



**Universidad Autónoma de Sinaloa**  
**Facultad de Ciencias Químico Biológicas**  
**Programa Regional de Posgrado en Biotecnología**  
**Maestría en Ciencias con Orientación en Biotecnología**

**Evaluación de la Respuesta Humoral Evocada  
por la Inmunización con el DNA Codificante del  
Biomarcador CD20 de Leucemias de Linaje B**

**T E S I S**

que presenta

**LBG Marco Antonio Hernández Valenzuela**

como requisito para obtener  
el grado de

**Maestro en Ciencias  
con Orientación en  
Biotecnología de Salud**

**Director de Tesis  
Dr Héctor Samuel López Moreno**

**Culiacán Rosales, SIN, MEX    Noviembre 2019**

## **Presentación**

La presente investigación titulada “Evaluación de la Respuesta Humoral Evocada por la Inmunización con el DNA Codificante del Biomarcador CD20 de Leucemias de Linaje B” se llevó a cabo en el “Laboratorio de Biomedicina Molecular”, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. El Dr. Héctor Samuel López Moreno fungió como Director de Tesis. La Dra. Claudia del Rosario León Sicaños y Dra. Karen Virginia Pineda Hidalgo participaron como Asesoras Académicas. El LBG. Marco Antonio Hernández Valenzuela recibió “Beca Nacional para Estudios de Posgrado”, para Maestría en Ciencia, por dos años, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

## **Agradecimientos**

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por la beca aportada para mis estudios de maestría y la realización de este proyecto.

A la **Facultad de Ciencias Químico Biológica, Universidad Autónoma de Sinaloa** por darme el conocimiento y la infraestructura necesarios para llevar a cabo mi proyecto de maestría.

A la **Maestría en Ciencias con Orientación en Biotecnología de Salud**, por aceptarme en el programa y darme la oportunidad de realizar mis estudios.

Al **Dr. Héctor Samuel López Moreno** por aceptarme en el “Laboratorio de Biomedicina Molecular” (LBM), por apoyarme y no perder la fe en mí, a pesar de que hubo algunos tropiezos en el camino, por guiarme de la manera adecuada como todo un maestro zen y mucho más que eso por brindarme su amistad. Muchas gracias por incluirme en esta familia a la que llamamos LBM.

A la **Dra. Claudia del Rosario León** por su disposición y su apoyo incondicional en todo este tiempo desde licenciatura y por seguirme apoyando aun en la maestría.

A la **Dra. Karen Virginia Pineda Hidalgo** por su apoyo y toda la ayuda que me brindo a lo largo de este proyecto.

A los morritos del LBM **Rodrigo, AnaCecy, Paloma, Faby, MaryCris, Rodolfo, Daniel, Mauricio, Mónica, Pris, Fabiola, Ulises, Lluvia, Alexis, Alejandra**. Muchas gracias por toda su ayuda a lo largo de estos dos años, gracias por su ayuda tanto en el laboratorio como fuera de él, por ser más que compañeros, ser amigos. También un agradecimiento especial a la **Dra. Carito** y la **Dra. Kenny** que cuando más ocupe su ayuda me la brindaron a pesar de estar ocupadas hicieron tiempo para mí y me aconsejaron.

A mis compañeros de Maestría **Grimaldi, Daniel, Luz, Marycruz, Nadia** y **Ana** por su ayuda a lo largo de todas las clases de la maestría, por ayudarme a estudiar, además de brindarme su amistad.

A mis Amigos **Rodrigo, Grimaldi, Cruz** por su apoyo a lo largo de estos años, desde la licenciatura por ser un pilar emocional para mí, que siempre han estado para apoyarme.

A mi Familia en especial a mi **Papá** y a mi **Mamá**, los cuales se han asegurado que nunca me faltara nada a lo largo de este viaje, desde comida, un hogar para vivir y por cuidarme durante este largo viaje.

## INDICE GENERAL

	<b>Pág</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	iii
<b>INDICE DE CUADROS</b>	iv
<b>I RESUMEN</b>	1
<b>I ABSTRACT</b>	2
<b>II INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>III REVISIÓN DE LA LITERATURA</b>	5
<b>A LEUCEMIA</b>	5
1 Clasificación	5
a Leucemia Mieloide	5
b Leucemia Linfoide	11
<b>B ANTICUERPOS MONOCLONALES</b>	20
1 Mabs en leucemia	24
<b>C INMUNIZACIÓN CON DNA</b>	28
<b>IV JUSTIFICACIÓN</b>	29
<b>V HIPÓTESIS</b>	30
<b>VI OBJETIVOS</b>	31
<b>A OBJETIVO GENERAL</b>	31
<b>B OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	31
<b>VII MATERIALES Y MÉTODOS</b>	32
<b>A MATERIALES</b>	32
1 Modelo animal	32
<b>B METODOLOGÍA</b>	32
1 Diseño de oligonucleótidos	32
2 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica	32
3 Extracción de RNA con TRIZOL	33
4 RT-PCR	34
5 Purificación de DNA plasmídico	34
6 Obtención de la construcción plasmídica	35
7 Producción de células competentes	35
8 Transformación de <i>E. coli</i> Top 10	35

9	Inmunización de ratones	36
10	ELISA	36
11	Western Blot	37
<b>VIII</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>38</b>
	<b>A CONSTRUCCIÓN DE DNA RECOMBINANTE CONTENEDOR DEL GEN DEL BIOMARCADOR CD20</b>	<b>38</b>
1	Diseño de oligonucleótidos	38
2	Extracción de RNA	42
3	RT-PCR	44
4	Construcción plasmídica PCD20	46
5	Colony PCR	48
	<b>B EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA HUMORAL ANTÍGENO – ESPECÍFICA</b>	<b>51</b>
<b>IX</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>55</b>
<b>X</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>58</b>
<b>XI</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>60</b>
	Abreviaturas	71
	Anexo	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág</b>
1	Tasa de incidencia de Leucemia por cada 100,000 individuos a nivel mundial	6
2	Detección de la translocación cromosoma t(9;22)(q34;11)	7
3	Estructura de los genes <i>BCR</i> y <i>ABL</i> normales y las posibles fusiones encontradas en casos de CML	9
4	Morfología de las células de AML según la clasificación de la FAB	10
5	Evolución de la expansión clonal en ALL y CLL	14
6	Esquema de la función potencial de las células Th en la B-ALL	16
7	Estructura de una IgG	21
8	Esquema de los mecanismos efectores de los Abs	22
9	Clasificación de los MAbs	23
10	Determinantes antigénicos o sitios de unión de Ofatumumab y Rituximab en la molécula de CD20	27
11	Diseño de oligos para la secuencia del GeneBank NM_021950	39
12	Amplicon obtenido en el análisis in silico correspondiente al gen CD20	40
13	Construcción PCD20	41
14	RNA total de sangre periférica	43
15	Amplificación del gen <i>CD20</i> humano	45
16	Purificación del plásmido pCDNA6	47
17	Selección de colonias transformadas.	48
18	Evaluación de las colonias transformadas mediante <i>colony</i> PCR	50
19	Perfil proteico de extracto crudo de lymphoprep	52
20	Respuesta de sueros de ratones contra CD20	53
21	Inmunodetección de biomarcador CD20	54

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág</b>
1	Sistema de clasificación del Grupo Europeo de Clasificación Inmunológica de Leucemias (EGIL)	17
2	Marcadores y MAbs contra leucemia	25



## I. RESUMEN

La Leucemia es un tipo de cáncer hematopoyético que puede afectar cualquiera de los precursores de los diferentes linajes celulares de la médula ósea, provocando una neoplasia maligna, caracterizada por una proliferación aumentada de leucocitos disfuncionales presentes en sangre, los cuales trastocan hematopoyesis normal, limitando la producción de nuevas células sanguíneas sanas. A nivel mundial se reportan aproximadamente 350,000 casos nuevos de leucemia, que provocan 265,000 muertes por año. En México, la leucemia es el tipo de cáncer más común en la población menor de 22 años, representando más del 50% de los tipos de cáncer reportados. El tratamiento contra la leucemia suele constar de diferentes terapias multimodales que engloban quimioterapias, radioterapias y trasplantes de médula ósea, las cuales suelen provocar efectos secundarios como pérdida de cabello, vómitos, dolor generalizado, entre otros. En los últimos años se ha añadido a las terapias contra leucemia el uso de inmunoterapéuticos como los anticuerpos monoclonales (MAbs), que provocan menos efectos adversos, por ejemplo, Rituximab el cual reconoce al biomarcador CD20 específico para leucemias de linaje B. Para la producción de un MAb generalmente se inmuniza roedores pequeños para obtener células que generen anticuerpos (Abs) y mediante una fusión química producir un hibridoma capaz de generar MAbs, no obstante, en proteínas transmembrana como CD20 debido a su estructura compleja e insolubilidad suele ser complicado obtener Abs que las reconozcan de manera adecuada, además el uso de péptidos sintéticos o proteínas recombinantes solo permiten generar Abs que reconocen la estructura lineal de la proteína, por lo que su uso es limitado como agentes terapéuticos. Por lo cual nuestro grupo de investigación optó por emplear la estrategia de inmunización con DNA para generar Abs contra CD20, empleado una construcción la cual contenía la región codificante de dicho biomarcador. El gen fue clonado mediante la técnica de RT-PCR utilizando el RNA de células mononucleares de sangre periférica, posteriormente se insertó en el plásmido pCDNA6 para generar la construcción PCD20, la cual se usó para inmunizar ratones BALB/c. Se evaluó la respuesta humoral antígeno específica mediante ELISA utilizando los sueros de los ratones inmunizados, donde se pudo observar una producción de Abs  $\alpha$ -CD20 en niveles comparables a los de un Ab comercial. Este resultado fue verificado mediante *Western blot* donde se observó una única banda de reacción, consistente con el peso molecular de CD20. Concluyendo que la inmunización con DNA permite generar una respuesta humoral antígeno-específica contra la proteína CD20, estableciendo las bases biotecnológicas para la producción de un MAb específico contra leucemias de linaje B.

**Palabras Clave:** *Inmunización, DNA, CD20, Abs, MAbs, inmunoterapéuticos*

## I. Abstract

Leukemia is a type of hematopoietic cancer that can affect any of the precursors of the different cell lines of the bone marrow, causing a malignant neoplasm, characterized by an increased proliferation of dysfunctional leukocytes present in blood, which disrupt normal hematopoiesis, limiting the production of new healthy blood cells. Worldwide, approximately 350,000 new cases of leukemia are reported, causing 265,000 deaths per year. In Mexico, leukemia is the most common type of cancer in the population under the age of 22, representing more than 50% of the types of cancer reported. The treatment against leukemia are different multimodal therapies that include chemotherapies, radiotherapy and bone marrow transplants, which usually cause side effects such as hair loss, vomiting, generalized pain, among others. In recent years, the use of immunotherapeutics such as monoclonal antibodies (MAbs) has been added to leukemia therapies, that causes less adverse effects, for example, Rituximab which recognizes the specific CD20 biomarker for lineage B leukemias. To produce a MAb, small rodents are usually immunized to obtain cells that generate antibodies (Abs) and by chemical fusion produce a hybridoma capable of generating MAbs, however, in transmembrane proteins such as CD20 due to its complex structure and insolubility frequently is complicated to obtain Abs that recognizes in the properly way, in addition the use of synthetic peptides or recombinant proteins will only allow to generate Abs that recognizes the linear structure of the protein, so its use is limited as therapeutic agents. Therefore, our research group chose to use the DNA immunization strategy to generate Abs against CD20, using a construct that contains the coding region of biomarker CD20. The gene was cloned by the RT-PCR technique using peripheral blood mononuclear cells RNA, and subsequently inserted into plasmid pCDNA6 to generate the PCD20 construct, which was used to immunize BALB / c mice. The specific antigen humoral response was evaluated by ELISA using serum from immunized mice, where a production of Abs  $\alpha$ -CD20 could be detected at levels comparable to a commercial Ab. This result was verified by Western blot where a single reaction band was detected, consistent with the molecular weight of CD20. Concluding that the immunization with DNA allows to generate an antigen-specific humoral response against the CD20 protein, establishing the biotechnological bases for the production of a specific MAb against lineage B leukemias.

**Keywords:** *Immunization, DNA, CD20, Abs, MAbs, immunotherapeutic*

## II. INTRODUCCIÓN

La leucemia es un grupo de cánceres heterogéneos hematopoyéticos que afecta la ontogenia, de cualquiera de los linajes mieloides o linfoides, afectando por ejemplo a los eritrocitos, plaquetas y leucocitos, maduros y funcionales. Es el segundo cáncer más común en la sangre, siendo a su vez el cáncer más común en niños representando aproximadamente el 25% de los cánceres diagnosticados en pacientes menores de 15 años. En México la leucemia tiene una incidencia de 5 a 6 casos por cada 100, 000 habitantes (Filho y col., 2018). Esta suele clasificarse generalmente dependiendo de la transformación maligna de la célula hematopoyética o del progenitor celular en la medula ósea, por lo cual se suele agrupar en leucemias mieloides o linfoides además dependiendo de la progresión de la enfermedad esta misma puede ser aguda o crónica (Arber y col., 2016). Los síntomas de la leucemia suelen ser muy variados, pero generalmente los pacientes suelen presentar hemorragias frecuentes sin motivo aparente en encías o nariz, dolor o sensibilidad en articulaciones y extremidades, fiebre, fatiga, palidez en la piel, la boca o en los párpados, pérdida de apetito, fatiga, inflamación de los ganglios linfáticos hígado y bazo, sudor frío, erupciones en la piel o petequias, entre otras (Leak-Bryant y col., 2018). El tratamiento para esta enfermedad suelen ser quimioterapias, radioterapias y trasplantes de medula ósea, además del uso de inmunoterapéuticos como los anticuerpos monoclonales (MAbs) (Mehrling y col., 2014), estos últimos se unen a antígenos de superficie activando efectores de la respuesta inmune para la mediar la lisis de las células cancerosas, entre estos mecanismos se pueden destacar la lisis mediada por la vía clásica del complemento, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o la inducción de apoptosis por cascadas de señalización (Glennie y col., 2007). Algunos MAbs ya han sido aprobados por la FDA como Alemxtuzumab que reconoce a CD52 de los linfocitos T y B en linfomas, Epratuzumab que reconoce a CD22, Blinatumomab que reconoce CD19 de los linfocitos T de linfomas y Rituximab, Ofatumumab y Obinutuzumab que se unen al CD20 de superficie de los linfocitos B cancerosos en linfomas no Hodgkin como la leucemia (Jabbour y col., 2014). El uso de este tipo de MAbs puede ser de gran ayuda en el tratamiento de la leucemia sin embargo el precio de estos suele ser muy elevado, además de tener poca disponibilidad en países en vía de desarrollo como México. Para producir un MAb es necesario crear un hibridoma

a partir de la fusión de células de mieloma y linfocitos que produzcan anticuerpos que reconozcan a nuestra proteína diana, para obtener estos últimos generalmente se inmuniza ratones con la proteína y se extrae sus esplenocitos (Buss y col., 2012). Sin embargo, se ha descrito que la inmunización con la proteína CD20 puede presentar algunos inconvenientes, principalmente debido a su insolubilidad y la pérdida de sus epitopos (Liu y col, 2018). Con la finalidad de superar este tipo de inconvenientes, además de evitar la laboriosidad de la detección y purificación de la proteína, se optó por emplear la técnica de inmunización con DNA, utilizando DNA plasmídico, la cual tiene la ventaja de ser una técnica simple, rápida, barata, la cual no requiere ningún equipo especializado (Hollister y col, 2014; Eden y col., 2017). Este trabajo pretende emplear la estrategia de inmunización con DNA, permitirá evocar una respuesta humoral para producción de anticuerpos contra el biomarcador CD20 de células leucémicas de linaje B, asentado así las bases para la futura producción de un inmunoterapéutico alternativo a los comercial contra leucemias de dicho linaje.

### III. REVISIÓN DE LA LITERATURA

#### A Leucemia

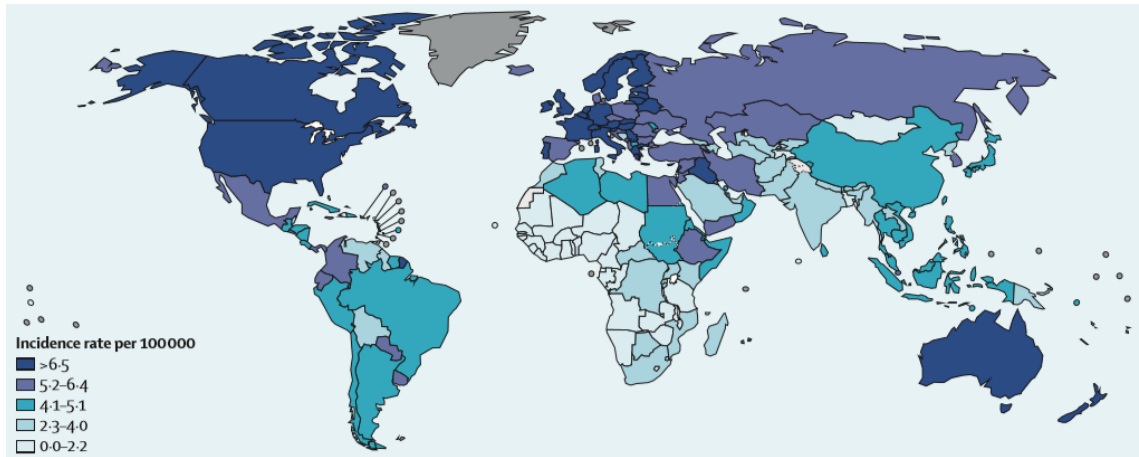
Las leucemias son un grupo heterogéneo de cánceres hematopoyéticos que afecta a un gran número de individuos biológicamente diversos. Este tipo de cánceres hematopoyéticos ocupan la 11ª y 10ª causa más frecuente de muerte por cáncer a nivel mundial, con un aproximado de 350, 000 casos nuevos y 265, 000 muertes por año. Teniendo un mayor índice de incidencia (Figura 1) en países de América del norte como Estados Unidos y Canadá, en países de Europa como Noruega, Suecia, Finlandia, Alemania y Polonia y en Países de Oceanía como Australia y Nueva Zelanda (Filho y col., 2018). La causa de la leucemia todavía no está totalmente elucidada, en parte por la gran diversidad de anomalías y los múltiples factores de riesgo asociados a esta enfermedad. Muchos síndromes genéticos han sido asociados a la predisposición de leucemia en adultos jóvenes, como el síndrome de Down, Li-Fraumeni y la neurofibromatosis (Stieglitz y col., 2013).

