas durante 7 días y así crear un ambiente de células productoras de anticuerpos, tuvimos que probar distintos protocolos de activadores policlonales y seleccionar el mejor. El protocolo seleccionado prometió la supervivencia celular, la proliferación y la diferenciación de las células B. De los métodos utilizados para la evaluación de la producción de anticuerpos, el ensayo de ELISPOT fue uno de los más sensibles en la detección de éstos, sin embargo, reforzamos los resultados obtenidos en los ensayos de ELISA. Encontramos que el ambiente más favorecedor para la producción de anticuerpos específicos de antígeno fue en presencia de IL-4, IL-21, IL-2, CD40L y BAFF, así como de células no B que posiblemente proporcionaran coestimulación.

Finalmente, nuestro objetivo principal era comparar la estimulación de las células B empleando RBD/Np-Ch con el antígeno soluble, para ello realizamos un par de

experimentos independientes en los que observamos que había mayor cantidad de anti-RBD (por ELISA) y mayor número de células secretoras de anticuerpos específicos (por ELISPOT) empleando las Np-Ch. Desafortunadamente, teníamos pocas células B para incluir réplicas y por problemas técnicos estos resultados no pudieron ser corroborados. Por ello, aún queda pendiente la comprobación de si la estimulación con el antígeno multimerizado en las Np-Ch estimula de mejor forma a las células B en comparación con el antígeno soluble, como lo indica la teoría.

PERSPECTIVAS

- Repetir los experimentos de la comparación de la producción de anticuerpos en células B estimulados con RBD/Np-Ch/Bcl-6 y con RBD soluble.
- Realizar microscopia de amplia resolución de las células B que incorporaron las RBD/Np-Ch-FITC.
- Bloquear distintas vías de entrada de las células B para la corroborar la especificidad.
- Realizar ensayos de neutralización empleando pseudovirus de SARS-CoV-2 con los anticuerpos monoclonales contra RBD de SARS-CoV-2 obtenidos en el sobrenadante del cultivo de células B.
- Analizar fenotipo las células B estimuladas con RBD/Np-Ch/Bcl-6 y con RBD soluble.
- Determinar la secuencia de los genes de Ig para los anticuerpos anti-RBD para su producción recombinante.
- Evaluar el cambio de isotipo en las células B estimuladas con RBD/Np-Ch/Bcl-6 y con RBD soluble.
- Probar en nuestro modelo otros antígenos de interés, o bien proteína de otra variante de SARS-CoV-2.
- Demostrar especificidad de la incorporación utilizando un cultivo de líneas celulares.
- Encontrar condiciones de cultivo que permitan que las células B sobrevivan por más tiempo para poder realizar ensayos prolongados.
- Reproducir un centro germinal con la capacidad de producir anticuerpos monoclonales humanos específicos de antígeno sería un gran logro, principalmente porque no habría necesidad de humanizarlos y porque se podría emplear para generar tratamientos contra diferentes blancos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akagi, T., Baba, M., & Akashi, M. (2011). Biodegradable Nanoparticles as Vaccine Adjuvants and Delivery Systems: Regulation of Immune Responses by Nanoparticle-Based Vaccine. *Advances in Polymer Science*, 247(1), 31–64. https://doi.org/10.1007/12_2011_150
- Armitage, R. J., Maliszewski, C. R., Alderson, M. R., Grabstein, K. H., Spriggs, M. K., & Fanslow, W. C. (1993). CD40L: a multi-functional ligand. *Seminars in Immunology*, 5(6), 404–412. <https://doi.org/10.1006/SMIM.1993.1046>
- Armitage, R. J., Tough, T. W., Macduff, B. M., Fanslow, W. C., Spriggs, M. K., Ramsdell, F., & Alderson, M. R. (1993). CD40 ligand is a T cell growth factor. *European Journal of Immunology*, 23(9), 2326–2331. <https://doi.org/10.1002/EJL.1830230941>
- Bannard, O., Horton, R. M., Allen, C. D. C., An, J., Nagasawa, T., & Cyster, J. G. (2013). Germinal center centroblasts transition to a centrocyte phenotype according to a timed program and depend on the dark zone for effective selection. *Immunity*, 39(5), 912–924. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2013.08.038>
- Bannunah, A. M., Vllasaliu, D., Lord, J., & Stolnik, S. (2014). Mechanisms of nanoparticle internalization and transport across an intestinal epithelial cell model: Effect of size and surface charge. *Molecular Pharmaceutics*, 11(12), 4363–4373. <https://doi.org/10.1021/mp500439c>
- Bansal, R. R., Mackay, C. R., Moser, B., & Eberl, M. (2012). IL-21 enhances the potential of human $\gamma\delta$ T cells to provide B-cell help. *European Journal of Immunology*, 42(1), 110–119. <https://doi.org/10.1002/eji.201142017>
- Basso, K., & Dalla-Favera, R. (2012). Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells. *Immunological Reviews*, 247(1), 172–183. <https://doi.org/10.1111/J.1600-065X.2012.01112.X>
- Behzadi, S., Serpooshan, V., Tao, W., Hamaly, M. A., Alkawareek, M. Y., Dreaden, E. C., Brown, D., Alkilany, A. M., Farokhzad, O. C., & Mahmoudi, M. (2017). Cellular uptake of nanoparticles: Journey inside the cell. In *Chemical Society Reviews* (Vol. 46, Issue 14, pp. 4218–4244). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c6cs00636a>
- Bravo, S. (2018). *Identificación in vitro de anticuerpos monoclonales humanos con potencial terapéutico contra Staphylococcus aureus multirresistente*.
- Brüssow, H. (2020). The Novel Coronavirus - A Snapshot of Current Knowledge. *Microbial Biotechnology*, 13(3), 607–612. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13557>
- Bunting, K. L., & Melnick, A. M. (2013). New effector functions and regulatory mechanisms of BCL6 in normal and malignant lymphocytes. *Current Opinion in Immunology*, 25(3), 339–346. <https://doi.org/10.1016/J.COI.2013.05.003>
- Byazrova, M., Yusubaliev, G., Spiridonova, A., Efimov, G., Mazurov, D., Baranov, K., Baklaushev, V., & Filatov, A. (2021). Pattern of circulating SARS-CoV-2-specific antibody-secreting and memory B-cell generation in patients with acute COVID-19. *Clinical & Translational Immunology*, 10(2). <https://doi.org/10.1002/CTI2.1245>
- Calado, D. P. (2017). Germinal centers : methods and protocols. In *Human Press*.
- Cao, Y., Gordic, M., Kobold, S., Lajmi, N., Meyer, S., Bartels, K., Hildebrandt, Y., Luetkens, T., Ihloff, A. S., Kröger, N., Bokemeyer, C., & Atanackovic, D. (2010). An optimized assay for the enumeration of antigen-specific memory B cells in different compartments of the human body. *Journal of Immunological Methods*, 358(1–2), 56–65. <https://doi.org/10.1016/J.JIM.2010.03.009>
- Casadevall, A., & Pirofski, L. A. (2020). The convalescent sera option for containing COVID-19. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(4), 1545–1548. <https://doi.org/10.1172/JCI138003>
- Chattopadhyay, S., Chen, J. Y., Chen, H. W., & Jack Hu, C. M. (2017). Nanoparticle Vaccines

- Adopting Virus-like Features for Enhanced Immune Potentiation. *Nanotheranostics*, 1(3), 244–260. <https://doi.org/10.7150/NTNO.19796>
- Chen, Y., Zhao, X., Zhou, H., Zhu, H., Jiang, S., & Wang, P. (2023). Broadly neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. *Nature Reviews. Immunology*, 23(3). <https://doi.org/10.1038/S41577-022-00784-3>
- Chithrani, B. D., Ghazani, A. A., & Chan, W. C. W. (2006). Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Letters*, 6(4), 662–668. <https://doi.org/10.1021/NL052396O>
- De Silva, N. S., & Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nature Reviews. Immunology*, 15(3), 137–148. <https://doi.org/10.1038/NRI3804>
- Elvira Pujalte, C. (2001). Quitosano: un polisacárido natural biodegradable y biocompatible con aplicaciones en biotecnología y biomedicina. *Revista de Plásticos Modernos: Ciencia y Tecnología de Polímeros*, ISSN 0034-8708, Nº 535, 2001, Págs. 81-91, 535, 81–91. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2895509>
- Franke, F., Kirchenbaum, G. A., Kuerten, S., & Lehmann, P. V. (2020). IL-21 in Conjunction with Anti-CD40 and IL-4 Constitutes a Potent Polyclonal B Cell Stimulator for Monitoring Antigen-Specific Memory B Cells. *Cells*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/cells9020433>
- Fujimoto, T., Kogo, H., Nomura, R., & Une, T. (2000). Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. *Cell Science*.
- Gars, E., Butzmann, A., Ohgami, R., Balakrishna, J. P., & O'Malley, D. P. (2020). The life and death of the germinal center. In *Annals of Diagnostic Pathology* (Vol. 44). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2019.151421>
- Hembram, K. C., Prabha, S., Chandra, R., Ahmed, B., & Nimesh, S. (2016). Advances in preparation and characterization of chitosan nanoparticles for therapeutics. In *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* (Vol. 44, Issue 1, pp. 305–314). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.948548>
- Hočevár, S., Milošević, A., Rodriguez-Lorenzo, L., Ackermann-Hirschi, L., Mottas, I., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B., Bourquin, C., & Clift, M. J. D. (2019). Polymer-Coated Gold Nanospheres Do Not Impair the Innate Immune Function of Human B Lymphocytes in Vitro. *ACS Nano*, 13(6), 6790–6800. <https://doi.org/10.1021/ACSNANO.9B01492>
- Hussain, A., Hasan, A., Nejadi Babadaei, M. M., Bloukh, S. H., Chowdhury, M. E. H., Sharifi, M., Haghghat, S., & Falahati, M. (2020). Targeting SARS-CoV2 Spike Protein Receptor Binding Domain by Therapeutic Antibodies. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedicine & Pharmacotherapie*, 130. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2020.110559>
- Jahnmatz, M., Kesa, G., Netterlid, E., Buisman, A. M., Thorstensson, R., & Ahlborg, N. (2013). Optimization of a human IgG B-cell ELISpot assay for the analysis of vaccine-induced B-cell responses. *Journal of Immunological Methods*, 391(1–2), 50–59. <https://doi.org/10.1016/J.JIM.2013.02.009>
- Ju, B., Zhang, Q., Ge, J., Wang, R., Sun, J., Ge, X., Yu, J., Shan, S., Zhou, B., Song, S., Tang, X., Yu, J., Lan, J., Yuan, J., Wang, H., Zhao, J., Zhang, S., Wang, Y., Shi, X., ... Zhang, L. (2020). Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. *Nature*, 584(7819), 115–119. <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2380-Z>
- Kanekiyo, M., Joyce, M. G., Gillespie, R. A., Gallagher, J. R., Andrews, S. F., Yassine, H. M., Wheatley, A. K., Fisher, B. E., Ambrozak, D. R., Creanga, A., Leung, K., Yang, E. S., Boyoglu-Barnum, S., Georgiev, I. S., Tsybovsky, Y., Prabhakaran, M. S., Andersen, H., Kong, W. P., Baxa, U., ... Graham, B. S. (2019). Mosaic nanoparticle display of diverse influenza virus hemagglutinins elicits broad B cell responses. *Nature Immunology* 2019 20:3, 20(3), 362–372. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0305-x>
- Korangath, P., Barnett, J. D., Sharma, A., Henderson, E. T., Stewart, J., Yu, S. H., Kandala, S. K., Yang, C. T., Caserto, J. S., Hedayati, M., Armstrong, T. D., Jaffee, E., Gruettner, C., Zhou, X. C., Fu, W., Hu, C., Sukumar, S., Simons, B. W., & Ivkov, R. (2020). Nanoparticle