#### 1 Clasificación

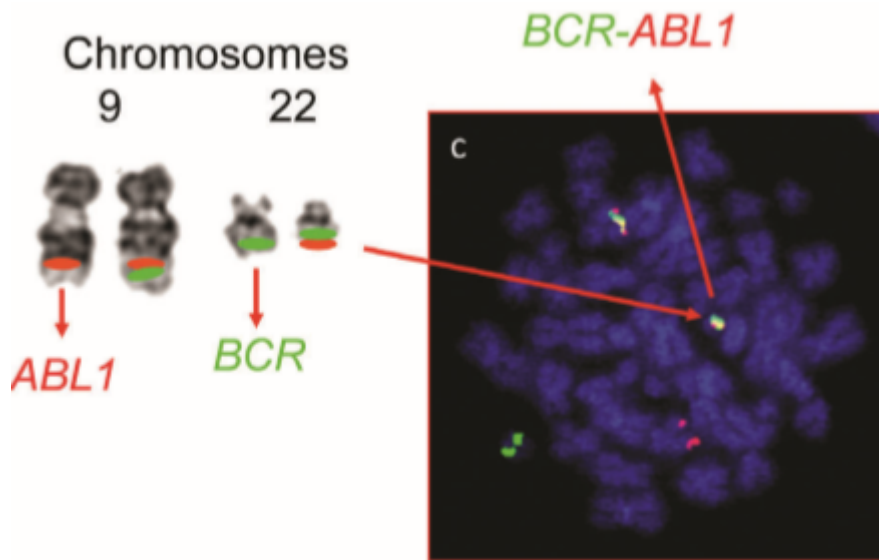
La leucemia suele clasificarse generalmente dependiendo de la transformación maligna de la célula hematopoyética o del progenitor celular en la médula ósea, por lo cual se suele agrupar en leucemias mieloides o linfoides, si la leucemia se manifiesta en un precursor inmaduro o en una célula madura también se le puede clasificar como aguda o crónica (Filho y col., 2018).

#### a Leucemia Mieloide

La Leucemia crónica mieloide (CML) es un raro desorden en las células precursoras de origen hematopoyético, caracterizado principalmente por la presencia de una translocación cromosómica, que genera el oncogén *BCR-ABL1*. Este oncogén produce una proteína llamada Bcr-Abl1 o p210 (Figura 2) con una actividad constitutiva de tirosina cinasa, que es la causa principal de la fase crónica de la CML (Mughal y col., 2016). Específicamente una translocación recíproca t(9:22) (q34;q11) entre cromosomas, este rearrreglo específico está presente prácticamente en todos los casos de CML y es identificado por la presencia del cromosoma Filadelfia en células leucémicas. Sin embargo, en aproximadamente el 5% de los casos de CML no presentan



**Figura 1.** Índice de incidencia de Leucemia por cada 100, 000 individuos a nivel mundial (Filho y col., 2018)

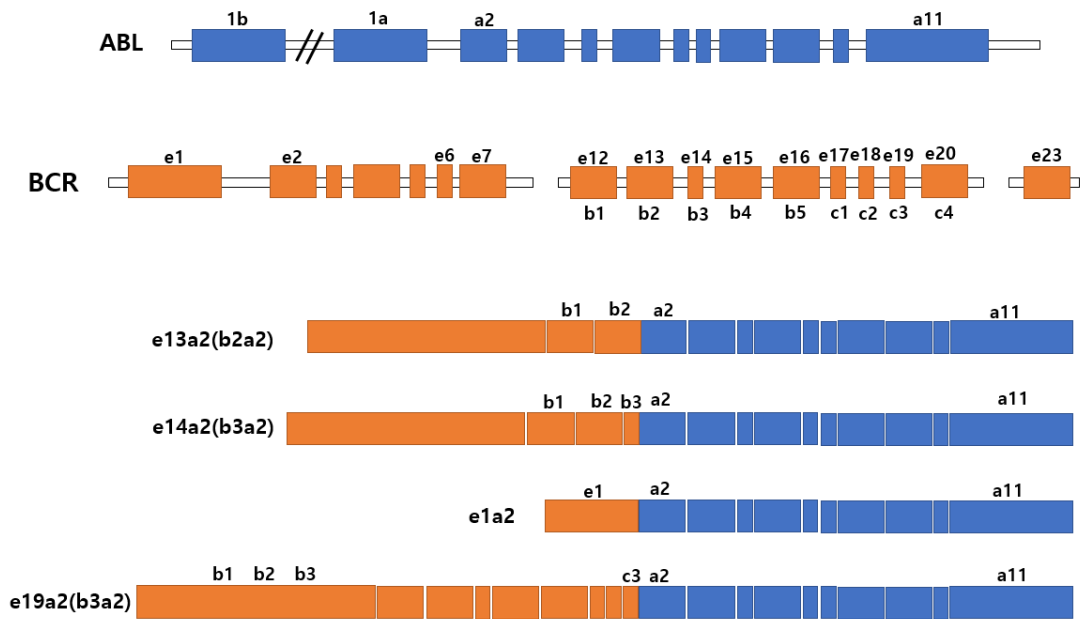


**Figura 2.** Detección de la translocación cromosoma t(9;22)(q34;q11). En la cual se muestra un cariotipo parcial con prueba de FISH donde la fusión entre las señales rojas representa al cromosoma 9, la verde al cromosoma 22 y la fusión de la señal roja y verde la presencia de *BCR-ABL1* (Mughal y col., 2017).

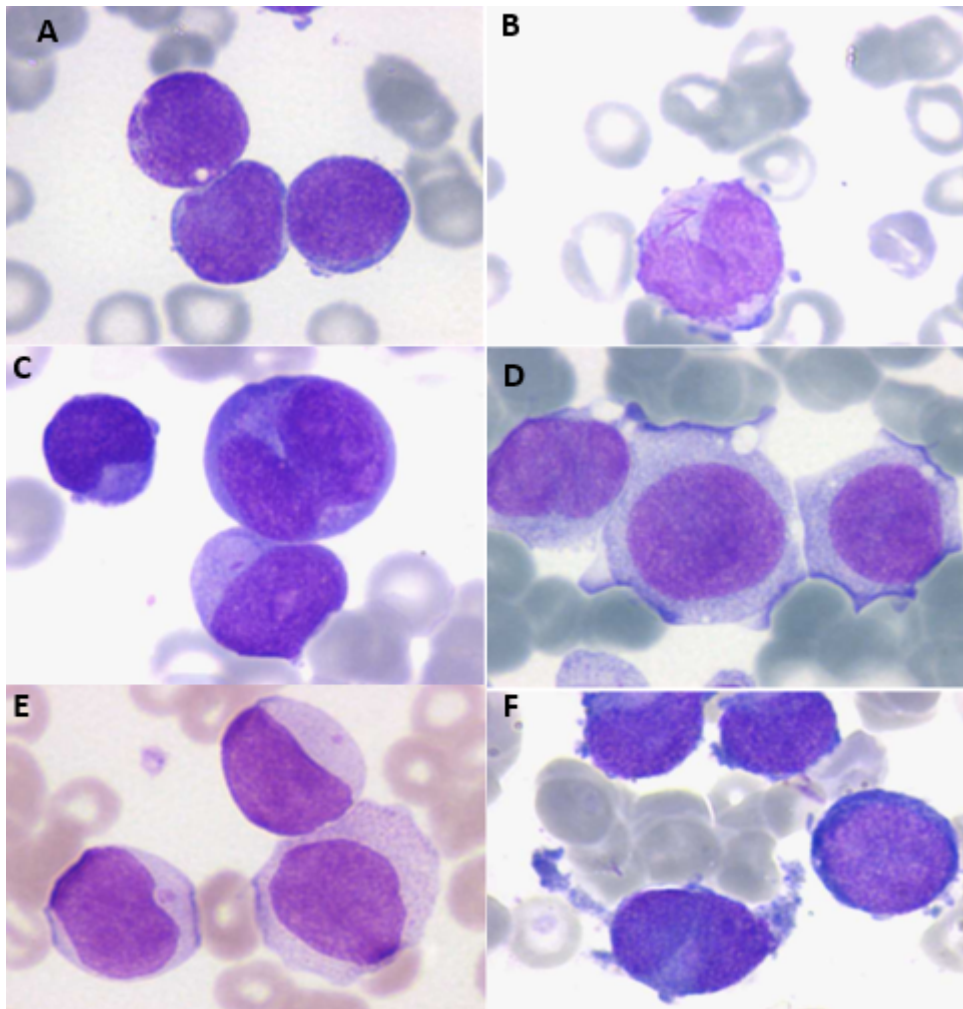
este rearrreglo, una inserción no recíproca entre el cromosoma 9 o 22 puede impedir la aparición de la translocación clásica, lo cual puede causar este fenómeno, la inserción puede ocurrir en cualquiera de los dos cromosomas, pero puede ocurrir con mayor frecuencia en el cromosoma 9. Otra posibilidad es la aparición de una nueva translocación inversa que puede implicar diferentes puntos de ruptura en la translocación clásica entre los cromosomas, debido a la posición distal o proximal de los puntos de corte. También es posible observar una reorganización diferente que involucra uno o más regiones cromosomas adicionales (Figura 3) lo cual puede generar un gen quimérico *BCR-ABL1* (Molica y col., 2017; Mughal y col., 2016; Zhou y Xu, 2015).

La leucemia mieloide Aguda (AML), es el tipo de leucemia más común en adultos y poco común en niños. Este tipo de leucemia afecta la transformación de células progenitoras hematopoyéticas, lo cual conduce a un bloque en a la diferenciación, provocando así un aumento en el número de células progenitoras y disminuyendo el número de células maduras (Puumala y col., 2013). Este tipo de leucemia se puede clasificar por sus características morfológicas según la escala del grupo cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB) la AML se puede clasificar en varios subtipos (Figura 4), en AML0 o mínimamente diferenciada, en la AML1 o mieloblástica sin maduración se suele observar la ausencia de células en estadios posteriores a mieloblasto en sangre periférica además los blastos pueden presentar una granulación azurófila y algún bastón de Auer. En la LAM2 o mieloblástica con maduración las células suelen presentar una cromatina laxa e inmadura con uno o varios nucléolos visibles. En la AML3 o Promielocítico las células presentan un núcleo irregular generalmente con una hendidura amplia. La AML4 o mielomonocítica los blastos monocíticos son de gran tamaño con un núcleo de forma irregular. La AML5 o monocítica puede presentar blastos monocíticos de con un núcleo redondo de tamaño grande (AML5a) o en los monoblastos se puede observar una elevada proporción de promonocitos y monocitos (AML5b) (Merino, 2010).





**Figura 3.** Estructura de los genes *BCR* y *ABL* normales y las posibles fusiones encontradas en casos de CML. Donde se muestra 4 exones del gen *ABL* donde 1a y a2 representan puntos de corte. Además de 23 exones de gen *BCR* donde solo e1, e12-e16 y e23 representa un punto de corte (modificado de Mughal y col., 2017).



**Figura 4.** Morfología de las células de AML según la clasificación de la FAB. Donde A=AML1, B=AML3, C= una variante de AML3, D= AML5a, E=AML5b, F=AML7 (Merino 2010).

## **b Leucemia Linfoide**

La leucemia linfocítica puede ser tanto crónica como aguda. La Leucemia linfocítica crónica (CLL), es la leucemia más común en adultos en la parte occidental del mundo. Esta es caracterizada por una expansión clonal de linfocitos B que expresan CD5, CD19, CD23 y bajos niveles de Ig de membrana, en sangre, medula ósea y tejidos linfoides secundarios (Zhang y Kipps, 2014). Recientes estudios han evidenciado que las células con CLL puede expresar el receptor huérfano de la tirosina-cinasa (ROR1), el cual normalmente es expresado solamente durante el desarrollo embrionario. Los linfocitos B ROR1<sup>+</sup> aislados de donadores saludables presenta un fenotipo heterogéneo, específicamente ellos pueden expresar CD19 y CD27 pero no CD38, o pueden expresar CD19 y CD38, pero no CD27. Sin embargo, la subpoblación de células B ROR1<sup>+</sup> que expresan CD38, tiene niveles relativamente altos de CD5 y CD23, considerados marcadores de CLL, sugiriendo de esta manera que los linfocitos B ROR1<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> en personas sanas podrían ser precursores para la aparición de CLL (Risnik y col., 2017).

Por otro lado, la leucemia linfoblástica aguda (ALL) es una transformación y proliferación maligna de los progenitores linfoides dentro de la medula ósea, sangre y sitios extramedulares (Terwilliger y Abdul-Hay, 2017). Aproximadamente el 80% de los casos de ALL ocurren en niños y se estima que tiene una incidencia de aproximadamente 1.6 personas de cada 100, 000., en los Estados Unidos, en el 2016 la *American Cancer Society* estimó un total de 6, 590 casos nuevos de ALL y reporto 1, 400 muertes debido a ésta (Terwilliger y Abdul-Hay, 2017). La patogénesis de la ALL involucra una proliferación y diferenciación anormal en la población de clonas linfoides, ya sean de linaje T o B (Zawily y col., 2017). T-ALL específicamente se caracteriza por una agresiva transformación maligna de timocitos inmaduros, entre las mutaciones más frecuentes encontradas en T-ALL, estas deleciones cromosomales provocan la inactivación de CDKN2A/2A y CDKN2A/2B, lo que produce una inactivación en las proteínas INK4a y ARF (Factor de ribosilación de ADP 1) respectivamente, las cuales funcionan como supresoras de tumores y provoca la sobreexpresión de *NOTCH3* (Girardi y col., 2017). Además, la expresión algunos factores de transcripción como, TAL1, LMO1, LMOL2, BCL11B y HOX11 está

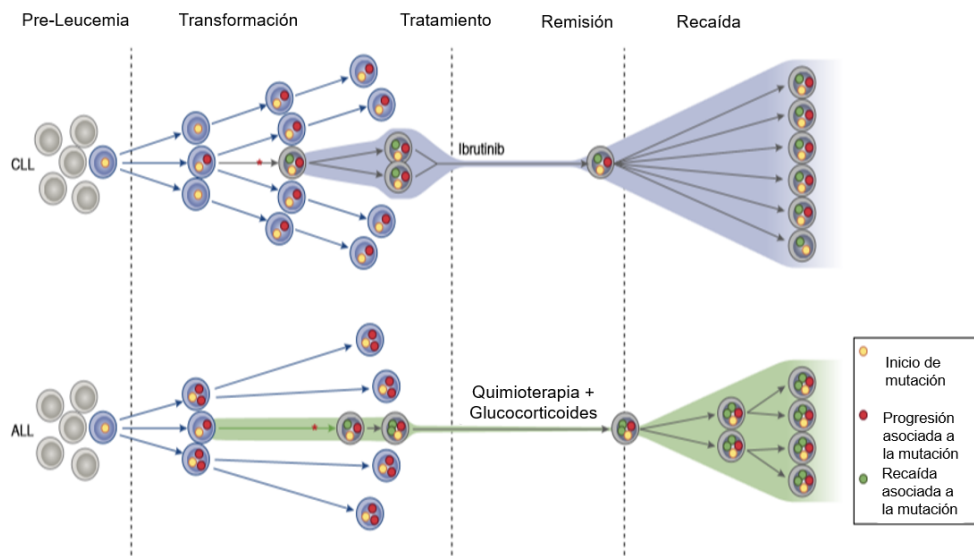
frecuentemente alterada en células que presentan esta anomalía. Se ha reportado un subtipo de linfocito T inmaduro (Timocito) de alto riesgo para ALL, denominado precursor temprano de linfocito T. Éste está caracterizado por la expresión de ciertos marcadores inmunológicos y un perfil de expresión de genética que le permite diferenciarse tanto en subpoblaciones de linaje T como mieloides, pero no en células de linaje B (Pui y col., 2012). Estudios de secuenciación de genoma completo, han demostrado que el espectro mutacional de esta subpoblación comparte algunas características con la AML. Las mutaciones frecuentemente involucran genes que regulan el desarrollo hematopoyético como *GATA3*, *ETV6*, *RUNX1*, *IKZF1* y *EP300*, también genes relacionados con receptores de citocinas y la señalización de RAS como *NRAS*, *KRAS*, *FTL3*, *IL7R*, *JAK1*, *SH2B3* y *BRAF*, además de genes relacionados con la modificación de histonas como *EZH2*, *EDD*, *SUZ12* y *SETD2* (Pui y col., 2012).

Otras mutaciones que afectan genes involucrados en el desarrollo linfoide y la supresión tumoral como *ARID5B*, *IKZF1*, *CEBPE*, *CDKN2A*, *BMIP42A* y *TP64*, han sido asociados con el riesgo de desarrollar ALL (Moriyama y col., 2015). EL *ETV6*, el cual es esencial para la hematopoyesis particularmente en la trombopoyesis, ha sido asociado con el síndrome mielodisplásico y las ALL progenitoras de linfocitos T (T-ALL). Sin embargo, la predisposición hereditaria es raramente considerada en el diagnóstico clínico. Estos datos plantean la posibilidad de que la incidencia de casos atribuidos a mutaciones genéticas heredadas de ALL, pueden ser más altas de lo que se propone (Moriyama y col., 2015; Hungate y col, 2016). Dentro de las ALL las ALL de precursoras de linfocitos B (B-ALL) son más comunes en niños, generalmente los hermanos de los niños afectados tienen un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad. En algunas familias de Africano-Americanos y Puertorriqueños, se ha identificado una variante de línea germinal heterocigota de *PAX5*, el cual es esencial para el mantenimiento de la identidad y función de las linfocitos B maduros, la cual podría está ligada al desarrollo esta de la leucemia (Shah y col., 2013).

La evolución clonal de este tipo de cáncer (Figura 5), es un proceso en el que está involucrado en las alteraciones genéticas y epigenéticas emergentes (Landau y col., 2014). Los análisis genómicos de la composición clonal de las

leucemias positivas para ETV6-RUNX1 indican un patrón evolutivo ramificado, con múltiples clonas coexistentes (Anderson y col., 2011). La identificación de alteraciones genéticas compartidas apunta a una evolución convergente entre las clonas, pero también es posible tener alteraciones adquiridas en las clonas en etapas variables de forma aleatoria sin un orden determinado (Ferrando y col., 2017).