- interactions with immune cells dominate tumor retention and induce T cell-mediated tumor suppression in models of breast cancer. *Science Advances*, 6(13). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAY1601>
- Kreuzberger, N., Hirsch, C., Chai, K. L., Piechotta, V., Valk, S. J., Estcourt, L. J., Salomon, S., Tomlinson, E., Monsef, I., Wood, E. M., So-Osman, C., Roberts, D. J., McQuilten, Z., & Skoetz, N. (2021). SARS-CoV-2-neutralising monoclonal antibodies for treatment of COVID-19. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2021(1). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013825>
- Kwakkenbos, M. J., van Helden, P. M., Beaumont, T., & Spits, H. (2016). Stable long-term cultures of self-renewing B cells and their applications. *Immunological Reviews*, 270(1), 65–77. <https://doi.org/10.1111/IMR.12395>
- Li, X., Deng, X., & Huang, Z. (2001). In vitro protein release and degradation of poly-dl-lactide-poly(ethylene glycol) microspheres with entrapped human serum albumin: quantitative evaluation of the factors involved in protein release phases. *Pharmaceutical Research*, 18(1), 117–124. <https://doi.org/10.1023/A:1011043230573>
- Marovich, M., Mascola, J. R., & Cohen, M. S. (2020). Monoclonal Antibodies for Prevention and Treatment of COVID-19. *JAMA*, 324(2), 131–132. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2020.10245>
- Marston, H. D., Paules, C. I., & Fauci, A. S. (2018a). Monoclonal Antibodies for Emerging Infectious Diseases - Borrowing from History. *The New England Journal of Medicine*, 378(16), 1469–1472. <https://doi.org/10.1056/NEJMP1802256>
- Marston, H. D., Paules, C. I., & Fauci, A. S. (2018b). Monoclonal Antibodies for Emerging Infectious Diseases — Borrowing from History. *New England Journal of Medicine*, 378(16), 1469–1472. <https://doi.org/10.1056/NEJMP1802256>
- McShane, A. N., & Malinova, D. (2022). The Ins and Outs of Antigen Uptake in B cells. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.892169>
- Miller, & Miller. (2002). *Estadística y Quimiometría para la Química Análítica*. PEARSON EDUCACIÓN S.A.. Madrid. <https://sceqa.files.wordpress.com/2012/05/quimica-y-quimiometria.pdf>
- Minguet, S., Kläsener, K., Schaffer, A. M., Fiala, G. J., Osteso-Ibáñez, T., Raute, K., Navarro-Lérida, I., Hartl, F. A., Seidl, M., Reth, M., & Del Pozo, M. A. (2017). Caveolin-1-dependent nanoscale organization of the BCR regulates B cell tolerance. *Nature Immunology*, 18(10), 1150–1159. <https://doi.org/10.1038/ni.3813>
- Montgomerie, I., Bird, T. W., Palmer, O. R., Mason, N. C., Pankhurst, T. E., Lawley, B., Hernández, L. C., Harfoot, R., Authier-Hall, A., Anderson, D. E., Hilligan, K. L., Buick, K. H., Mbenza, N. M., Mittelstädt, G., Maxwell, S., Sinha, S., Kuang, J., Subbarao, K., Parker, E. J., ... Connor, L. M. (2023). Incorporation of SARS-CoV-2 spike NTD to RBD Protein Vaccine Improves Immunity Against Viral Variants. *IScience*, 106256. <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2023.106256>
- Nojima, T., Haniuda, K., Moutai, T., Matsudaira, M., Mizokawa, S., Shiratori, I., Azuma, T., & Kitamura, D. (2011). In-vitro derived germinal centre B cells differentially generate memory B or plasma cells in vivo. *Nature Communications*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms1475>
- OMS. (2023). Brote de Enfermedad Por El Coronavirus (COVID-19). <https://www.who.int/es>
- Ozturk, K., Arslan, F. B., Tavukcuoglu, E., Esendagli, G., & Calis, S. (2020). Aggregation of chitosan nanoparticles in cell culture: Reasons and resolutions. *International Journal of Pharmaceutics*, 578. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119119>
- Perez-Andres, M., Paiva, B., Nieto, W. G., Caraux, A., Schmitz, A., Almeida, J., Vogt, R. F., Marti, G. E., Rawstron, A. C., Van Zelm, M. C., Van Dongen, J. J. M., Johnsen, H. E., Klein, B., & Orfao, A. (2010). Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell

- traffic. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, 78 Suppl 1(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1002/CYTO.B.20547>
- Pinto, D., Park, Y. J., Beltramello, M., Walls, A. C., Tortorici, M. A., Bianchi, S., Jaconi, S., Culap, K., Zatta, F., De Marco, A., Peter, A., Guarino, B., Spreafico, R., Cameroni, E., Case, J. B., Chen, R. E., Havenar-Daughton, C., Snell, G., Telenti, A., ... Corti, D. (2020). Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody. *Nature*, 583(7815), 290–295. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2349-y>
- Robinson, M. J., Ding, Z., Pitt, C., Brodie, E. J., Quast, I., Tarlinton, D. M., & Zotos, D. (2020). The Amount of BCL6 in B Cells Shortly after Antigen Engagement Determines Their Representation in Subsequent Germinal Centers. *Cell Reports*, 30(5), 1530-1541.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.009>
- Roh, K. H., Song, H. W., Pradhan, P., Bai, K., Bohannon, C. D., Dale, G., Leleux, J., Jacob, J., & Roy, K. (2018). A synthetic stroma-free germinal center niche for efficient generation of humoral immunity ex vivo. *Biomaterials*, 164, 106–120. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.02.039>
- Shang, L., Nienhaus, K., & Nienhaus, G. U. (2014). Engineered nanoparticles interacting with cells: Size matters. In *Journal of Nanobiotechnology* (Vol. 12, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/1477-3155-12-5>
- Silverman, G. J., & Goodyear, C. S. (2002). A model B-cell superantigen and the immunobiology of B lymphocytes. *Clinical Immunology*, 102(2), 117–134. <https://doi.org/10.1006/clim.2001.5143>
- Sokolova, V., Knuschke, T., Kovtun, A., Buer, J., Epple, M., & Westendorf, A. M. (2010). The use of calcium phosphate nanoparticles encapsulating Toll-like receptor ligands and the antigen hemagglutinin to induce dendritic cell maturation and T cell activation. *Biomaterials*, 31(21), 5627–5633. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2010.03.067>
- Strohl, W. R., Ku, Z., An, Z., Carroll, S. F., Keyt, B. A., & Strohl, L. M. (2022). Passive Immunotherapy Against SARS-CoV-2: From Plasma-Based Therapy to Single Potent Antibodies in the Race to Stay Ahead of the Variants. *BioDrugs*, 36(3), 231–323. <https://doi.org/10.1007/S40259-022-00529-7>
- Su, K.-Y., Watanabe, A., Yeh, C.-H., Kelsoe, G., & Kuraoka, M. (2016). Efficient Culture of Human Naive and Memory B Cells for Use as APCs. *The Journal of Immunology*, 197(10), 4163–4176. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502193>
- Wagar, L. E., Salahudeen, A., Constantz, C. M., Wendel, B. S., Lyons, M. M., Mallajosyula, V., Jatt, L. P., Adamska, J. Z., Blum, L. K., Gupta, N., Jackson, K. J. L., Yang, F., Röltgen, K., Roskin, K. M., Blaine, K. M., Meister, K. D., Ahmad, I. N., Cortese, M., Dora, E. G., ... Davis, M. M. (2021). Modeling human adaptive immune responses with tonsil organoids. *Nature Medicine*, 27(1), 125–135. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01145-0>
- Zilker, C., Kozlova, D., Sokolova, V., Yan, H., Epple, M., Überla, K., & Temchura, V. (2017). Nanoparticle-based B-cell targeting vaccines: Tailoring of humoral immune responses by functionalization with different TLR-ligands. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 13(1), 173–182. <https://doi.org/10.1016/J.NANO.2016.08.028>

ANEXOS

Anexo 1

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO Dirigido a paciente confirmado de SARS-CoV2

Título de proyecto: Organoides de centro germinal humano como una herramienta para comprender la biología de las células B y para la identificación de anticuerpos monoclonales con potencial terapéutico contra el SARS-CoV2.

Nombre del Investigador Principal: Dra. Hilda Minerva González Sánchez.

Objetivo

Estimado(a) Señor/Señora:

Lo invitamos a participar en el presente proyecto de investigación, el cual se desarrolla en el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), sede Cuernavaca.

Si Usted decide participar en el estudio, es importante que considere la siguiente información y siéntase libre de preguntar cualquier asunto que no le quede claro. El propósito del estudio es el desarrollo de una técnica que permita la identificación de anticuerpos contra SARS-CoV2 (específicamente para una región del virus llamada RBD) los cuales podrían tener utilidad terapéutica. Le pedimos participar en este estudio porque usted ha sido confirmado positivo a SARS-CoV2 por los Servicios Estatales de Salud de Morelos o por alguna otra institucional avalada por el INDRE.