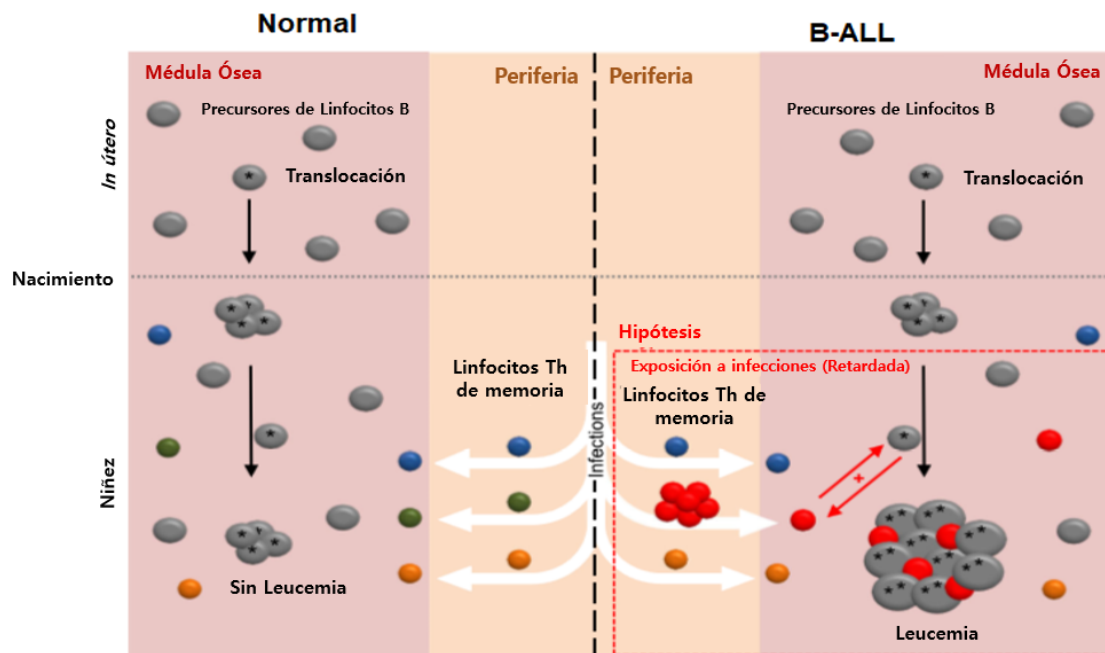
Pero no solamente los factores genéticos están involucrados en el desarrollo de LLA, se ha demostrado que las células endoteliales de la médula ósea, osteoblastos y adipocitos pueden interactuar con células B-ALL en mecanismos que involucran factores solubles como citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento además de moléculas de unión a membrana como galectina-3 o VE-caderina (Fei y col., 2015). También se ha demostrado que los centros germinales además de proporcionar un entorno adecuado para la interacción de los linfocitos Th foliculares (Thf) y los linfocitos B, son el lugar donde la transformación maligna de linfocitos B en leucemia ocurre con mayor frecuencia (Bügler y Nadal, 2017).



**Figura 5.** Evolución de la expansión clonal en ALL y CLL (Ferrando y col., 2017).

La cooperación fisiológica de linfocitos T para los linfocitos B tiene lugar en los centros germinales dentro de los órganos linfoides secundarios, donde los linfocitos Th<sub>1</sub> interactúan con los linfocitos B estimuladas por antígenos procesados, esta interacción implica moléculas ligadas a membrana como CD40 en los linfocitos B y CD40L en los linfocitos Th, además de citocinas, quimiocinas, BAFF o el ligando FMS relacionado con la tirosina cinasa 3 (flt3). Estas células Th podrían no solo promover el desarrollo de linfocitos B normales en los centros germinales, sino también de linfocitos B malignos (Figura 6) (Troeger y col., 2014; Bi y col., 2016;). En células de linfoma folicular, un tipo de cáncer donde los linfocitos B malignos residen en los folículos de los ganglios linfáticos, se ha demostrado un incremento en su supervivencia al estimular los linfocitos con CD40 *in vitro* (Parente-Ribes y col., 2016). El Linfoma de Hodgkin, otra neoplasia de linfocitos B, la cual forma tumores sólidos en órganos linfoides, también puede surgir de los linfocitos B del centro germinal, se caracteriza por la infiltración de los linfocitos Th aunque la función de estos linfocitos Th no está del todo clara, su presencia se ha correlacionado con un incremento en la supervivencia global de los linfocitos B malignos (Bügler y Nadal, 2017; Pangault y col., 2010).

La ALL es el tipo de leucemia más común en la niñez, el diagnóstico de ésta se basa en la identificación de síndromes sugestivos como el síndrome infiltrativo, hemorrágico, anémico o síndrome febril, además en la determinación por estudios morfológicos, por inmunohistoquímica, fenotipo y biología molecular. La diferenciación morfológica según el grupo cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB), se clasifica en L1, L2, L3. Otro Sistema de clasificación más usado en la actualidad es el propuesto el grupo Europeo de Clasificación Inmunológica de Leucemias (EGIL), la cual emplea el uso de anticuerpos monoclonales y los citómetros de flujo multiparamétricos, para detectar antígenos asociados con los linajes hematopoyéticos (Cuadro 1) (Chiaretti y col., 2014). Los antígenos seleccionados por el EGIL para B-LL son el CD79a que corresponde a una proteína transmembrana unida a la inmunoglobulina de membrana, que forma parte de un receptor para el reconocimiento antigénico de los linfocitos B (BCR), además de CD22 y CD19. Para el linaje linfocitoide-T se busca CD2, CD3, y CD5 principalmente, que se expresan en el citoplasma en el desarrollo temprano de los linfocitos T (Dorantes-Acosta y col., 2013)



**Figura 6.** Esquema de la función potencial de los linfocitos Th en la B-ALL. Donde los linfocitos Th expandidos clonalmente, durante una respuesta inmune aberrante debido a la exposición retardada del patógeno pueden interactuar con los linfocitos B precursores o células leucémicas o ambas, después de la migración a la médula ósea (Bügler y Nadal, 2017).



**Cuadro 1.** Sistema de clasificación del Grupo Europeo de Clasificación Inmunológica de Leucemias (EGIL).

<b>Puntos</b>	<b>Linfoide B</b>	<b>Linfoide T</b>
<b>2</b>	CD79a	CD3
	CD22	
	IgM cyt	
<b>1</b>	CD19	
	CD10	CD2
<b>0.5</b>	TdT	CD5
		TdT
		CD7

(Dorantes-Acosta y col., 2013).

## 2 Tratamiento

Durante las últimas décadas diferentes terapias multimodales, aunadas a atención y cuidados especializados, han mejorado las tasas de supervivencia y aumentado el número de sobrevivientes de leucemia infantil, de los cuales un 80% de los casos son causados por B-ALL (Jemal y col., 2010; Felicia y col., 2014). Sin embargo, un gran número de los pacientes han presentado diversas complicaciones como cardiotoxicidad, neurotoxicidad, anomalías endocrinas, obesidad, infertilidad y efectos psicosociales entre otras debido a los tratamientos y a los cambios dentro de su estilo de vida estas complicaciones se pueden presentar justo después de terminar el tratamiento o un par de años después (Oeffinger y col., 2006; Iughetti y col., 2012). La radioterapia ha sido parte de estas terapias multimodales desde finales de 1960, sin embargo, debido a la cantidad de efectos secundarios que genera, las dosis de radioterapia utilizadas para tratar la leucemia infantil se han reducido o eliminado. A pesar de esto, la radiación corporal total (TBI) sigue siendo parte común del proceso de acondicionamiento de trasplante de células hematopoyéticas alogénicas (HCT), dado que en los pacientes con leucemias agudas el tratamiento más común es el HCT es inevitable el uso de esta en niños provocando aún más complicaciones (Chemaitilly y col., 2010). En diferentes estudios se ha reportado los casos de niños a los cuales se les ha administrado tratamiento con radioterapia craneal (CRT), radioterapia espinal (SRT) o TBI, provocando hipotiroidismo, estatura baja o infertilidad, en la cual se encontró una relación consistente entre los tratamientos, donde en relación con los pacientes que a los cuales no se les aplicaba radioterapia, Los pacientes tratados con CRT Y STR presentaban de 2 a 3 veces más efectos secundarios además de presentar un incremento de peso considerable, por otro lado los pacientes tratados con TBI tenían de 5 a 10 veces más efectos secundarios (Chow y col., 2013).

Otro de los tratamientos usados en las terapias multimodales es la quimioterapia, el uso de la intensidad apropiada de quimioterapia en pacientes con leucemia, puede resultar en el alivio de los síntomas, una mejora considerable en la calidad de vida y la prolongación de la supervivencia a pesar de los riesgos y efectos secundarios potenciales de la quimioterapia como náuseas, vómito, fiebre, sudor frío, temblores, pérdida de apetito, diarrea, dolor

de estómago, anemia, problemas de coagulación, fatiga, alteraciones en la capacidad reproductora, pérdida del cabello y supresión del sistema inmune (Bhatt y col., 2018 a, b). De esta manera la quimioterapia puede inmunocomprometer a los pacientes, aumentando el riesgo de contraer infecciones que amenacen su vida, incluidas infecciones fúngicas invasivas, causando un retraso considerable en el tratamiento de la leucemia debido a que cuando se contrae este tipo de infecciones la quimioterapia debe ser suspendida de inmediato y solo se podrá administrar al paciente una que vez la infección se elimine por completo, provocando un aumento en la morbilidad y mortalidad (Borowitz y col., 2015). Además, también se ha demostrado una menor tolerancia de la quimioterapia en pacientes con edades avanzadas y una mayor cantidad de trastornos relacionados con ésta (Kurosawa y col., 2012; Özlem y col., 2014; Patel y col., 2015).

Los intentos por mejorar la eficacia de los tratamientos, inventando varias combinaciones de agentes citotóxicos, han proporcionado resultados decepcionantes (Dotan y col., 2010). Los pacientes en su mayoría tratados en grandes ensayos cooperativos, experimentaron pocos beneficios con la intensificación de la dosis y la frecuencia, pero sufrieron reacciones adversas con mayor frecuencia y gravedad. Por ejemplo, los tratamientos con CHOP (Cyclophosphamide, Hydroxydaunomycin, Oncovin, Prednisolone) para linfoma, melfalan-prednisona para múltiple mieloma, o la terapia con base de platino para el cáncer de pulmón, fueron el estándar de tratamiento por décadas, provocando un alto índice de mortalidad en los pacientes (Dotan y col., 2010; Mehrling y col., 2014).

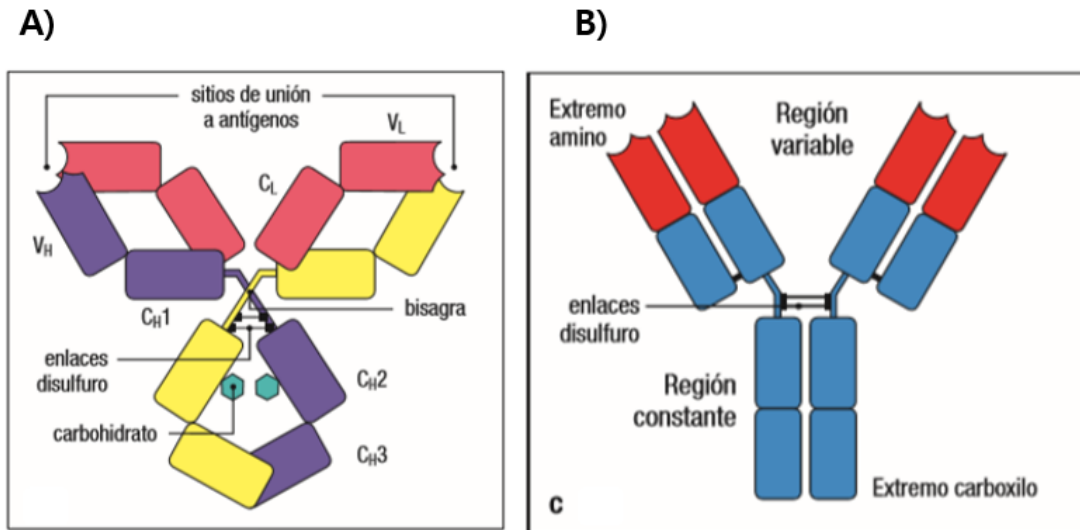
En los últimos años, el enfoque para desarrollar las terapias contra el cáncer ha cambiado, en lugar de usar químicos más potentes, se ha optado por emplear nuevas estrategias específicamente dirigidas hacia la destrucción de las células tumorales sin afectar a las células sanas, tratando de mejorar la eficacia y tolerabilidad de los tratamientos, mejorando la calidad de vida de los pacientes y disminuyendo los efectos adversos (Mehrling y col., 2014). Por ejemplo, nuevas terapias dirigidas como Imantinib, un inhibidor de cinasas, usado en el tratamiento contra CML y el tumor de estroma gastrointestinal, también podemos mencionar a Erlotinib usado contra el cáncer de pulmón con mutaciones en el

receptor del factor de crecimiento epidermal (Roengvoraphoj y col., 2013; Göthert y col., 2018). Otro tratamiento innovador que se ha desarrollado es el uso de anticuerpos monoclonales (MAbs) los cuales reconocen marcadores de superficie en las células cancerosas y las atacan.

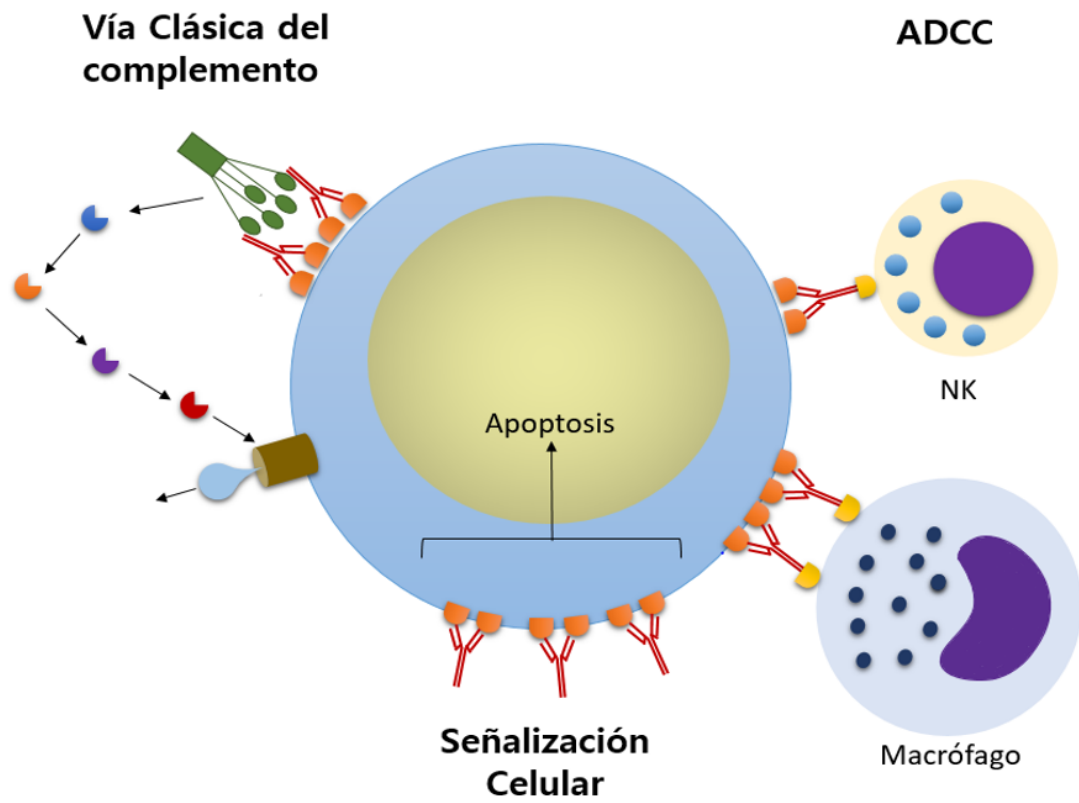
## **B Anticuerpos monoclonales**

Los anticuerpos (Abs) son glicoproteínas, pertenecientes a la superfamilia de las Ig, que son secretadas por los plasmocitos (célula efectora de los linfocitos B) para identificar y neutralizar organismos extraños y antígenos. Éstos están compuestos por dos cadenas ligeras y 2 cadenas pesadas, son agrupados en distintos isotipos dependiendo de la estructura primaria en su cadena pesada. Los anticuerpos monoclonales (MAbs) son generalmente del isotipo IgG, las regiones hipervariables de los MAbs se combinan para formar la fracción de unión a los antígenos (Fab), mientras que su fracción cristalizable (Fc), dominio responsable de la función efectora, está compuesto de dos cadenas constantes (Figura 7) (Stern y Herrmann, 2005; Buss y col., 2012).

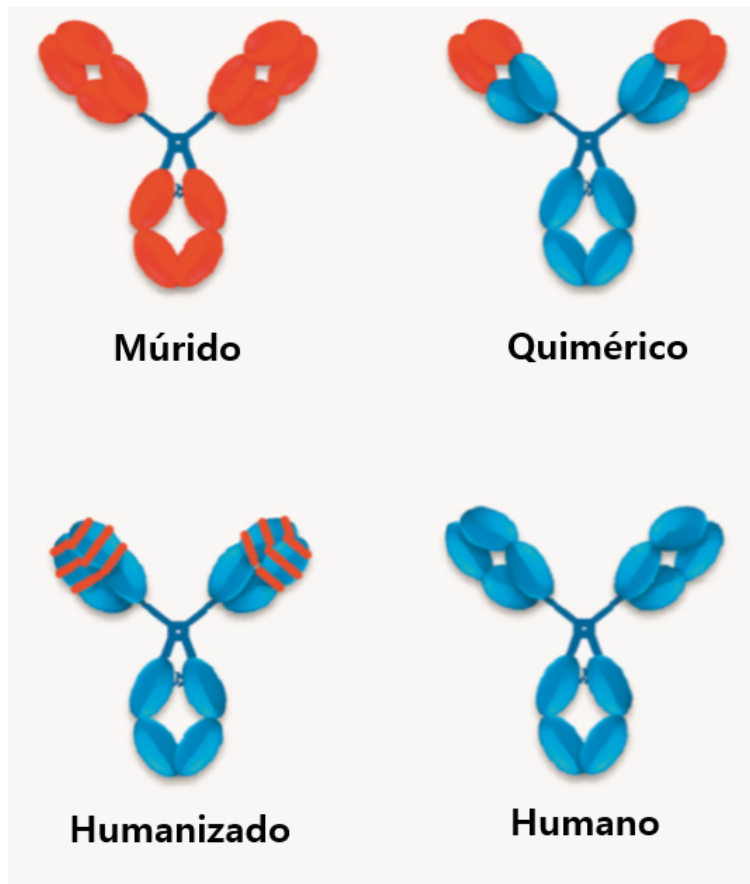
Los MAbs se están volviendo cada vez más importantes en el campo de la oncología, estos MAbs son proteínas modificadas, destinadas a dirigirse a una parte específica de las vías de transducción desregulada de las células cancerígenas. Los MAbs se dirigen específicamente a un solo epítipo, atacando a la célula que reconocen mediante distintas rutas efectoras (Figura 8) como la activación de la vía clásica del complemento, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) o activando rutas de señalización provocando apoptosis (Glennie y col., 2007). Existen diferentes tipos de MAbs, estos pueden ser murinos, quiméricos, humanizados o humanos (Figura 9) dependiendo de la procedencia de la IgG, los primeros MAbs en desarrollarse fueron los murinos sin embargo, muy frecuentemente producían reacciones alérgicas al usarse en seres humanos, además que la vida útil de la IgG de ratón es solamente la mitad que la IgG humana, aunado a esto los MAbs murinos tenían una respuesta efectora pobre, por lo que eran poco eficientes en tratamientos contra el cáncer (Harding y col., 2010).