Su participación consistirá en:

- Proporcionar información demográfica general (edad, sexo, lugar de residencia y fecha de inicio de síntomas).
- Proporcionar una muestra de sangre por venopunción, igual a cuando se hacen estudios de sangre, le pedimos aproximadamente dos cucharadas soperas de sangre (1 tubo de 8 mL). Es posible que llegue a presentar un moretón por el piquete de la aguja.
- Si usted está de acuerdo, su muestra se almacenarán en un biobanco para realizar otros estudios en el futuro, relacionados con enfermedades infecciosas de importancia en salud pública. Las muestras serán etiquetadas con un número de folio y no con su nombre, para asegurar la confidencialidad de sus datos personales. Estas muestras podrán ser utilizadas para el análisis de genes de anticuerpos, no se llevará a cabo ningún procedimiento de secuenciación de ADN fuera de esta región, por lo cual no se conocerá el genotipo del individuo en cuanto a mutaciones de riesgo de enfermedades.
- Las muestras se procesarán en el INSP para determinar sus títulos de anticuerpos contra RBD de SARS-CoV2. Estos resultados le serán entregados.

- Al momento de entregarle sus resultados, se le pedirá nuevamente su participación donando otra muestra de sangre (4 tubos de 8 mL). A partir de esta muestra se obtendrán células que serán clave para la identificación de anticuerpos contra RBD de SARS-CoV2 que posteriormente podrían ser de utilidad terapéutica.
- No tiene obligación de donar segunda muestra, es libre de retirarse del estudio cuando así lo desee. Los resultados de sus títulos de anticuerpos se le entregarán independientemente de la donación de la segunda muestra.

Beneficios: Si usted acepta participar en este estudio, se le dará a comunicará por escrito la cantidad de anticuerpos que su cuerpo género para una proteína del virus SARS-CoV-2 llamada RBD. Conocer la cantidad de anticuerpos generada en una infección, refleja hasta cierto punto el grado de protección contra una reinfección que podría tener contra el patógeno que la causó, en este caso SARS-CoV-2. Adicionalmente, usted estará colaborando con el INSP en la investigación para opciones de tratamiento para los enfermos de COVID-19.

Confidencialidad: Toda la información que nos proporcione para el estudio será de carácter estrictamente confidencial, será utilizada únicamente por el equipo de investigación del proyecto y no estará disponible para ningún otro propósito. Usted quedará identificado(a) con un número y no con su nombre. Los resultados de este estudio serán publicados con fines científicos, pero se presentarán de tal manera que usted no podrá ser identificado(a).

Participación Voluntaria/Retiro: Su participación en este estudio es absolutamente voluntaria. Usted está en plena libertad de retirarse en cualquier momento. Podrá solicitar también que se retiren sus muestras sin que implique ningún tipo de consecuencia, para ello le pedimos dirigirse al Dra. Hilda Minerva González Sánchez, investigadora responsable del estudio, al correo electrónico hilda.gonzalez@insp.mx.

Riesgos Potenciales/Compensación: Los riesgos potenciales que implican su participación son mínimos. Usted no recibirá ningún pago por participar en el estudio, y tampoco implicará algún costo para usted.

<p>Por favor marque uno de los recuadros de abajo para indicar su decisión</p> <p><input type="checkbox"/> Mis muestras pueden ser utilizada solo para este estudio</p> <p><input type="checkbox"/> Mis muestras pueden ser utilizada para este estudio y para investigación futura.</p>

Aviso de Privacidad Simplificado: El investigador principal de este estudio, Dra. Hilda Minerva González Sánchez, es responsable de los datos personales que nos

proporcione, los cuales serán protegidos conforme a lo dispuesto por la **Ley General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados**. Los datos personales que le solicitaremos serán utilizados exclusivamente para las finalidades expuestas en este documento. Usted puede solicitar la corrección de sus datos o que sus datos se eliminen de nuestras bases o retirar su consentimiento para su uso. En cualquiera de estos casos le pedimos dirigirse con la investigadora responsable del proyecto a la siguiente dirección de correo hilda.gonzalez@insp.mx.

Números a Contactar: Si usted tiene alguna pregunta, comentario o preocupación con respecto al proyecto, por favor comuníquese con la investigadora responsable del proyecto: Dra. Hilda Minerva González Sánchez al siguiente número de teléfono (777)329 30 00 ext:2732 en un horario de 9:00-16:00 ó al correo electrónico hilda.gonzalez@insp.mx.

Si usted tiene preguntas generales relacionadas con sus derechos como participante de un estudio de investigación, puede comunicarse con la Presidenta del Comité de Ética en Investigación del INSP, Dra. Angélica Ángeles Llerenas, al teléfono (777) 329-3000 ext. 7424 de 9:00 am a 16:00 hrs. ó si lo prefiere puede escribirle a la siguiente dirección de correo electrónico etica@insp.mx

Si usted acepta participar en el estudio, le entregaremos una copia de este documento que le pedimos sea tan amable de firmar.

Declaración de la persona que da el consentimiento

- He leído esta carta de consentimiento.
- Me han explicado el estudio de investigación incluyendo el objetivo, los posibles riesgos y beneficios, y otros aspectos sobre mi participación en el estudio.
- He podido hacer preguntas relacionadas a mi participación en el estudio, y me han respondido satisfactoriamente mis dudas.