**Figura 7.** Estructura de una IgG. Donde A) muestra tres regiones globulares forman una estructura en forma de Y, además de dos sitios de unión a antígenos que están en los extremos de los brazos, que se encuentran fijados al tronco de la Y por una región bisagra flexible. B) muestra la región variable y constante de una Ig de manera más simplificada (Murphy K y col, 2017).



**Figura 8.** Esquema de los mecanismos efectores de los Abs. Donde se puede observar la vía clásica del complemento, la ADCC y la señalización celular que provoca apoptosis (Modificado de: Glennie y col., 2007).



**Figura 9.** Clasificación de los MAbs. Donde múrido: 100% ratón, Quimérico: 70% humano + 30% ratón, Humanizado: 95% humano + 5% ratón, humano: 100% ratón (Buss y col., 2012).

En un intento por sobrepasar la respuesta efectora pobre y las reacciones alérgicas al usar MAbs en seres humanos, se desarrollaron los MAbs quiméricos, los cuales poseen solamente las partes hipervariables de los MAbs murinos y la Fc de los Abs humanos, siendo aproximadamente 70% humano y 30% ratón, gracias a esto la vida media de los MAbs aumento al igual que su función efectora y su inmunogenicidad, en la actualidad mediante técnicas recombinantes se han creado MAbs humanizados que son aproximadamente 95% humano y 5% murinos, disminuyendo prácticamente por completo los problemas de reacciones alérgicas contra los MAbs (Presta, 2005; Jones y col., 2006; Buss y col., 2012).

### **1 MAbs en leucemia**

En la actualidad existen algunos MAbs usados en tratamientos contra la leucemia, éstos se unen específicamente a biomarcadores en la membrana plasmática característicos de las células leucémicas como CD19, CD20, CD22 y CD52 (Cuadro 2). Por ejemplo, SAR3419 es un MAb humanizado semi-sintético usado en ALL, SGN-CD19A un MAb conjugado Ab-fármaco, que al unirse a CD19, la célula internaliza el conjugado liberando el fármaco dentro de la célula, lo cual evoca apoptosis, otro anticuerpo que reconoce CD19 es Blinatumomab, un MAb biespecifico contra linfocitos T (Borate y col., 2013; Maude y col., 2015). Epratuzumab es un MAb conjugado contra CD22, usado en el tratamiento pediátrico de ALL, el MAbs más avanzado contra CD22 es inotuzumab ozogamicin, éste está conjugado con calicheamicina, un compuesto citotóxico potente que induce rupturas en el DNA de doble cadena (Sharkey y col., 2012; Thomas, 2012).

CD20 es la principal molécula utilizada para desarrollar MAbs contra leucemias de linaje B, siendo un antígeno con 297 aminoácidos y cuatro dominios transmembrana. Rituximab (RTX) es el MAb más usado contra este antígeno, frecuentemente es administrado en conjunto con quimioterapias para el tratamiento de leucemias de linaje B (Jabbour y col., 2014).



## Cuadro 2. Marcadores y MAb's contra leucemia.

### CD20

Rituximab	Cuando se agrega a la quimioterapia convencional, se ha demostrado mejorar la supervivencia de los pacientes
Ofatumumab	Se une a un epítipo diferente que el rituximab lo que puede permitirle superar la enfermedad resistente a rituximab
Obinutuzumab	Nuevo anticuerpo monoclonal tipo II, codificado por glucoingeniería superior al rituximab y ofatumab en la inducción de la apoptosis directa

### CD19

SAR3419	Conjugado a un maitansinoide sintético que se libera intracelularmente después de la internalización del antígeno
SGN-CD19A	MAbs anti-CD19 humanizado conjugado con el agente perturbador de microtúbulos. En la internalización, se une a tubulina e induce el paro G2/M y la apoptosis
Blinatumomab	MAbs biespecífico que redirige los linfocitos T citotóxicos a células que expresan CD10

### CD22

Epratuzumab	Estudiado como parte de terapia de combinación en adultos y niños con actividad modesta
Epratuzumab-SN38	MAb conjugado a un inhibidor de topoisomerasa I para potenciar el potencial de apoptosis celular
Inotuzumab Ozogamicin	MAb conjugado con la citotóxica caliqueamicina
Moxetumomab	MAb conjugado con una toxina bacteriana

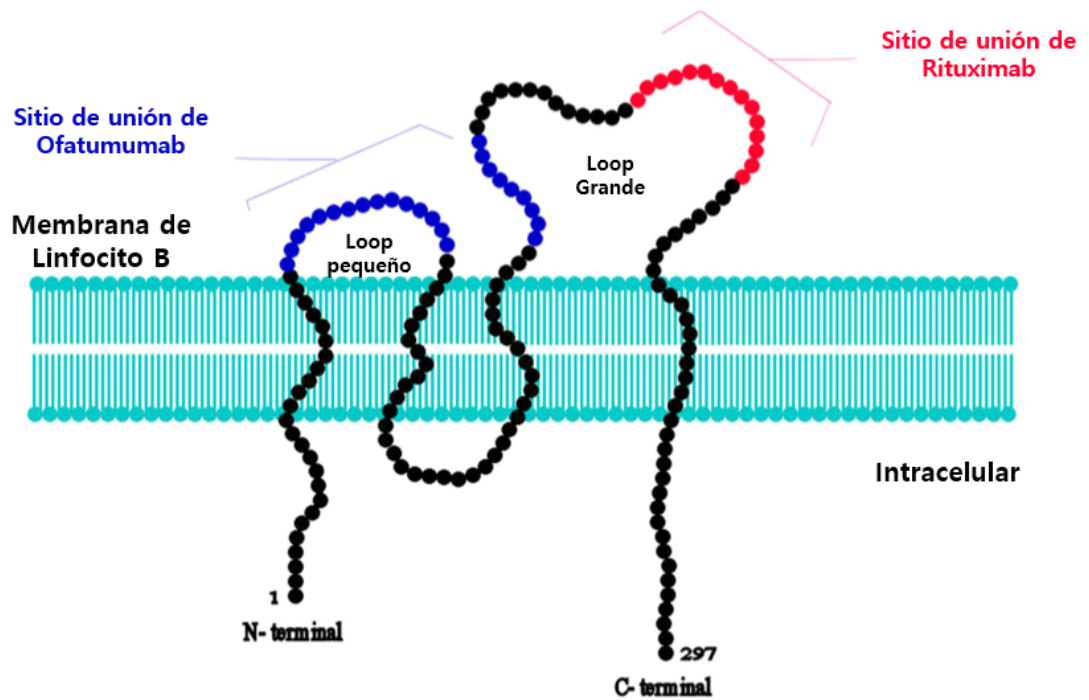
### CD52

Alemtuzumab	MAb que solo ha mostrado actividad pobre en leucemias de células B y T
-------------	--

(Jabbour y col., 2014).

Sin embargo, existen pacientes con resistencia innata a este tratamiento, aunque los mecanismos de resistencia no están totalmente elucidados, se han reportado varios mecanismos que incluyen la inhibición de ADCC por deposición de fragmentos activadores de C3 y resistencia adquirida, también los polimorfismos en el receptor Fc $\gamma$ R11a afecta los mecanismos de la vía clásica del complemento, otra causa reportada de resistencia son polimorfismos en la misma proteína CD20 (Jabbour y col., 2014).

Para incrementar la actividad antitumoral y la afinidad de unión a la Fc del MAb para el receptor Fc $\gamma$ R11a con baja afinidad nuevos MAbs anti-CD20 están siendo desarrollados llamados de segunda generación. Por ejemplo, Ofatumumab el cual se une a dos dominios de CD20 diferentes de a los que se une RTX (Figura 10), siendo una opción cuando se presenta resistencia (Cang y col., 2012). También se han desarrollado MAbs denominados de tercera generación contra CD20, en los cuales podemos mencionar a Ocaratuzumab, que ha sido modificado usando biotecnología para potenciar la actividad de ADCC y la vía clásica del complemento, además de tener una actividad en células con polimorfismos en el receptor Fc $\gamma$ R11a, sin embargo, este MAb sigue en pruebas clínicas. Por estas razones es de importancia seguir desarrollando MAbs los cuales generen una mayor respuesta contra las células cancerígenas y puedan aplicarse a pacientes con resistencia a los MAbs actuales (Cang y col., 2012).



**Figura 10.** Determinantes antigénicos o sitios de unión de Ofatumumab y Rituximab en la molécula de CD20 (Cang y col., 2012).

## **C Inmunización con DNA**

El desarrollo de mAbs potencialmente terapéuticas contra proteínas transmembrana con múltiples loops extracelulares sigue siendo un proceso muy complicado (Masuko y col, 2011). Para producir una reacción inmune contra una proteína exógena específica de manera que evoque una respuesta humoral y se produzcan Abs, generalmente es necesario la purificación de dicha proteína, la cual será utilizada para inmunizar a un animal pequeño, generalmente un roedor. Obtener suficiente proteína purificada, consume una gran cantidad de tiempo y en el caso de las proteínas transmembranales, proteínas estructuralmente complejas o simplemente pobremente inmunogénicas no suelen generar la respuesta humoral deseada (Hutchings y col, 2010; Liu y col, 2018). Específicamente, podemos mencionar a los receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCRs) heterotriméricas u otro tipo de proteínas transmembrana, en este caso el uso de baja concentración de proteína, o el uso de proteínas recombinantes que carecen de modificaciones post-traduccionales como glicosilación, metilación, acilación, fosforilación, o péptidos sintéticos de estas mismas usualmente solo generan Abs que reconocen la forma linear de la proteína o regiones extracelulares que carecen de efecto sobre la función del receptor, por lo tanto, están restringidos como agentes terapéuticos (Chua y col., 2008). En la actualidad se han desarrollado otras estrategias alternativas a la clásica inmunización con antígenos proteicos para la obtención de Abs, como la inmunización con DNA, la cual obvia la producción in vitro de antígenos proteicos, lo cual suele ser un proceso largo y costoso, dependiendo de la naturaleza de la proteína difícil de realizar, en especial para las proteínas con múltiples dominios transmembrana (Hollister y col, 2014; Eden y col, 2017). Además, las vacunas con DNA permiten la flexibilidad del diseño de inmunogenos, en la que se pueden evaluar múltiples isoformas o variaciones de una secuencia, para seleccionar antígenos con inmunogenicidad mejorada, tal proceso también se puede usar para aumentar la diversidad de epitopos o potenciar la respuesta inmune humoral, contra proteínas que tienen una baja inmunogenicidad (Vaine y col., 2010).

#### **IV. JUSTIFICACIÓN**

La leucemia representa cáncer más común en niños y adultos jóvenes, con una tasa de 3 defunciones por cada 100 mil habitantes. Uno de los antígenos diana para el tratamiento de las leucemias es la molécula de superficie CD20, que esta sobre expresada en células leucémicas de linaje B, en las cuales no es internalizada aun con MAbs unidos a ella, lo que facilita que se evocuen los mecanismos efectores de los Abs como ADCC y la activación de la vía clásica del completo, inclusive los MAbs unidos a ellas pueden promover cascadas de señalización para promover la apoptosis, siendo una alternativa a los tratamientos actuales como quimioterapias y radioterapias, que provocan una gran cantidad de efectos secundarios. En el mercado existen diferentes MAbs contra CD20, como por ejemplo Rituximab y Veltuzumab. Sin embargo, la disponibilidad de estos en el sector salud suele ser limitado. Además, la inmunización con proteínas de membrana como CD20 para la producción de MAbs terapéuticos suele ser complicado, principalmente debido a su insolubilidad, estructura compleja y la perdida de sus epitopos nativos. Por esta razón nuestro grupo de trabajo optó por emplear la técnica de inmunización con DNA, la cual tiene la ventaja de ser una técnica simple, rápida, barata que no requiere ningún equipo especializado, permitiendo evocar una respuesta humoral para producción de anticuerpos contra el biomarcador CD20 de células leucémicas de linaje B, asentado de esta manera, las bases para la futura producción de un inmunoterapéutico alternativo a los comercial contra leucemias de dicho linaje.

## **V. HIPÓTESIS**

La inmunización con el DNA codificante del biomarcador CD20 específico de leucemias de linaje B, evocará una respuesta humoral antígeno-específica.

## **VI. OBJETIVOS**

### **A Objetivo General**

Evaluar la respuesta humoral antígeno-específica evocada por la inmunización múrida con DNA codificante del biomarcador CD20 de leucemias de linaje B.

### **B Objetivos Específicos**

1. Construir un DNA recombinante que contenga el gen del biomarcador CD20
2. Evocar la respuesta humoral antígeno-específica contra el biomarcador CD20

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A Materiales

#### 1 Modelo Animal

Se utilizaron ratones Balb/c hembras de 6 a 8 semanas de edad. Los ratones se mantuvieron de acuerdo a las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio aprobado por el comité de ética del bioterio de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de las UAS, aunado a la certificación internacional de la Dra. Carolina del Carmen Murúa López en el uso de animales experimentales y bioética animal, evaluado por las asociaciones latinoamericanas: Asociación Científica Centroamericana y Mexicana sobre Animales de Laboratorio, Comités Institucionales de Bioética Animal (CICUALES) y respaldada por la asociación internacional Charles River. Los ratones se mantuvieron en cajas y se alimentaron *ad libitum* con agua y alimento esterilizado.

### B Metodología

#### 1 Diseño de Oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos para la secuencia del GeneBank NM\_021950, correspondiente a la secuencia de CD20 de ser humano, utilizando los programas bioinformáticos *CLC sequence viewer*, *Genome Compiler*, *Serial Cloner*, *Oligo Analyzer* y *Tm calculator*, se realizó una PCR virtual y el producto fue analizado con BLAST para verificar la identidad de la secuencia, posteriormente se utilizó los programas bioinformáticos *Genome Compiler*, *Serial Cloner* para diseñar el constructo plasmídico insertando el producto de la PCR virtual en el plásmido pcDNA6/V5-HIS A.

#### 2 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

Se extrajeron 2.5mL de sangre periférica de individuos sanos y se colocó en un tubo con heparina, se homogenizo por inversión y se pasó la sangre a un tubo de 15mL, posteriormente se le agrego 2.5mL de solución Salina y se homogenizó por inversión, conjuntamente en otro tubo de 15mL estéril, se colocó 5mL de lymphoprep. A continuación, con una pipeta Pasteur se adicionó la mezcla de sangre con solución salina muy cuidadosamente de manera que se evite la homogenización con el lymphoprep. Una vez realizado este paso se procedió a centrifugar la muestra por 30min a 1, 500rpm. Con una pipeta Pasteur



se recuperó el anillo de mononucleares de la muestra y se colocó en un tubo de 15ml estéril, inmediatamente se le agregó 5mL de solución salina fría y se centrifugó a 3, 000rpm, después se decantó y se homogenizo el *pellet* con 5mL de agua inyectable fría y deajo incubando en hielo por 45seg. Una vez transcurrido este tiempo, se agregó 5mL de solución salina fría y se centrifugo a 3, 000rpm por 5min. Por último, se decantó totalmente el sobrenadante y se agregó 1mL de trizol para proseguir con una extracción de RNA.

### **3 Extracción de RNA con TRIZOL**

Una vez resuspendida la muestra de lymphoprep en 1mL de TRIZOL se agregó 220µL de cloroformo frío y se vortexeó hasta que la muestra fue homogénea por completo. Una vez homogénea, se dejó incubando en hielo por 5min. Transcurrido el tiempo se centrifugo a 14, 000rpm por 10min a 4°C, inmediatamente y con mucho cuidado se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un tubo de 1.5mL nuevo. Se agregó 700µL de isopropanol frío, se homogenizó por inversión y se incubo en hielo por 15min. Después se centrifugó a 14, 000rpm por 15min a 4°C, se decantó el isopropanol, se agregó 1ml de etanol al 80% frío y se homogenizó por inversión. Inmediatamente se centrifugó a 6, 000rpm por 5min a 4°C, se decantó la mayor cantidad de etanol posible sin perturbar el *pellet*, se colocó con mucho cuidado una gasa estéril sobre el tubo abierto y se dejó secando por 5min a temperatura ambiente. Posteriormente resuspendió el *pellet* en 22µL agua inyectable, a continuación, se procedió a realizar una re-extracción, agregándole 100µL de TRIZOL al RNA, se transfirió a un tubo de 0.2mL y se dejó incubando en hielo por 5min. Después se agregó 30µL de cloroformo frío, se vortexeó por 10seg para dejarlo incubar en hielo por 3min. A continuación, se centrifugo a 13, 000rpm por 10min a 4°C, después se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un tubo de 1.5mL. Una vez recuperada completamente la fase acuosa se le agregaron 100µL de isopropanol frío, se homogenizó suavemente por inversión e inmediatamente se dejó incubando en hielo por 15min, transcurrido este lapso de tiempo se centrifugó a 13, 000rpm por 15min. Posteriormente se decantó el sobrenadante y se agregó 500µL de etanol frío al 80%, se homogenizó por inversión y se centrifugó a 6, 000rpm por 5min a 4°C. Después se retiró completamente el etanol y se dejó secar el *pellet* a temperatura

ambiente por 5min, finalmente se resuspendió el *pellet* en 20 $\mu$ L de agua inyectable.

#### **4 RT-PCR**

Se cuantificó el RNA por nanodrop, a continuación, se hizo un mix de agregando 2 $\mu$ g de RNA, 0.5 $\mu$ L de oligo dT y se aforo a 10 $\mu$ L con agua inyectable, inmediatamente se incubo el mix a 70°C por 10min y se realizó un choque térmico con hielo por 2min. Simultáneamente, se realizó otro mix con 0.5 $\mu$ L de retrotranscriptasa, 1 $\mu$ L dNTPs, 1 $\mu$ L DTT, 0.5 $\mu$ L de inhibidores de RNasas, 4 $\mu$ L de Buffer de reacción 5x y se aforo a 10 $\mu$ L con agua inyectable. Transcurrido el tiempo de incubación del mix con RNA, inmediatamente se le agregó el mix con la retrotranscriptasa. Posteriormente en termociclador se realizaron un único ciclo con una incubación de 42°C por 10min, 55°C por 1h, 70°C por 10min. Se almacenó el cDNA a -20°C, finalmente el cDNA fue usado como templado para realizar una PCR con los oligos anteriormente descritos.

#### **5 Purificación de DNA plasmídico**

La extracción plasmídica se realizó mediante el Kit de mini-prep de Macherey-Nagel, No. De catálogo 740588.5. Primero se incubó *E. coli* TOP10 durante 6h a 37°C en medio SOB adicionado con ampicilina. Cuando el cultivo llegó a fase logarítmica se tomó 5mL y se transfirió a un tubo de 15mL Y se centrifugó a 14, 000rpm por 1min, se decantó el sobrenadante, se resuspendió la patilla en 1mL de PBS estéril y se transfirió a un tubo de 1.5 mL, posteriormente se centrifugó a 14, 000rpm por 1min, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 250 $\mu$ L de buffer A1 y se vortexeó por 1min, hasta que el *pellet* quedo totalmente disuelto. Una vez conseguido esto se agregó 250 $\mu$ L de buffer A2, se homogenizó por inversión y se dejó incubando a temperatura ambiente por 5min, posteriormente se agregaron 300 $\mu$ L de buffer A3 y se homogenizó por inversión, se dejó incubando 1min a temperatura ambiente y se centrifugó a 14, 000rpm por 5min y se recolecto el sobrenadante. Se ensambló la columna en un tubo de 2mL, una vez ensamblada, se cargaron 750 $\mu$ L del sobrenadante en la columna, se centrifugó a 14, 000rpm por 1 min y se descartó el eluido. Simultáneamente se precalentó el buffer AW a 50°C, posteriormente se agregaron 500 $\mu$ L a la columna y se centrifugó 14, 000rpm por 1 min. Se descartó el eluido, se agregaron 600 $\mu$ L de buffer A4 y se centrifugó a 14, 000rpm

por 1min, una vez hecho esto, se volvió a centrifugar la columna a 14, 000rpm por 2 min para descartar residuos. Por último, se ensambló la columna en un tubo nuevo de 1.5mL, se agregaron 50µL de buffer AE, se incubó por 1min a temperatura ambiente y se centrifugó a 14, 000rpm por 1min, el eluido corresponde al DNA plasmídico.

## **6 Obtención de la construcción plasmídica**

Primero se amplificó el gen *CD20* mediante PCR utilizando el Master mix de Jena bioscience No. De catálogo PCR-166s y los oligonucleótidos MAHV CD20 Fw y MAHV CD20 Rv. Después de obtener el producto de PCR se purifico del gel y se procedió a la digestión simultanea tanto del producto del PCR como del plásmido pCDNA6 extraído con anterioridad, con las enzimas de restricción BamHI y XbaI, a 37°C durante 1h y se desactivo la enzima por calor a 70 °C por 20min, una vez digerido el producto en ambos extremos se procedió a la ligación con la ligasa T4 de Jena bioscience No. De catálogo EN-149s.

## **7 Producción de células competentes**

Se cultivaron *E. coli* TOP10 *Wild type* en medio SOB sin ampicilina, una vez el cultivo llega a fase logarítmica, se transfirió a un tubo de 15mL y se incubó en hielo por 10 min, posteriormente se centrifuga a 4, 000rpm por 10min y se decanta el sobrenadante, se resuspendió el *pellet* en 250µL de solución MgCl<sub>2</sub>-CaCl<sub>2</sub> (80mM-20mM), una vez resuspendida, se aforó el tubo con 10mL de la misma solución, se homogenizó por inversión y se centrifugó a 4, 000rpm por 10min y decantó el sobrenadante. Posteriormente se resuspendió el *pellet* en 250µL de CaCl<sub>2</sub> (0.1M) fría, se transfirió a un tubo de 1.5mL y se aforó a 800 µL con CaCl<sub>2</sub> para dejar incubando en hielo por 1h, por ultimo homogenizó y alicuotearon 200µL en 4 tubos de 1.5mL.

## **8 Transformación de *E. coli* Top10**

Se agregó 10µL de la construcción plasmídica a las alícuotas de *E. coli* TOP10 competentes y se incubaron en hielo por 30min. Posteriormente se incubó a 42°C por 1:30 min, e inmediatamente se transfirió a hielo por 2min, para realizar el choque térmico. Después se le agregaron 700µL de medio SOB con 100 µg/mLampicilina a las células y se dejaron incubando a 37°C por 45min. Transcurrido este tiempo se plaquearon 50µL en placas Petri con agar TSA con 100µg/mL de ampicilina y se incubó a 37°C por 24h. Se seleccionaron colonias

uniformes y se estriaron en una caja master, por último, se realizó una *colony* PCR para verificar la presencia de la construcción en las colonias seleccionadas.

## **9 Inmunización de Ratones**

Los ratones Balb/c hembras fueron inmunizados con DNA vía subcutánea con un intervalo de 15 días, cada inmunización se realizó con 100µg de PCD20 en PBS estéril. Después de 10 días de la última inmunización los ratones fueron sangrados para obtener, el suero inmune.

## **10 ELISA**

Para evaluar la respuesta humoral se realizó un ELISA. Se extrajeron proteínas a partir de células mononucleares de sangre periférica, se sensibilizó la placa con 100µL de proteínas diluidas en buffer de carbonatos y se dejó incubando la placa a 37°C por 1h. Transcurrido este lapso de tiempo, se realizó 3 lavados con PBS-Tween20 (0.1% v/v), se añadieron 300µL de solución de bloqueo a cada pocillo sensibilizado y se incubaron por a 37°C por 1h. Posteriormente se lavó la placa 3 veces con PBS-Tween20 (0.1% v/v), se añadieron 100µL de anticuerpo primario, donde se usó como control positivo un anticuerpo comercial de ratón IgG2b α-CD20 de ser humano que reconoce la secuencia YNCEPANPSEKNSPST del loop grande extracelular de la molécula CD20, como control negativo se usó el suero de los ratones inmunizados con PBS y el plásmido pCDNA6, también se evaluaron los sueros de los ratones inmunizados con la construcción PCD20, todos los sueros fueron incubados a 37°C por 1h. Concluida la incubación se realizaron 3 lavados con PBS-Tween20 (0.1% v/v) y añadió a la placa con 100µL de anticuerpo secundario, dejándola en incubación nuevamente por 1h a 37°C. Posteriormente se realizó el último lavado con PBS-Tween20 (0.1% v/v) y se procedió a revelar la placa con 100µL de solución cromógena por pocillo, dejándola en incubación a temperatura ambiente por 10min, protegiendo la placa de la luz. Para finalizar se detuvo la reacción agregando 50µL de solución de "STOP" con ácido sulfúrico a cada pocillo y se realizó una lectura en espectrofotómetro, a midiendo absorbancia a una longitud de onda de 450 nm.

## **11 Western blot**

Se realizó una electroforesis en gel de acrilamida al 12%, corriendo el extracto crudo células mononucleares de sangre periférica. Posteriormente

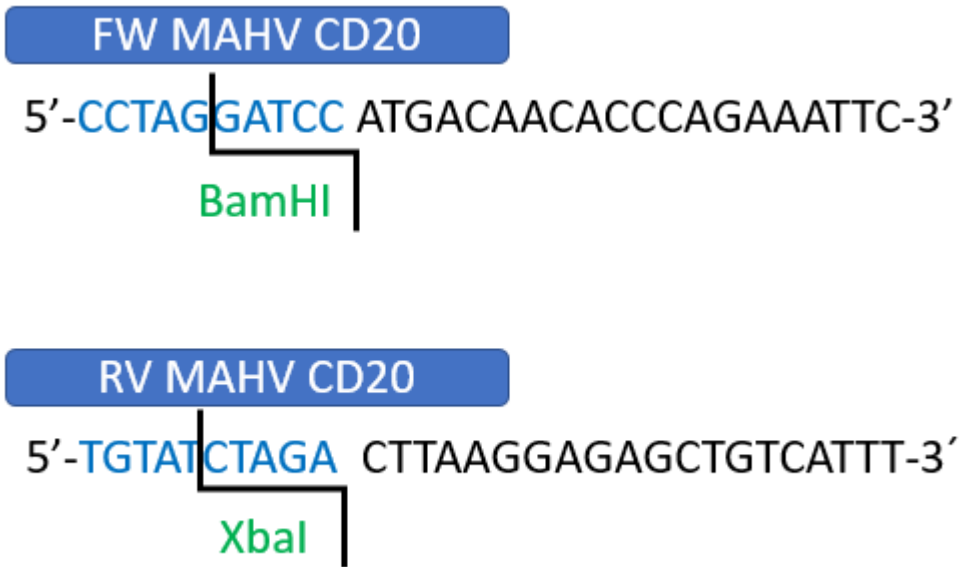
mediante la técnica de electrotransferencia se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, utilizando un voltaje de 100V durante una hora, posteriormente la membrana fue incubada con solución de bloqueo en agitación por una hora a temperatura ambiente. Una vez concluido este periodo de tiempo se realizaron dos lavados con PBS-Tween20 (0.1% v/v) durante 10min cada uno y se puso a incubar la membrana con el anticuerpo primario por una hora a temperatura ambiente en agitación. Terminada la incubación se volvió a lavar la membrana con PBS-Tween20 (0.1% v/v) y se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo secundario, durante 1h a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS-Tween20 (0.1% v/v), por último, se reveló la membrana usando una solución reveladora con diamino bencidina (DAB) y peróxido de hidrógeno, siguiendo protocolos estándar.

## VIII. RESULTADOS

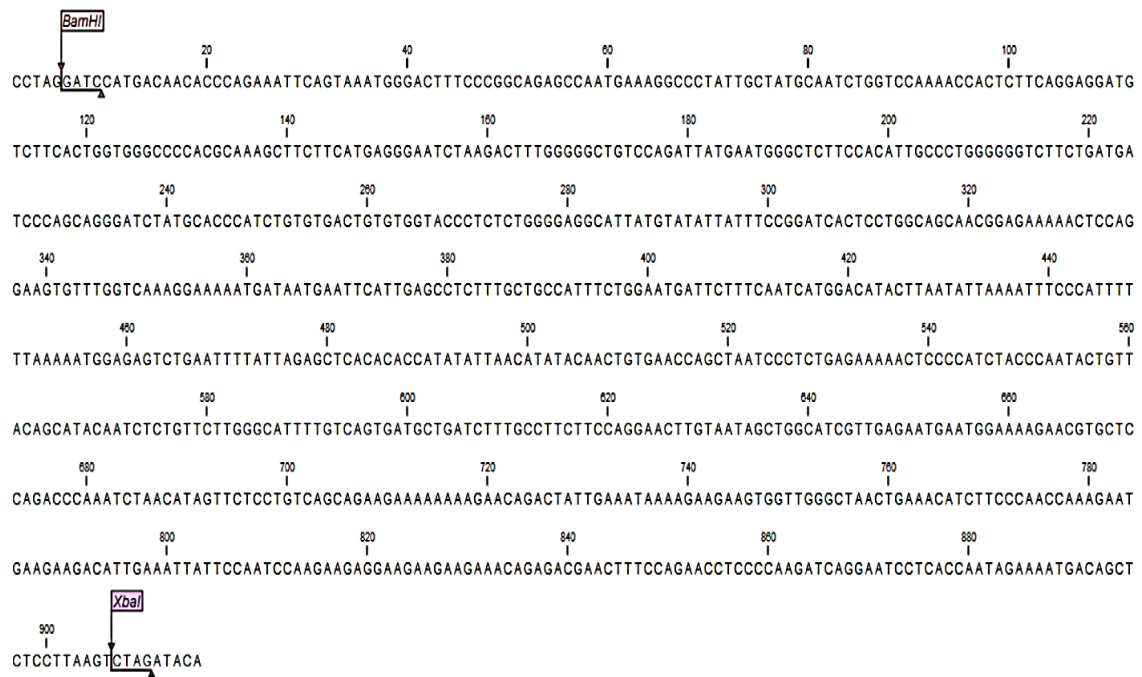
### A Construcción de DNA recombinante que contenedor del gen del biomarcador CD20

#### 1 Diseño de oligonucleótidos

Con base en la secuencia del GeneBank NM\_021950, utilizada por Khademi y col., 2017 la cual corresponde al marco de lectura abierto del gen que codifica para la proteína de membrana CD20, se diseñaron los oligonucleótidos MAHV CD20 Fw y MAHV CD20 Rv (Figura 11) los cuales tienen mutagénesis dirigida agregándoles los sitios de corte el de las enzimas de restricción BamHI y XbaI respectivamente. Se realizó una PCR Virtual utilizando como templado la secuencia del GeneBank NM\_021950 en el programa *Serial Cloner* (Figura 12). Además, utilizando el mismo programa se realizó una ligación virtual entre el producto del PCR virtual y la secuencia del plásmido pcDNA6/V5-HIS A, obteniendo una construcción a la cual se le denominó PC20 (Figura 13).

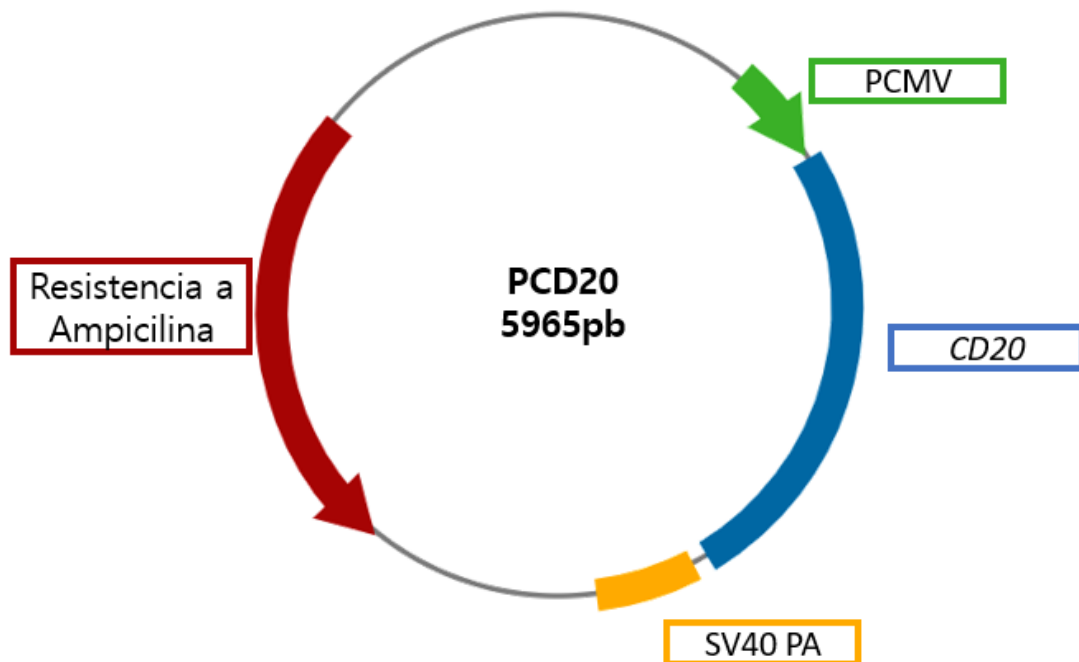


**Figura 11.** Diseño de oligos para la secuencia del GeneBank NM\_021950. Secuencia de los oligos MAHV CD20 Fw y MAHV CD20 Rv los cuales tiene la mutagénesis dirigida agregándoles los sitios de corte el de BamHI y XbaI respectivamente



**Figura 12.** Amplicon obtenido en el análisis *in silico* correspondiente al gen *CD20*. El producto contiene sitios de restricción para las enzimas BamHI en el extremo 5' y XbaI en el 3', sitios de restricción los cuales nos permitieron su ligación al plásmido pcDNA6/V5-HIS A.

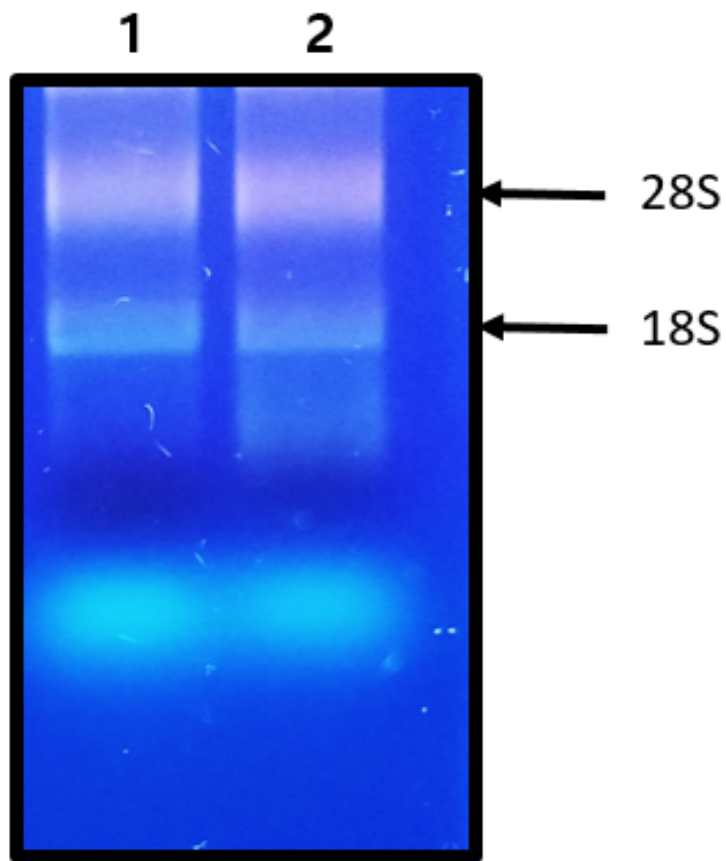




**Figura 13.** Construcción PCD20. En la imagen se puede observar el constructo PCD20 (pcDNA6/V5-HIS A-CD20) con un tamaño de 5,965pb. La región resaltada en azul claro corresponde a la secuencia codificante para la proteína transmembrana CD20 y en verde claro podemos observar la secuencia de resistencia a ampicilina.