Si usted entiende la información que le hemos dado en este formato, está de acuerdo en participar en este estudio, de manera total o parcial, y también está de acuerdo en permitir que su información de salud sea usada como se describió antes, entonces le pedimos que indique su consentimiento para participar en este estudio.

Registre su nombre y firma en este documento del cual le entregaremos una copia.

PARTICIPANTE:

Nombre: _____

Firma: _____

Fecha/hora _____

Nombre y firma del investigador o persona que obtiene el consentimiento:

Nombre:

Firma: _____

Fecha/hora _____

Anexo 2.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO Dirigido a paciente confirmado de SARS-CoV2

Título de proyecto: Organoides de centro germinal humano como una herramienta para comprender la biología de las células B y para la identificación de anticuerpos monoclonales con potencial terapéutico contra el SARS-CoV2

Nombre del Investigador Principal: Dra. Hilda Minerva González Sánchez

Objetivo

Estimado(a) Señor/Señora:

Lo invitamos a participar en el presente proyecto de investigación, el cual se desarrolla en el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), sede Cuernavaca.

Si Usted decide participar en el estudio, es importante que considere la siguiente información y siéntase libre de preguntar cualquier asunto que no le quede claro. El propósito del estudio es el desarrollo de una técnica que permita la identificación de anticuerpos contra SARS-CoV2 (específicamente para una región del virus llamada RBD) los cuales podrían tener utilidad terapéutica. Le pedimos participar en este estudio porque usted ha sido confirmado positivo a SARS-CoV2 por los Servicios Estatales de Salud de Morelos o por alguna otra institucional avalada por el INDRE, y ya ha donado previamente una muestra de sangre en la cual se determinaron sus títulos de anticuerpos contra RBD de SARS-CoV2.

Su participación consistirá en:

- La donación de una muestra de sangre (4 tubos de 8 mL). A partir de esta muestra se obtendrán células que serán clave para la identificación de anticuerpos contra RBD de SARS-CoV2 que posteriormente podrían ser de utilidad terapéutica.

Beneficios: Si usted acepta participar estará colaborando con el INSP en la investigación de opciones para el tratamiento de enfermos con COVID-19.

Confidencialidad: Toda la información que nos proporcione para el estudio será de carácter estrictamente confidencial, será utilizada únicamente por el equipo de investigación del proyecto y no estará disponible para ningún otro propósito. Usted quedará identificado(a) con un número y no con su nombre. Los resultados de este estudio serán publicados con fines científicos, pero se presentarán de tal manera que usted no podrá ser identificado(a).

Participación Voluntaria/Retiro: Su participación en este estudio es absolutamente voluntaria. Usted está en plena libertad de retirarse en cualquier momento. Podrá solicitar también que se retiren sus muestras sin que implique ningún tipo de consecuencia, para ello le pedimos dirigirse al Dra. Hilda Minerva González Sánchez, investigadora responsable del estudio, al correo electrónico hilda.gonzalez@insp.mx.

Riesgos Potenciales/Compensación: Los riesgos potenciales que implican su participación son mínimos. Usted no recibirá ningún pago por participar en el estudio, y tampoco implicará algún costo para usted.

<p>Por favor marque uno de los recuadros de abajo para indicar su decisión</p> <p><input type="checkbox"/> Mis muestras pueden ser utilizada solo para este estudio</p> <p><input type="checkbox"/> Mis muestras pueden ser utilizada para este estudio y para investigación futura.</p>

Aviso de Privacidad Simplificado: El investigador principal de este estudio, Dra. Hilda Minerva González Sánchez, es responsable de los datos personales que nos proporcione, los cuales serán protegidos conforme a lo dispuesto por la **Ley General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados**. Los datos personales que le solicitaremos serán utilizados exclusivamente para las finalidades expuestas en este documento. Usted puede solicitar la corrección de sus datos o que sus datos se eliminen de nuestras bases o retirar su consentimiento para su uso. En cualquiera de estos casos le pedimos dirigirse con la investigadora responsable del proyecto a la siguiente dirección de correo hilda.gonzalez@insp.mx.

Números a Contactar: Si usted tiene alguna pregunta, comentario o preocupación con respecto al proyecto, por favor comuníquese con la investigadora responsable del proyecto: Dra. Hilda Minerva González Sánchez al siguiente número de teléfono (777)329 30 00 ext:2732 en un horario de 9:00-16:00 ó al correo electrónico hilda.gonzalez@insp.mx.

Si usted tiene preguntas generales relacionadas con sus derechos como participante de un estudio de investigación, puede comunicarse con la Presidenta del Comité de Ética en Investigación del INSP, Dra. Angélica Ángeles Llerenas, al teléfono (777) 329-3000 ext. 7424 de 9:00 am a 16:00 hrs. ó si lo prefiere puede escribirle a la siguiente dirección de correo electrónico etica@insp.mx

Si usted acepta participar en el estudio, le entregaremos una copia de este documento que le pedimos sea tan amable de firmar.

Declaración de la persona que da el consentimiento

- He leído esta carta de consentimiento.
- Me han explicado el estudio de investigación incluyendo el objetivo, los posibles riesgos y beneficios, y otros aspectos sobre mi participación en el estudio.
- He podido hacer preguntas relacionadas a mi participación en el estudio, y me han respondido satisfactoriamente mis dudas.