## **2 Extracción de RNA**

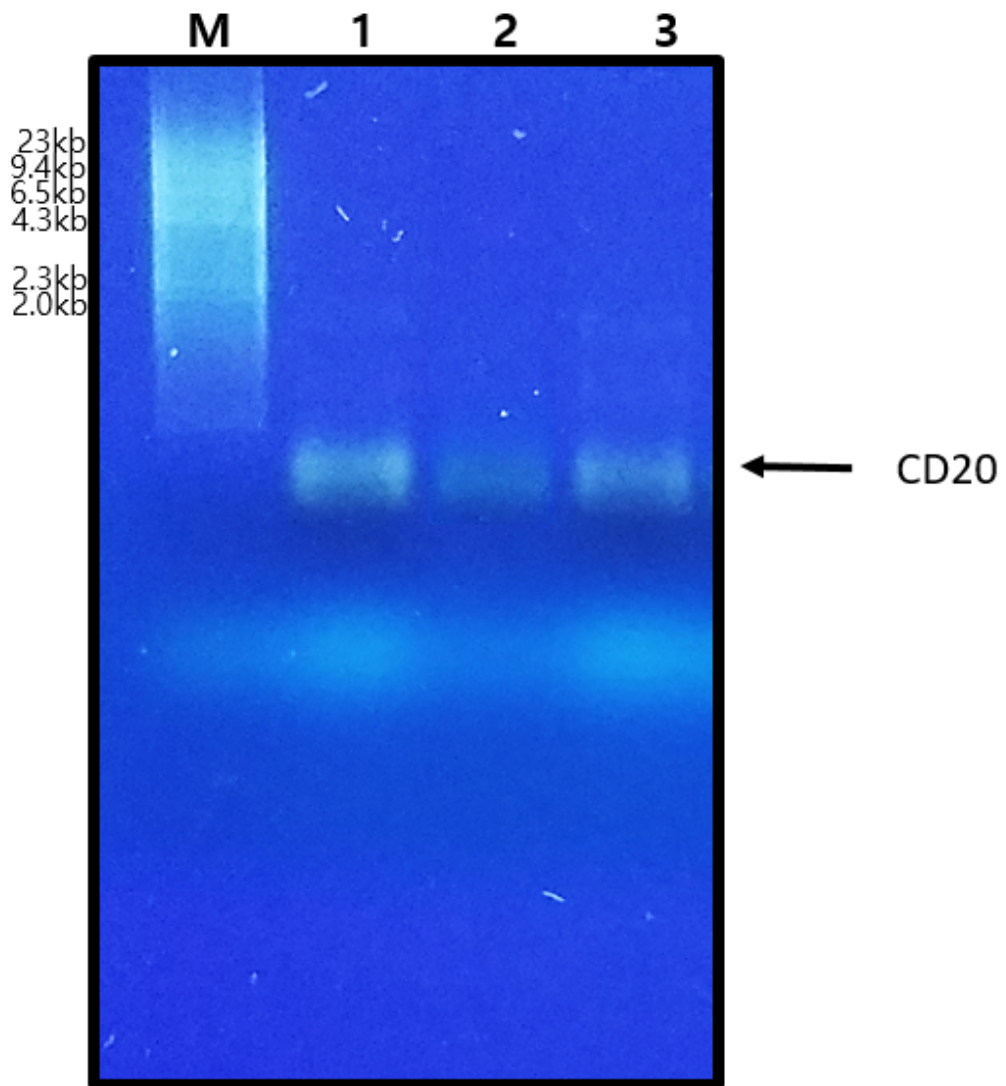
Empleando la biomasa obtenida a partir de células mononucleares aisladas de 2.5mL de sangre periférica de individuos saludables se realizó la extracción de RNA total, se cargaron 500ng y se realizó una electroforesis en gel de 1.5% de agarosa (Figura 14), donde se pueden observar las dos bandas caracterizadas del 28s y 18s de una extracción de RNA total. Podemos comparar este resultado con Samadani y col, 2015, quienes compararon la extracción de RNA con TRIZOL en diferentes tejidos de pacientes con cáncer, utilizando tanto tejidos congelados, como frescos, además de sangre periférica. De igual manera que nuestro equipo de trabajo se obtuvieron las dos bandas características 18s y 28s del RNA total de células eucariotas.



**Figura 14.** RNA total de sangre periférica. En los carriles 1 y 2 se puede observar la extracción de RNA total de sangre periférica de pacientes sanos. En cada carril se cargó aproximadamente 500ng de RNA total, en ambos podemos observar dos bandas integra correspondientes a los fragmentos 28s y 18s del RNA total.

### 3 RT-PCR

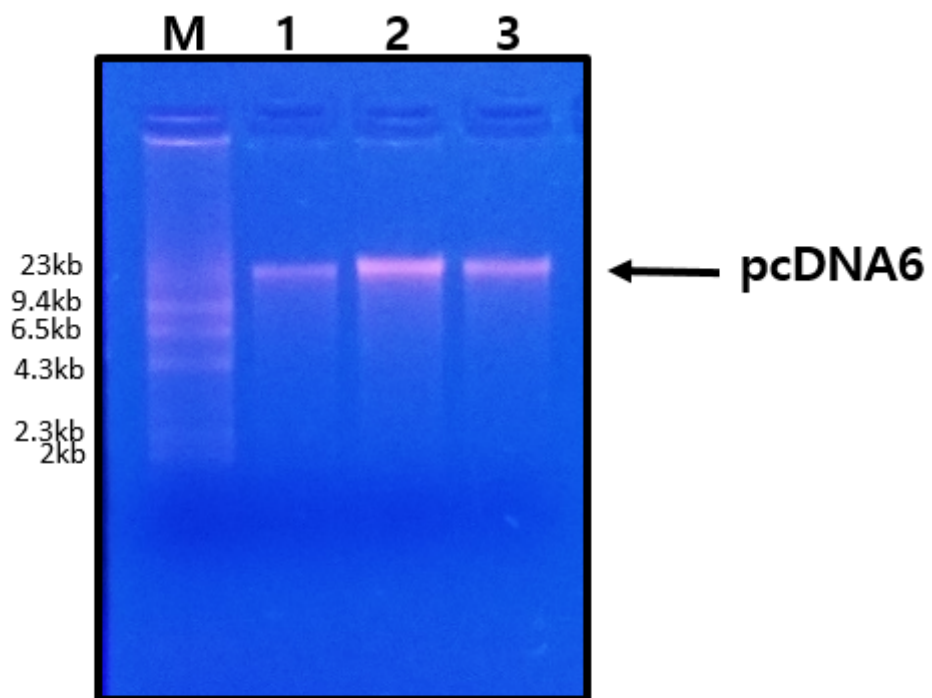
Para amplificar el gen *CD20* se empleó como templado el cDNA, obtenido de la retrotranscripción del ARN total extraído de sangre periférica, utilizando los oligos MAHV CD20 Fw y MAHV CD20 Rv y el Master mix para llevar a cabo la reacción de PCR, para estandarizar esta reacción se realizó un gradiente de temperatura, con la cual se pudo obtener un amplicón de aproximadamente 1kb, este coincide con el obtenido por Khademi y col., 2017 los cuales mandaron a sintetizar la secuencia del GenBank con No. De acceso NM\_021950, correspondiente al gen *CD20* de ser humano. Dicho amplicón fue observado en una electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v teñido con Sybr Gold (Figura 15).



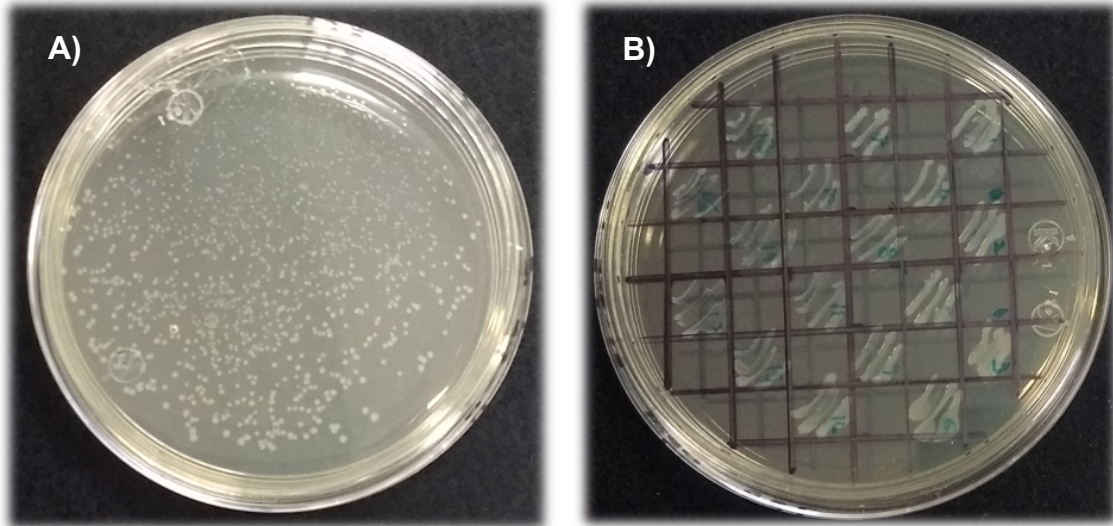
**Figura 15.** Amplificación del gen *CD20*. Electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v teñido con sybr Gold. Donde se puede observar en los carriles M) marcador de peso molecular Phage lambda/HindIII, 1-3) donde se observan los amplicones de la PCR de un peso aproximado de una 1kb.

#### 4 Construcción plasmídica PCD20

Para la construcción plasmídica se decidió usar el plásmido pCDNA6 como base para insertar el gen *CD20* de ser humano. Este es un plásmido de expresión el cual contiene un promotor de CMV (cytomegalovirus), el cual permite la expresión de proteínas en diferentes células de mamíferos como, células epiteliales, endoteliales, fibroblastos, células del tejido conectivo, macrófagos, células dendríticas, células de musculo liso y linfocitos. Según lo reportado por Garmory y col., en el 2003 quien hizo una comparación ente diferentes promotores reportados para el diseño de vacunas de DNA, concluyo que CMV en promedio en la mayoría de los tejidos tiene la mejor actividad transcripcional, comparándolo con promotores como SV40M RSV, SV2, además la vacunación usando este promotor permite la obtención de altos niveles de Abs a diferencia de los otros. Además, Xu y col., en el 2017 utilizaron un plásmido con este promotor para expresar el gen humano *CD21* transfectando la línea celular DG75. Debido a su gran versatilidad un plásmido con este promotor podría ser utilizado para diseñar vacunas de DNA las cuales puedan ser administradas por varias vías. El plásmido pCDNA6 fue purificado (figura16) mediante la técnica de mini-prep, obteniendo una banda pura y consistente con el peso del mismo. Posteriormente se procedió a digerir el plásmido con las enzimas de restricción BamHI y XbaI siguiendo el protocolo establecido por el fabricante, a su vez el amplicon del gen *CD20* fue purificado y posteriormente digerido con las mismas enzimas de restricción, posteriormente ambos fueron ligados usando una proporción 1:1 (plásmido: amplicon), utilizando la ligasa T4. Una vez obtenido el constructo se procedió a transformar *E. coli* top 10, siguiendo el protocolo de choque térmico utilizado por Rahimzadeh y col., en el 2016, quienes compararon los efectos del CaCl<sub>2</sub> y el choque térmico para la transformación de diferentes cepas de *E. coli*. Posteriormente se seleccionaron colonias de *E. coli* transformadas usando un medio con ampicilina (Figura 17) para eliminar las bacterias sin transformar.



**Figura 16.** Purificación del plásmido pCDNA6. Donde M) Marcador phage lambda/HindIII, 1-3) mini-prep de *E. coli* mach1 transformadas con pCDNA6.

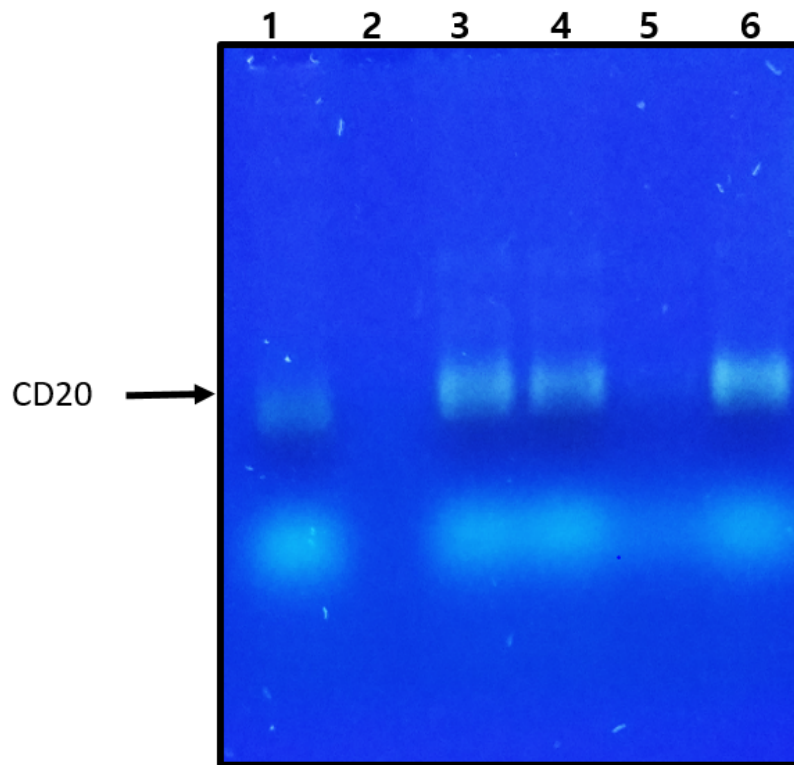


**Figura 17.** Selección de colonias transformadas. *E. coli* top10 transformadas plaqueadas en agar TSA con 100µg/mL de ampicilina. Donde A) se plaquearon 50µL *E. coli* top 10 transformadas en medio líquido y B) se seleccionaron 17 colonias y fueron plaqueadas en una caja master.



## 5 Colony PCR

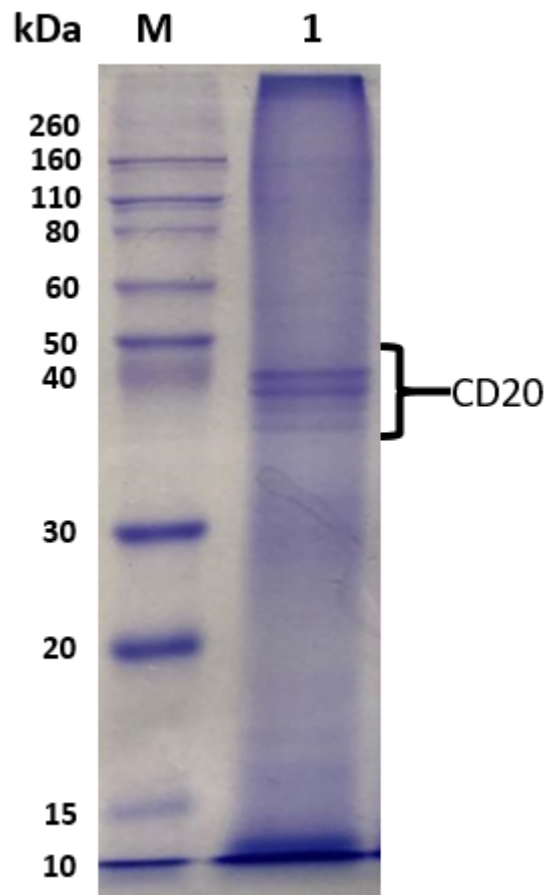
Posteriormente para evidenciar la presencia de nuestro gen de interés en las colonias transformadas se utilizó una *colony* PCR, siguiendo el protocolo propuesto Woodman y col., en 2008, el cual nos permitió realizar una PCR directamente usando las colonias seleccionadas en las cajas Petri. En este caso decidimos seleccionar 6 colonias de manera aleatoria, realizando la PCR de las colonias 2, 5, 7, 8, 14, 16. En donde como las colonias 2, 7, 8, 16 dieron positivo (Figura 18) para la amplificación del gen *CD20* humano, este resultado es similar a lo reportada por Anbouhi y col, en 2012 quienes también realizaron una *colony* PCR de colonias transformadas con parte del gen *CD20*, usando solamente la parte que codifica para la región del loop extracelular grande de la proteína, a diferencia de nuestro equipo de trabajo que decidió usar el gen de la proteína completa.



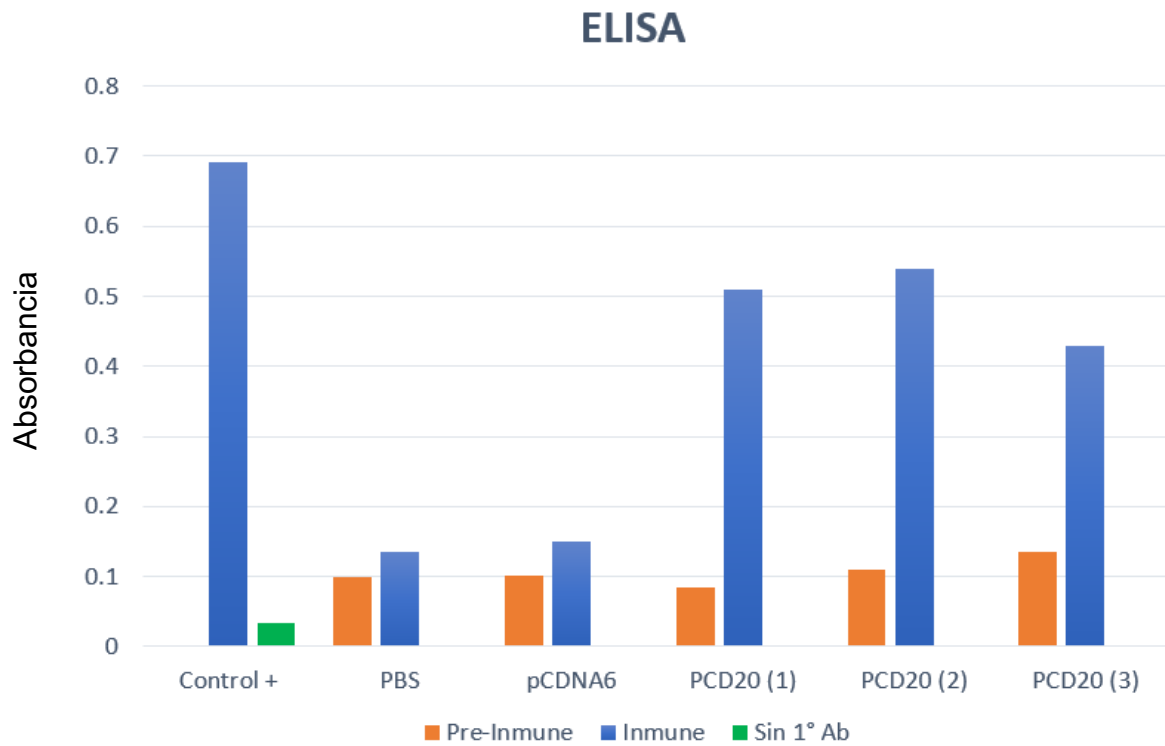
**Figura 18.** Evaluación de las colonias transformadas mediante *colony* PCR. Se seleccionaron seis colonias a las cuales se les realizó una *colony* PCR para verificar la presencia del gen *CD20* en ellas. Donde se obtuvieron 4 colonias positivas en los carriles 1, 3, 4, 6 para la presencia del gen.