Si usted entiende la información que le hemos dado en este formato, está de acuerdo en participar en este estudio, de manera total o parcial, y también está de acuerdo en permitir que su información de salud sea usada como se describió antes, entonces le pedimos que indique su consentimiento para participar en este estudio.

Registre su nombre y firma en este documento del cual le entregaremos una copia.

PARTICIPANTE:

Nombre: _____

Firma: _____

Fecha/hora _____

Nombre y firma del investigador o persona que obtiene el consentimiento:

Nombre:

Firma: _____

Fecha/hora _____





Dependencia: Servicios de Salud de Morelos
Sección: Dirección de Atención Médica
Área: Subdirección de Enseñanza, Investigación y Capacitación
Departamento de Investigación y Capacitación
No. Oficio DAM/SEIC/DIC/2450/2021

“2021: Año de la Independencia”

Jiutepec, Morelos, a 06 de octubre del 2021.

ASUNTO: Aprobación de Proyecto de Investigación.

**DRA. HILDA MINERVA GONZÁLEZ SÁNCHEZ
INVESTIGADORA PRINCIPAL DEL INSP**

Avenida Universidad 655
Col. Santa María Ahuacatlán C.P. 62100
Cuernavaca, Mor.

PRESENTE

En respuesta a su solicitud para la revisión del proyecto titulado: **“Human germinal center organoids as a tool to understand B cell biology and for the identification of monoclonal antibodies with therapeutic potential against SARS-CoV2**, al respecto le informo que la documentación que presentó se encuentra completa y es factible realizarlo en el Centro Estatal de Transfusión Sanguínea en el periodo comprendido del **06 de octubre de 2021 al 31 de diciembre de 2022**, con la participación del personal que se enlista a continuación como asesores por parte de SSM:

Área	Nombre	Cargo	Correo Electrónico	Teléfono
Centro Estatal de Transfusión Sanguínea	Trinidad Margarita Zuñiga Navarro	Asesor Técnica	nazu_mar@hotmail.com	7772361919
Centro Estatal de Transfusión Sanguínea	Fabiola Edely Márquez Torres	Asesor Técnica	fabiola_edely@hotmail.com	7341269682

Deberá mantener informada a esta Subdirección los avances de su proyecto a los 3, 6 meses y al finalizar a través del formato de seguimiento que se adjunta al presente, así mismo **se solicita estricto apego a la versión del protocolo aprobada y discutir los resultados del proyecto** con la Subdirección de Enseñanza, Investigación y Capacitación, previo a su publicación, haciendo énfasis en la protección de datos personales.



SERVICIOS
DE SALUD



<http://ssm.gob.mx>



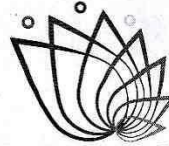
Servicios de Salud Morelos



@MorelosSalud



MORELOS
2018 - 2024



MORELOS
ANFITRIÓN DEL MUNDO
Gobierno del Estado
2018-2024

Dependencia: Servicios de Salud de Morelos
Sección: Dirección de Atención Médica
Área: Subdirección de Enseñanza, Investigación y Capacitación
Departamento de Investigación y Capacitación
No. Oficio DAM/SEIC/DIC/2450/2021

Para cualquier duda relacionada con este asunto, queda a sus órdenes la DSP. Mariana Irina González Fernández, Jefa del Departamento de Investigación y Capacitación, de esta Subdirección a mi cargo, en el correo electrónico mariana.gonzalez@gob.mx y/o al teléfono 3207336 Ext. 104.

Sin otro particular al cual referirme, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

DR. HUMBERTO E. LÓPEZ GONZÁLEZ
SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN

C.c.p. MTR. OSCAR DANIEL ORTIZ OROZCO, ENCARGADO DE DESPACHO DE LA DIRECCIÓN DE ATENCIÓN MÉDICA. Notificado vía digital al correo direccion.atmedica@ssm.gob.mx. Conocimiento.
C.c.p. DR. LORENZO ALCÁNTAR GARCÍA, SUBDIRECTOR DE HOSPITALES. Notificado vía digital al correo sub.hospitales@ssm.gob.mx. Mismo fin.
C.c.p. DR. JUAN JOSÉ ORELLANA GARIBAY, RESPONSABLE DEL CENTRO ESTATAL DE TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA. Notificado vía digital al correo juan.orellana@ssm.gob.mx. Mismo fin.
C.c.p. TRINIDAD MARGARITA ZUÑIGA NAVARRO, ASESOR TÉCNICA DEL CETS. Notificado vía digital al correo nazu_mar@hotmail.com. Atención y fines pertinentes.
C.c.p. FABIOLA EDELY MÁRQUEZ TORRES, ASESOR TÉCNICA DEL CETS. Notificado vía digital al correo fabiola_edely@hotmail.com. Atención y fines pertinentes.

MCE:env



**SERVICIOS
DE SALUD**



<http://ssm.gob.mx>



Servicios de Salud Morelos



@MorelosSalud



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



**DR. JEAN MICHEL GRÉVY MACQUART
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada: **Generación de un método de selección clonal específico de antígeno y su aplicación para la identificación de anticuerpos monoclonales contra el SARS-CoV-2**, que presenta el alumno **Rocio Quinto Manzanares (10046083)** para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Director de tesis: Dra. Hilda Minerva González Sánchez.