## **B Evaluación de la respuesta humoral antígeno-específica**

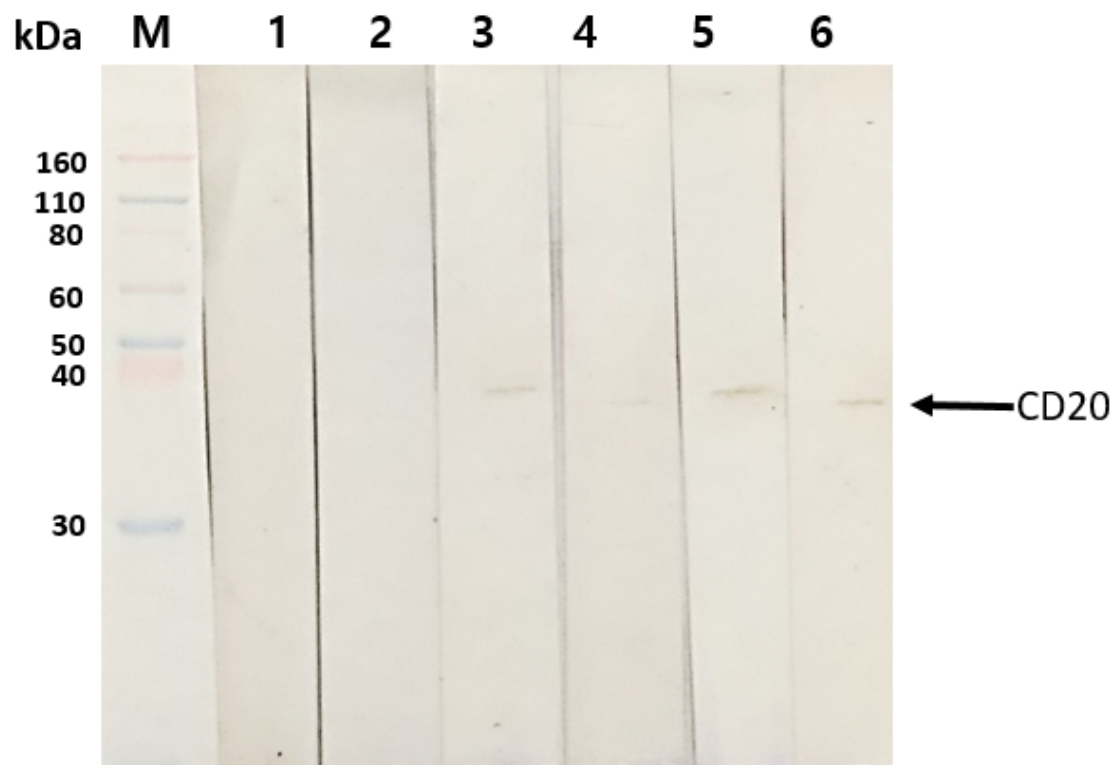
Se inmunizó vía subcutánea la construcción PC20 a ratones BALB/c hembras, según el protocolo descrito por Khademi y col., 2017, quienes inmunizaron ratones usando una construcción que tenía un gen *CD20* humano sintético, difiriendo de nuestro equipo de trabajo, el cual decidió obtener el gen de sangre periférica humana y clonarlo usando PCR. Una vez concluido el ciclo de inmunizaciones se decidió evaluar la respuesta antígeno-específica contra el biomarcador CD20 humano mediante la técnica de ELISA. En este caso se decidió usar como antígeno extracto crudo de células mononucleadas aisladas por lymphoprep, donde se pudo observar varias bandas bien marcadas cerca de los 40kDa, las cuales podrían tratarse de CD20 ya que esta tiene un peso aproximada de 33-37kDa (Figura 19), para evaluar el suero obtenido de los ratones inmunizados con la construcción PCD20 ya que de estas mismas nuestro equipo de trabajo clonó el gen *CD20* de ser humano. Además, se decidió usar un mAb  $\alpha$ -CD20 como control positivo y suero de ratones inmunizados con PBS y pCDNA6 como control negativo. Obteniendo como resultado una clara diferencia entre los sueros pre-inmunes e inmunes de los ratones inmunizados con la construcción PCD20 (Figura 20), sugiriendo de esta manera que se dio una correcta transfección y expresión del biomarcador CD20 humano en las células de los ratones inmunizados generando así una respuesta humoral antígeno-específica contra dicho biomarcador. Además, también se optó por realizar un Western blot (Figura 21) donde se pudieron observar una banda única, la es correspondiente al peso de la proteína CD20, este resultado es semejante a lo reportado por Agez y col., en 2019 quienes caracterizaron bioquímica y biofísicamente CD20, obteniendo bandas con un peso similar en la purificación de CD20 a partir de la línea celular RAMOS.



**Figura 19.** Perfil proteico de extracto crudo de células mono nucleares de sangre periférica. Se realizó una electroforesis en un gel de acrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie. Donde M) marcador de peso molecular y 1) extracto crudo de lymphoprep.



**Figura 20.** Respuesta de sueros de ratones contra CD20 medida por ELISA. Donde como control + se usó un Ab comercial  $\alpha$ -CD20 y PCD20(1), PCD20(2), PCD20(3) se usó suero de ratones inmunizados.



**Figura 21.** Inmunodetección del biomarcador CD20. Donde M: Marcador de peso molecular, en los demás carriles se usó como anticuerpo primario distintos sueros inmunes, en los carriles 1: PBS, 2: pCDNA6, 3: MAb comercial  $\alpha$ -CD20, 4-6: PCD20(1), PCD20 (2), PCD20(3).

## IX. DISCUSIÓN

La leucemia es el cáncer más común en niños y adultos jóvenes, representando más del 25% de los tipos de cáncer diagnosticados en esta población (Smith y col., 2014; Howlader y col., 2019). Durante las últimas décadas diferentes terapias multimodales, aunadas a atención y cuidados especializados, han mejorado las tasas de supervivencia y el número de sobrevivientes de leucemia infantil (Jemal y col., 2010; Felicia y col., 2014). Sin embargo, los tratamientos más utilizados como quimioterapias, radioterapias pueden provocar distintos efectos adversos (Bhatt y col., 2018 a, b).

En la actualidad existen tratamientos como los mAbs, los cuales pueden reconocer biomarcadores específicos de células cancerígenas atacándolos por distintas vías efectoras de los anticuerpos por lo que pueden ser de gran ayuda para el tratamiento de distintos tipos de cáncer como la leucemia (Glennie y col., 2007). La proteína transmembrana CD20 es la principal molécula empleada como diana para desarrollar mAbs contra leucemias de linaje B, sin embargo, la producción de mAbs  $\alpha$ -CD20 es un gran desafío por su insolubilidad y además de la dificultad de generar un CD20 soluble que mantenga sus epítomos nativos, aunque la producción de mAbs contra proteínas multi-transmembrana como CD20 es posible utilizando enfoques de inmunización clásicos empleando lisados de membrana o péptidos lineales, estos no siempre tienen éxito en la generación de Abs que tienen capacidad de reconocer los epítomos de la proteína transmembrana diana (Robak y col., 2009; Klein y col., 2013; Jabbour y col., 2014; Hazen y col., 2014). Sin embargo, en la literatura se demostró que es posible producir una respuesta inmune contra los epítomo nativos de las proteínas transmembrana utilizando la inmunización con DNA. Por ejemplo, Allard y col., en 2011 generaron Abs policlonales contra la conformación nativa del receptor B de la endotelina humana empleando inmunización con DNA, Martin-Folgar y col., en 2014 pudieron desarrollar y caracterizar mAbs contra las proteínas de la capsida del virus de la fiebre del valle del Rift utilizando inmunización con DNA y Khademi y col., en 2017 pudo generar y caracterizar mAbs contra CD20 utilizando un gen sintético de *CD20*.

Con base en esto, nuestro grupo de trabajo desarrollo una estrategia de inmunización con DNA plasmídico, que asentara las bases para la creación de

un mAbs  $\alpha$ -CD20 alterativo a los comerciales, para llevar esto a cabo se clonó el gen *CD20*, a partir del DNA genómico de células RAJI, para ello se crearon oligos específicos usando como base la secuencia del GenBank NM\_021950 que utilizaron Khademi y col., en 2017 para diseñar un gen sintético *CD20* de un peso aproximado de 1Kb. A los oligos diseñados por nuestro grupo de trabajo se agregó los sitios de corte de las enzimas de restricción BamHI y XbaI, para de esta manera ligarlo con el plásmido pcDNA6/V5-HIS A y formar un constructo que contenga el gen que codifica por la proteína de CD20. Para llevar a cabo la ligación entre nuestro amplicón de PCR y el plásmido ligación se empleó el protocolo usado por Rahimzadeh y col., en el 2016, el cual con uso una relación de volumen 1:1 amplicón-plásmido para obtener una ligación óptima. Por último, se llevó a cabo la transformación por choque térmico *E. coli* TOP10 con el constructo PC20, seleccionando las bacterias transformadas en TSA con ampicilina, las colonias crecidas en este medio indicando la resistencia contra ampicilina que le confirió el plásmido PCD20. Además, se mediante la técnica de *colony* PCR se verificó la presencia del gen *CD20* humano en las colonias seleccionadas, donde se pudo observar una banda con peso correspondiente a nuestro amplicon, resultado similar a reportado por Anbouhi y col., en 2012 quienes realizaron una *colony* PCR de *E. coli* transformadas con un fragmento del gen *CD20*. Posteriormente se realizó la extracción de DNA plasmídico y siguiendo el protocolo descrito por khademi y col., en 2017 se inmunizaron ratones BALB/c hembras vía subcutánea. Se evaluó la respuesta humoral evocada, por la inmunización con DNA, mediante la técnica de ELISA, donde se pudo observar una diferencia marcada entre los sueros pre-inmunes e inmune de los ratones, dando un resultado semejante a Petkov y col., 2018 quienes evaluar la respuesta inducida por diferentes zonas de inmunización con DNA, en donde el resultado obtenido en la inmunización subcutánea es consistente al observado por nuestro grupo de trabajo. Además, se realizó un Western blot donde se pudo observar una banda única con un peso aproximadamente de 37KDa, el cual es correspondiente con el peso de del biomarcador CD20, resultado constante con lo reportado por Agez y col., en 2019, quienes caracterizaron bioquímica y biofísicamente la molécula de CD20 de ser humano, obteniendo un peso similar. Esta evidencia sugiere que la inmunización con DNA utilizando la construcción PCD20 evocó una respuesta humoral antígeno-



específica contra el biomarcador CD20 de ser humano, estableciendo las bases para la producción de un hibridoma productor de anticuerpos  $\alpha$ -CD20, abriendo la posibilidad para el desarrollo de un nuevo inmunoterapéutico alternativo a los comerciales.

## **X. CONCLUSIÓN**

1. La inmunización con el DNA codificante del biomarcador CD20 de ser humano, evocó una respuesta humoral antígeno-específica contra su proteína homóloga. Estableciendo las bases biotecnológicas para la producción de un inmunoterapéutico  $\alpha$ -CD20 específico contra leucemias de linaje B

## **XI. PERSPECTIVAS**

1. Utilizar los esplenocitos de los ratones que posean una respuesta humoral  $\alpha$ -CD20 para la producción de hibridomas.
2. Aislar los hibridomas mediante la técnica de clonación por dilución limitante para producir MAbs  $\alpha$ -CD20.
3. Humanizar los MAbs  $\alpha$ -CD20.

## XII. BIBLIOGRAFÍA

- Agez M, Mandon ED, Iwema T, Gianotti R, Limani F, Herter S, Mössner E, Kuszniir EA, Huber S, Lauer M, Ringler P, Ferrara C, Klein C, Jawhari A. 2019. Biochemical and biophysical characterization of purified native CD20 alone and in complex with rituximab and obinutuzumab. *Scientific Reports* 9(1): 13675.
- Allard B, Priam F, Deshayes F, Ducancel F, Boquet D, Wijkhuisen A, Couraud JY. 2011. Electroporation-aided DNA immunization generates polyclonal antibodies against the native conformation of human endothelin B receptor. *DNA Cell Biology* 30:727–737.
- Anderson K, Lutz C, Van-Delft FW, Bateman CM, Guo Y, Colman SM, Kempiski H, Moorman AV, Tittley I, Swansbury J, Kearney L, Enver T, Greaves M. 2011. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature* 469: 356-361.
- Arber D, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, LeBeau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*: 20: 2391-2405.
- Babiuk S, Mookherjee N, Pontarollo. 2004. TLR9<sup>-/-</sup> and TLR9<sup>+/+</sup> mice display similar immune responses to a DNA vaccine. *Immunology* 113(1):114–120.
- Bates MK, Zhang G, Sebestyen MG, Neal ZC, Wolff JA, Herweijer H. 2006. Genetic immunization for antibody generation in research animals by intravenous delivery of plasmid DNA. *BioTechniques* 40:199–208.
- Bhatt VR, Gundabolu K, Koll T, Maness LJ. 2018. Initial therapy for acute myeloid leukemia in older patients: principles of care. *Leuk Lymphoma* 59(1): 29-41.

- Bhatt VR, Shostrom V, Gundabolu K, Armitage JO. 2018. Utilization of initial chemotherapy for newly diagnosed acute myeloid leukemia in the United States. *Blood Advances* 2(11): 1277-1282.
- Bi L, Wu J, Ye A, Wu J, Yu K, Zhang S, Han Y. 2016. Increased Th17 cells and IL-17A exist in patients with B cell acute lymphoblastic leukemia and promote proliferation and resistance to daunorubicin through activation of Akt signaling. *Journal of Translational Medicine* 14:132-143.
- Borate U, Fathi AT, Shah BD. 2013. A first-in-human phase 1 study of the antibody-drug conjugate SGN-CD19A in relapsed or refractory B-lineage acute leukemia and highly aggressive lymphoma. *Blood* 122(21): 1437-1446.
- Borowitz MJ, Wood BL, Devidas M, Loh ML, Raetz EA, Salzer WL, Nachman JB, Carroll AJ, Heerema NA, Gastier-Foster JM, Willman CL, Dai Y, Winick NJ, Hunger SP, Carroll WL, Larsen E. 2015. Prognostic significance of minimal residual disease in high risk B-ALL: a report from Children's Oncology Group study AALL0232. *Blood* 126(8): 964-971.
- Bügler S, Nadal D, 2017. Pediatric precursor B acute lymphoblastic leukemia: are T helper cells the missing link in the infectious etiology theory?. *Molecular and Cellular Pediatrics* 46: 348-355.
- Buss NA, Henderson SJ, McFarlane M, Shenton JM, Haan L. 2012. Monoclonal antibody therapeutics: history and future. *Current Opinion in Pharmacology* 12: 615-622.
- Cang S, Mukhi, Wang K, Liu D. 2012. Novel CD20 monoclonal antibodies for lymphoma therapy. *Journal of Hematology & Oncology* 6: 64- 73.
- Chemaitilly W, Sklar CA. 2010. Endocrine complications in long-term survivors of childhood cancers. *Endocr Relat Cancer* 17: R141–R159.
- Chiarretti S, Zini G, Bassan R. 2014. Diagnosis and Subclassification of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* 6(1): 73- 87.

- Chow EJ, Liu W, Srivastava K, Leisenring WM, Hayashi RJ, Sklar CA, Stovall M, Robison LL, Baker S. 2013. Differential Effects of Radiotherapy on Growth and Endocrine Function Among Acute Leukemia Survivors: A Childhood Cancer Survivor Study Report. *Pediatric Blood Cancer* 60: 110-115.
- Chua KY, Ramos JD, Cheong N. 2008 Production of monoclonal antibody by DNA immunization with electroporation. *Methods mol biol* 423: 509-520.
- Dorantes-Acosta E, Medina-Sanson A, Dávila-Ornelas K, López-Martínez. 2013. Clasificación inmunológica de las leucemias agudas linfoblásticas del Hospital Infantil de México Federico Gómez, de acuerdo al EGIL (European Group for the Immunological Classification of Leukemia). *Elsevier* 12 (3): 136-142.
- Dotan E, Aggarwal C, Smith MR. 2010. Impact of rituximab (Rituxan) on the treatment of B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Pharmacy and Therapeutics* 35(3), 148–157.
- Eden T, Menzel S, Wesolowski J, Bergmann P, Nissen M, Dubberke G, Seyfried F, Albrecht B, Haag F, Koch-Nolte F. 2017. A cDNA Immunization Strategy to Generate Nanobodies against Membrane Proteins in Native Conformation. *Frontiers in immunology* 8:1989.
- Fei F, Joo EJ, Tarighat SS, Schiffer I, Paz H, Fabbri M, Abdel-Azim H, Groffen J, Heisterkamp N. 2015. B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and stromal cells communicate through Galectin-3. *Oncotarget* 6(13): 11378-11394.
- Ferrando AA, López-Otín C. 2017. Clonal evolution in leukemia. *Nature Medicine* 23(10): 1135-1145.
- Felicia-Faienza M, Delvecchio M, Giordano P, Cavallo L, Grano M, Brunetti G, Ventura A. 2014. Metabolic syndrome in childhood leukemia survivors: a meta-analysis. *Endocrine* 7:397-405.

- Filho AM, Piñeros M, Ferlay J, Soerjomataram I, Monnereau A, Bray F. 2018. Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. *Lancet Hematology* 5: 14-24.
- Girardi T, Vicente C, Cools J, Keersmaecker K. 2017. The genetics and molecular biology of T-ALL. *Blood* 129, 1113-1123.
- Glennie MJ, French RR, Cragg MS, Taylor RP. 2007. Mechanism of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Molecular immunology* 44: 2823-2837.
- Göthert RJ, Imsak R, Möllmann M, Kesper S, Göbel M, Dührsen U, Scholz A, Lücking U, Baumann M, Unger A, Schultz-Fademrecht C, Klebl B, Eickhoff J, Choidas A, Dürig J. 2018. Potent anti-leukemic activity of a specific cyclin-dependent kinase 9 inhibitor in mouse models of chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* 9(41): 26353-26369.
- Harding FA, Stickler MM, Razo J, DuBridge RB. 2010. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies. *MAbs* 2(3) 256-265.
- Hazen M, Bhakta S, Vij R, Randle S, Kallop D, Chiang V, Hotzel I, Jaiswal BS, Ervin KE, Li B, Weimer RM, Polakis P, Scheller RH, Junutula JR, Hongo JA. 2014, An improved and robust DNA immunization method to develop antibodies against extracellular loops of multi-transmembrane proteins. *MAbs* 6: 95–107.
- Hollister K, Chen Y, Wang S. 2014. The role of follicular helper T cells and the germinal center in HIV-1 gp120 DNA prime and gp120 protein boost vaccination. *Human vaccines & immunotherapeutics* 10(7):1985-1992.
- Howlander N, Noone AM, Krapcho M. 2013. SEER Cancer Statistics Review. *Bethesda, Md: National* 28:1975-2010.
- Hungate EA, Vora SR, Gamazon ER, Moriyama T, Best T, Hular I, Lee Y, Evans TJ, Ellinghaus E, Stanulla M, Rudant J, Orsi L, Clavel J, Milne E, Scott RJ, Pui CH, Cox NJ, Loh ML, Yang JJ, Skol AD, Onel K. 2016. A variant at 9p21.3 functionally implicates CDKN2B in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia aetiology. *Nat Commun* 7:10635

- Hutchings CJ, Koglin M, Marshall FH. 2010. Therapeutic antibodies directed at G proteincoupled receptors. *MAbs* 2(6): 594-606.
- Landau DA, Carter SL, Getz G, Wu CJ. 2014. Clonal evolution in hematological malignancies and therapeutic implications. *Leukemia* 28(1): 34-43.
- Leak-Bryant A, Coffman EM, Phillips B, Gray TF, Knafl GJ, wood WA, Muss H, Reeve BB. 2018. Symptoms, Mobility and Function, and Quality of Life in Adults With Acute Leukemia During Initial Hospitalization. *Oncology Nursing Forum* 45(5): 653-664.
- Liu S, Wang S, Lu S. 2018. Using DNA Immunization to Elicit Monoclonal Antibodies in Mice, Rabbits, and Humans. *Human gene therapy* 29(9):997-1003.
- Iughetti L, Bruzzi P, Predieri B, Paolucci P. 2012. Obesity in patients with acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Italian Journal of Pediatrics* 38: 4-16.
- Jabbour E, O'Brien S, Ravandi F, Kantarjian H. 2014. Monoclonal antibodies in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 125: 4010- 4016.
- Jäckel C, Nogueira MS, Ehni E, Kraus C, Ranke J, Dohmann M, Noessner E, Nelson PJ. 2016. A vector platform for the rapid and efficient engineering of stable complex transgenes. *Scientific Reports* 6:34365
- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. 2010. Cancer statistics. *Cancer Journal Clinical*: 60, 277–300.
- Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. 2006. Replacing the complementary-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Adv Drug Deliv Rev* 81:640-656.
- Khademi F, Mostafaie A, Parvanesh S, Gholami RF, Mohammadi P, Bahrami G. 2017. Construction and characterization of monoclonal antibodies against the extracellular domain of B-lymphocyte antigen CD20 using DNA immunization method. *Int Immunopharmacology* 43:23-32.



- Klein C, Lammens A, Schafer W, Georges G, Schwaiger M, Mossner E, Hopfner KP, Umana P, Niederfellner G. 2013. Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties. *MAbs* 5:22–33.
- Kondo T, Kobayashi J, Saitoh T. 2013. DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic doublestranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(8):2969–2974.
- Krieg AM. 2000. The role of CpG motifs in innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 12:35–43
- Kurosawa M, Yonezumi M, Hashino S, Tanaka J, Nishio M, Kaneda M, Ota S, Koda K, Suzuki N, Yoshida M, Hirayama Y, Takimoto R, Torimoto Y, Mori A, Takahashi T, Iizuka S, Ishida T, Kobayashi R, Oda T, Sakai H, Yamamoto S, Takahashi F, Fukuhara T. 2012. Epidemiology and treatment outcome of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies. *Int J Hematol* 96:748-757.
- Maloy KJ, Erdmann I, Basch V, Sierro S, Kramps TA, Zinkernagel RM, Oehen S, Kundig TM. 2001. Intralymphatic immunization enhances DNA vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 3299–3303.
- Martin-Folgar R, Lorenzo G, Boshra H, Iglesias J, Mateos F, Borrego B, Brun A. 2014. Development and characterization of monoclonal antibodies against Rift Valley fever virus nucleocapsid protein generated by DNA immunization. *MAbs* 2:275–284.
- Masuko T, Ohno Y, Masuko K, Yagi H, Uejima S, Takechi M, Hashimoto Y. 2011. Towards therapeutic antibodies to membrane oncoproteins by a robust strategy using rats immunized with transfectants expressing target molecules fused to green fluorescent protein. *Cancer Sci* 102(1):25-35.
- Maude SL, Teachey DT, Porter DL. 2015. CD19-target chimeric antigen receptor T-Cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 125(26): 4017-4023.

- Mehrling T. 2015. Chemotherapy is getting “smarter”. *Future Oncology* 11(4), 549–552.
- Merino A. 2010. Clasificación de las leucemias agudas mieloides. *Clinic Laboratories Reviews* 3(3): 139-147.
- Milleck J, Kreuzer KA, Med D, Assenmacher M, Schmitz J, Jaha PS. 2012. Characterization of peripheral B cells expressing CLL-associated receptor tyrosine kinase ROR1 in healthy donors. 1787-1797. *Blood* 21: 1787-1797.
- Molica M, Massaro F, Breccia M. 2017. Diagnostic and prognostic cytogenetic of chronic myeloid leukemia: an update. *Expert Review of Molecular Diagnostic* 18: 1473-1493.
- Moriyama T, Metzger ML, Wu G, Nishii R, Qian M, Devidas M, Yang W, Cheng C, Cao X, Quinn E, Raaimondi S, Gastier-Foster JM, Raetz E, Larsen E, Martin PL, Bowman WP, Winick N, Kodama Y, Wang S, Edmonson M, Xu H, Mardis E, Fulton R, Pui CH, Mullighan C, Evans WE, Zhang J, Hunger SP, Relling MV, Nichols KE, Loh ML, Yang JJ. 2015. Germline genetic variation in ETV6 and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia: a systematic genetic study. *The Lancet Oncology* 16(16): 1659-1676.
- Mughal T, Radich J, Deininger M, Apperley F, Hughes T, Harrison C, Gambacorti-Passerini C, Saglio G, Cortes J, Daley G. 2016. Chronic myeloid leukemia: reminiscences and dreams. *Haematologica*. 101(5): 541-558.
- Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C. 2017. *Janeway's immunobiology*. Novena edición. New York, NY. *Garland Science, Taylor & Francis Group*. 904p.
- Oeffinger KC, Mertens AC, Sklar CA, Kawashima T, Hudson MM, Meadows AT, Friedman DL, Marina N, Hobbie W, Kadan-Lottick NS, Schwartz CL, Leisenring W, Robison LL. 2006. Childhood Cancer Survivor Study: chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N. Engl. J. Med*: 355, 1572–1582.

- Özlem T, Şebnem YB, Fatma DY, Erdem Ş, Tuba HK, Gülersu I, Hale Ö. 2014. Management of Invasive Fungal Infections in Pediatric Acute Leukemia and the Appropriate Time for Restarting Chemotherapy. *Turk J Hematol* 32:329-337.
- Pangault C, Ame-Thomas P, Ruminy P, Rossille D, Caron G, Baia. 2010. Follicular lymphoma cell niche: identification of a preeminent IL-4-dependent T(FH)-B cell axis. *Leukemia* 24(12):2080–2089.
- Parete-Ribes A, Skanland SS, Bürgler S, Os A, Wang D, Bogen B, Tjønnfjord GE, Taskén K, Munthe LA. 2016. Spleen tyrosine kinase inhibitors reduce CD40L-induced proliferation of chronic lymphocytic leukemia cells but not normal B cells. *Haematologica* 101(2): 59-62.
- Patel MI, Ma Y, Mitchell B, Rhoads KF 2015. How do differences in treatment impact racial and ethnic disparities in acute myeloid leukemia?. *Cancer Epidemiol Biomarker* 24(2):344-349.
- Piacentini S, Polimanti R, Porreca F. 2011. *GSTT1* and *GSTM1* gene polymorphisms in European and African populations. *Molecular Biology Reports* 38(2):1225–1230.
- Presta LG. 2005. Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function. *Adv Drug Deliv Rev* 58:640-656.
- Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, Relling MV. 2012. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there?. *Blood Journal* 120: 1165-1174.
- Puumala SE, Ross JA, Aplenc R, Spector LG. 2013. Epidemiology of Childhood Acute Myeloid Leukemia. *Pediatric Blood Cancer* 60(5): 728-733.
- Risnik D, Podaza E, Almejún MB, Colado A, Elías EE, Bezares RF, Fernández-Grecco H, Cranco S, Sánchez-Ávalos JC, Borge M, Gamberale R, Giordano M. 2017 Revisiting the role of interleukin-8 in chronic lymphocytic leukemia. *Scientific Reports* 7: 15714-15721.

- Robak T, Jamroziak K, Robak P. 2009. Current and emerging treatments for chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs* 69:2415–2449.
- Roengvoraphoj M, Tsongalis GJ, Dragnev KH, Rigas JR. 2013. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as initial therapy for non-small cell lung cancer: focus on epidermal growth factor receptor mutation testing and mutation-positive patients. *Cancer Treat Rev* 39: 839-850.
- Samadani AA, Nikbakhsh N, Fattahi S, Pourbagher R, Mohsen S, Mir A, Kani NM, Abedian Z, Akhavan-Niaki H. 2015. RNA Extraction from Animal and Human's Cancerous Tissues: Does Tissue Matter?. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine* 4(1): 58-65.
- Schroder K, Muruve DA, Tschopp J. 2009. Innate immunity: cytoplasmic DNA sensing by the AIM2 inflammasome. *Current biology* 19(6):262–265.
- Sharkey RM, Govindan SV, Cardillo TM, Goldenberg DM. 2012. Epratuzumab-SN-38: a new antibody-drug conjugate for the therapy of hematologic malignancies. *Mol Cancer Ther* 11(1):224-234.
- Sepehr KS, Baradaran B, Majidi J, Abdolalizadeh J, Aghebati L, Shahneh FZ. 2012. Development and characterization of monoclonal antibodies against human CD20 in Balb/c mice. *Human Antibodies* 21: 57-64.
- Sepehr KS, Baradaran B, Majidi j, Abdolalizadeh J, Aghebati L, Shahnenh FZ. 2013. Mass-Production and Characterization of Anti-CD20 Monoclonal Antibody in Peritoneum of Balb/c Mice. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 3(1): 109-113.
- Shah S, Schrader KA, Wanders E, Timms AE, Vijai J, Miething C, Wechsler J, Yang J, Hayes J, Klein RJ, Zhang J, Wei L, Wu G, Rusch M, Nagahawatte P, Ma J, Chen SC, Song G, Cheng J, Meyers P, Bhojwani D, Jhanwar S, Maslak P, Fleisher M, Littman J, Offit JD, nel K, Plon SE, Wheeler D, Rittler D, Lipkin SM, Lowe SW, Downing JR, Altshuler D, Sandlund JT, Horwitz MS, Mullighan CG, Offit K. 2013. A recurrent germline PAX5 mutation confers susceptibility to pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics* 16(16): 1659-1666.

- Shanehbandi D, Majidi J, Kazemi T, Baradaran B, Aghebati-Maleki L. 2017. Cloning and molecular characterization of the cDNAs encoding the variable regions of an anti-CD20 monoclonal antibody. *Human Antibodies* 16(1):1-6.
- Sharkey RM, Govindan SV, Cardillo TM, Goldenberg DM. 2012. Epratuzumab-SN-38: a new antibody-drug conjugate for the therapy of hematologic malignancies. *Mol Cancer Ther* 11(1):224-234.
- Smith MA, Altekrose SF, Adamson PC. 2014. Declining childhood and adolescent cancer mortality. *Cancer* 120 (16): 2497-506.
- Stern M, Herrmann R. 2005. Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. *Crit Rev Oncol Hematol* 54: 11-29.
- Stieglitz E, Loh ML. 2013. Genetic predispositions to childhood leukemia. *Therapeutic Advances Hematology* 4: 270–90.
- Suschak JJ, Wang S, Fitzgerald KA, Lu S. 2016. A cGAS-Independent STING/IRF7 Pathway Mediates the Immunogenicity of DNA Vaccines. *J Immunology* 196(1):310-316.
- Terwillinger T, Abdul-Hay M. 2017. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal* 7: 577-589. *Scientific Reports* 7: 1476-1486.
- Thomas X. 2012. Inotuzumab ozogamicin in the treatment of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Expert Opin Investig Drugs* 21(6):871-878.
- Troeger A, Glouchkova L, Ackermann B, Escherich G, Hanenberg H, Janka G, Roettgers S, Göbel U, Dilloo D. 2014. Significantly increased CD70 up regulation on TEL-AML positive B cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells following CD40 stimulation. *Klin Padiatr* 7: 332-337.
- Vaine M, Wang S, Hackett A, Arthos J, Lu S. Antibody responses elicited through homologous or heterologous prime-boost DNA and protein vaccinations differ in functional activity and avidity. *Vaccine*. 2010;28(17):2999-3007.

- Williams DG, Matthews DJ, Jones T. 2010. Humanising Antibodies by CDR Grafting. *Antibody Engineering*: 319-339.
- Zhang Z, Yuan B, Bao M, Lu N, Kim T, Liu YJ. 2011. The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nature immunology* 12(10):959–965.
- Zawily AE, McEwen E, Toosi B, Vizeacoumar FS, Freywald T, Vizeacoumar FJ, Freywald A. 2017. The EphB6 receptor is overexpressed in pediatric T cell acute lymphoblastic leukemia and increases its sensitivity to doxorubicin treatment. *Scientific Reports* 7: 1467-1477.
- Zhou H, Xu R. 2015. Leukemia stem cells: the root of chronic myeloid leukemia. *Protein & Cell* 6(6):403-412.
- Zucchelli S, Capone S, Fattori E, Folgori A, Di Marco A, Casimiro D, Simon AJ, Laufer R, La Monica N, Cortese R, Nicosia A. 2000. Enhancing B- and T-cell immune response to a hepatitis C virus E2 DNA vaccine by intramuscular electrical gene transfer. *Journal Virology* 74: 11598–11607.

## Abreviaturas

Abs: Anticuerpo

ADCC: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

ALL: Leucemia linfoblástica aguda

AML: Leucemia mieloide aguda

BAFF: Factor activador de célula B perteneciente a la familia del TNF

B-ALL: Leucemia linfocítica aguda precursora de células B

CART: Linfocito T con receptor quimérico

CHOP: cyclophosphamide, hydroxydaunomycin, Oncovin, prednisolone

CLL: Leucemia linfocítica crónica

CML: leucemia mieloide crónica

CRT: radioterapia craneal

EGIL: Grupo Europeo de Clasificación Inmunológica de Leucemias

Fab: Fracción de unión a antígeno

Fc: Fracción cristalizable

FDA: Food and drugs administrator

Flt3: Ligando tipo FMS relacionado con tirosina cinasa tipo III

HCT: trasplante de células hematopoyéticas alógenas

Ig: Inmunoglobulina

MAbs: Anticuerpo monoclonal

ROR1: receptor huérfano de la tirocina-cinasa

RTX: Rituximab

T-ALL: Leucemia linfocítica Aguda precursora de células T

TBI: radiación corporal total

STR: radioterapia espinal

## Anexos

### PBS 10X

Reactivo	Cantidad
NaCl	80g
KCl	2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14.5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2g
H <sub>2</sub> O Desionizada	1L

Ajustar pH a 7.2

### Buffer de Carbonatos (0.05M)

Reactivo	Cantidad
Bicarbonato	2.1g
H <sub>2</sub> O Desionizada	0.5L

Ajustar pH a 9.5

### Buffer de citratos (0.18M)

Reactivo	Cantidad
Ácido Cítrico	17.2908g
H <sub>2</sub> O Desionizada	0.5L

Ajustar pH a 5.6

### Solución STOP

Reactivo	Cantidad
Ácido Sulfúrico	53.3045g
H <sub>2</sub> O Desionizada	0.5L



### Solución de Bloqueo

Reactivo	Cantidad
Leche en polvo	2.5g
H <sub>2</sub> O Desionizada	0.1L

### PBS-Tween20 (0.1%)

Reactivo	Cantidad
PBS1x	1L
Tween20	1mL

### Solución Reveladora (Stock)

Reactivo	Cantidad
TMB	10mg
DMSO	10mL

### Solución Reveladora (Uso)

Reactivo	Cantidad
Stock	1mL
Buffer fosfato-citrato	9mL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6μL

Preparar 10min antes de revelar la placa.

### Buffer Fosfato-Citrato

Reactivo	Cantidad
Fosfato de sodio (0.2M)	25.7mg
Ácido Cítrico (0.1M)	23.4mL
H <sub>2</sub> O desionizada	50mL

### Medio SOB

Reactivo	Cantidad
Triptona	5g
Extracto de Levadura	1.25g
NaCl	0.125g
KCl (250mM)	2.5mL
H <sub>2</sub> O	250mL

Ajustar pH a 7 y esterilizar por autoclave

### Agar de Soya Tripcaseina (TSA)

Reactivo	Cantidad
TSA	4g
H <sub>2</sub> O desionizada	100mL

Disolver completamente, esterilizar por autoclave y agregar 100 $\mu$ L de ampicilina (100mg/mL).

### MgCl<sub>2</sub>-CaCl<sub>2</sub> (80mM-20mM)

Reactivo	Cantidad
MgCl <sub>2</sub>	0.3808g
CaCl <sub>2</sub>	0.1109g
H <sub>2</sub> O desionizada	50mL

Disolver completamente y esterilizar por autoclave.

### CaCl<sub>2</sub> (0.1M)

Reactivo	Cantidad
CaCl <sub>2</sub>	0.5549g
H <sub>2</sub> O desionizada	50mL

Disolver completamente y esterilizar por autoclave.

## Gel Acrilamida 12%

### Concentrador

Reactivo	Cantidad
Acrilamida	581 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	2.13mL
Tris 0.5M (Ph 6.8)	441 $\mu$ L
SDS 10%	35 $\mu$ L
APS 10%	35 $\mu$ L
TEMED	3.5 $\mu$ L

### Separador

Reactivo	Cantidad
Acrilamida	2.8 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	2.31mL
Tris 1.5M (Ph 8.8)	1.75mL
SDS 10%	70 $\mu$ L
APS 10%	70 $\mu$ L
TEMED	3.5 $\mu$ L



La Universidad Autónoma de Sinaloa  
y el Cuerpo Académico en Inmunogenética y  
Biología Molecular por medio de la  
Facultad de Ciencias Químico Biológicas

Otorgan la presente  
**CONSTANCIA**

**BG MARCO ANTONIO HERNANDEZ VALENZUELA**

Por su participación en el “**I Simposio Internacional de Cáncer**” impartido del 15 al 16 de Noviembre de 2018 en el Teatro de la Torre Académica de la UAS, con un valor curricular de 8 horas.

  
**Dr. Jorge Milán Carrillo**  
Director FCQB

  
**Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina**  
Coordinadora del Curso