Unidad Académica: Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas (IICBA)

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Iván Martínez Duncker Ramírez CIDC – UAEM	APROBADO	
Dra. Verónica Mercedes Narváez Padilla CIDC – UAEM	APROBADO	
Dr. Victor Hugo Bermúdez Morales INSP	APROBADO	
Dr. Ramón Antonio González García- Conde CIDC – UAEM	APROBADO	
Dra. María Angélica Santana Calderón CIDC – UAEM	APROBADO	





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

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2023-02-24 11:46:11 | Firmante

1gCFtVdERxmsvlzs0I3WwPYKqA8q2VZ4qKi8X9+piSTy/Sqoii/wrhjLldhwlgHeN4pHlcYWYPyiNZEPIf1CmJr95JXdjQNo3YWo8DjJHgYBaQp7z+bZy2KEm7yKgs/qKcQz6l4384bg6
PI+DdeUh82YCGmZZ5z3aA5M//aiWMMY8lTYE++rJTkkwKqveP1Afd3LkbrASZJ0FkNjNpBJkfJjy8zBTKuJZV689ybGeBYjGxBh4kBrmCf9+fsIXd/d+LDgwcpcvt4idU+dlzQepuiqa
uNGPGxSqE10m2uCrhCBxm9uSSPWkBa0QdBkBeG0u2Dv4OzM3AnIN5cQHIBjvQ==

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



[v9iPd8Kbq](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/pXmFruAUcUk60c49z8lPa2ybiFU4E6l0>





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

VICTOR HUGO BERMÚDEZ MORALES | Fecha:2023-03-03 13:09:17 | Firmante

Ag9NpxmwNhlZqhs/xXBjBxgSkY6yR3nACmcs7ZUWYluLMuHVg/WpPI1KAsctSDv3nBYmn1etnMu2UcbAV1Amew3DrjGQsqdsN9AKz4u13quG2mlaLP0I3Fq6DGXkfSXJWOsO6YItzwUlllqmi/RZUYWe8qfcpdWPDJnVVI6r90NvcCX50jWxlZnwdgSs8gmh+OaDDaLOt+QqDJYYS+WbFKuorBQpwTrbokdUHn8nrPCLlgWLR5yzMNXJMkvemO1PQ+YRc/YfeJXp+0D6cDM5K4BcPIGBUoB93QLPxmLDej17ChZyKGNUdMfm+ykY47avRZMbHVCwpFXBtQIT8wDSg==

RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE | Fecha:2023-03-03 20:02:01 | Firmante

GZBlijr9+/yzt/Nv4HCckfRxyB9tDiwJttBex0N0JDw1FtHSp1pq8JoigOzBtTyWMLbeo11Kwmxsxv/RpeE4nUcUANIMB+tCLkJ05rM2uLPucy9BA6hz/8RMqeZXmLJMNEfnDXEKR3i4zmDrjy+GRMR13T0YWeP5O9IEf+VmucglG11ixCD05jPBLFAWx46YHv9Af2atOIRQN1tol/I+CU0JfcJundxN/oubZFnReWlLhSOZK4baXxPbOmDm44qm8hIEv+4fjtQYZeFcvOitX2cjk1UrDx3a7OI2Yz9PUJtts80rPADLwhUhBpVcbU5nEsLkc6MjCRcY4vS7B8lw==

VERONICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA | Fecha:2023-03-13 23:01:37 | Firmante

UWnXty6L9KpXxHjWYpSVpj2/w5Baf/54nHDTjp8521vyQC7Q6G57wbmxXOVXxRTFdYEI7+/GNbfrPdlvKTgNK2FAC/4xCW1joQr25WWhrpxtCKqh/fNRs9HYqMfEPC9/JzDeS64fAZ+PbKcyVVFdAeDlGzQoRLGhwY0f2Ps4xkOC3k67tkDrAM7TI/OdWwO5AtyAWK1+5wC1t8aJhRNk3UKIry2mgnWxuB/gkCV62OKsl3BEXE1PfxTgcDbSzhKn/qG9ZesGR3bOhC0/OqYMGblFkvd3AJX2uik/IFA8nErbUGTp8Rdo7Evlhu2F3Z+9tnyXWZ/lrER7tZl9w==

IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha:2023-03-14 14:08:58 | Firmante

GlQCSngx3saZIEd26CnyNxEXVIS2SVc1ezFVEaJWD6EQrFGeEeYAJAwSyll/9k5QCDC/zyiauBqvrUntSZ70IKXSeITk+WyrBvITgkbaIMuSjxYQLw+NgLw52R73jPKpmi01T4KE+cRDueSRdQP8L1TulVvxg0WcfhZuCVIw0WRf53mq9+0I6UkNYShRSroOxCVnqIgdYlgtDAS/b/P6ut7WU2ibQ009FH0N9zqddrdzdiGF7KGHS/wLSrr1gVQVn48ES5UzMzimAuSy0l3cJBN50TEusB12wHHdEB/XzDTeOYK/gjj4pQ2mBkxjL0E+kZFdt/irJZ+PifNLkdXykg==

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



elanCxt4V

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/07YCXRjgMSH3C1zRdB2MpVfjdsRZp0Y>

