

Universidad ORT Uruguay
Facultad de Ingeniería

**GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS
CELULARES REPORTERAS DE LA ACTIVIDAD DEL
FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN
*NUCLEAR FACTOR KAPPA-B***

Entregado como requisito para la obtención del título de Licenciado en Biotecnología

Giuliana Mastropietro – 167054


Tutor: Mariela Bollati-Fogolín
Co-tutores: Karen Perelmutter e Inés Tiscornia

2014

Declaración de autoría

Yo, Giuliana Mastropietro, declaro que el trabajo que se presenta en esta obra es de mi propia mano.
Puedo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el Proyecto de Grado;
- Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad;
- Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía;
- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mí;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Giuliana Mastropietro

8 de Mayo de 2014

Agradecimientos

En una primera instancia, quisiera agradecerle a mi tutora Mariela Bollati-Fogolín y a mis co-tutoras Karen Perelmuter e Inés Tiscornia por toda su ayuda a lo largo de la realización de mi tesis, porque sin ellas, esto no hubiera sido posible.

Por otro lado, quería agradecerle a la distintas instituciones, sin las cuales no hubiera sido posible llevar a cabo mi tesis de grado, al Institut Pasteur de Montevideo, por dejarme utilizar sus instalaciones y a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por otorgarme en el año 2012, la Beca de Iniciación en la Investigación, con la cual comencé mi investigación.

También quiero agradecer a Carlos Batthyany por donarme uno de los reactivos utilizados en un aspecto importante de mi tesis, y a Valentina Porro por su ayuda en la realización de los enriquecimientos celulares, parte sustancial del proyecto.

Finalmente, agradecerles a las integrantes de la UBC por haberme ayudado en distintos aspectos, y en distinta medida, en la realización de mi tesis y en desarrollarme en el área científica.

Además, a todos aquellos que, de alguna manera u otra, me ayudaron a lo largo de este proceso de crecimiento y desarrollo, tanto a nivel académico como personal.

Abstract

El *Nuclear Factor Kappa-B* (NF- κ B) es un factor de transcripción que desempeña un papel clave en la regulación del sistema inmune. En células sin estimular, los complejos de NF- κ B están inactivos en el citoplasma unido a proteínas inhibitorias I κ Bs. Su activación se produce por fosforilación de I κ B α , disociándose del dímero NF- κ B, migrando al núcleo, e induciendo la expresión de genes específicos. Los efectos pro/anti-inflamatorios de diferentes microorganismos y compuestos naturales o sintéticos, pueden vincularse con la modulación de la activación de NF- κ B.

En el presente trabajo, se propuso generar una herramienta para la evaluación de distintos compuestos y microorganismos con potencial capacidad inmunomoduladora. Se obtuvo una línea celular reportera de la actividad de NF- κ B derivada de la línea parental Caco-2 (Caco-2-pNF- κ B-hrGFP). Ésta se caracterizó junto con la línea celular HT-29-pNF- κ B-hrGFP, previamente generada en el laboratorio, y se comparó la respuesta de ambas frente a estímulos pro-inflamatorios.

Para la generación de la línea reportera, se procedió a transfectar establemente con el plásmido pNF- κ B-hrGFP, el cual contiene el gen que codifica para la proteína GFP (del inglés, *Green Fluorescent Protein*) bajo control de un promotor con múltiples sitios de unión a NF- κ B, y luego se seleccionó con higromicina. Las fracciones celulares que respondieron a estímulos pro-inflamatorios fueron enriquecidas y clonadas mediante un separador celular.

En aquellos clones seleccionados, se estudió mediante citometría de flujo la cinética de activación de NF- κ B y su respuesta frente a diferentes concentraciones de los estímulos: Factor de Necrosis Tumoral- α , Interleuquina-1 β y Lipopolisacárido. Se observó una respuesta diferencial frente a los estímulos, incluso en clones de la misma línea, tanto en la curva dosis-respuesta, como en la cinética de activación.

La línea celular Caco-2 una vez alcanzada la confluencia, se diferencia hacia un fenotipo similar al de los enterocitos del intestino delgado. Por esto, se evaluó el tiempo óptimo en que las células se encuentran polarizadas, evaluando la distribución de actina a través del tiempo por microscopía confocal, y su capacidad de respuesta. El tiempo determinado fue 19-22 días post-confluencia.

Se desafiaron ambos sistemas con agentes reportados como moduladores de la activación de NF- κ B. Se trabajó con un nitroalqueno y con dos cepas de lactobacilos. Sin embargo, ninguno de los agentes estudiados logró una modulación negativa de NF- κ B.

Ambas líneas reporteras constituyen una valiosa herramienta para *screening* primario de sustancias u microorganismos potencialmente moduladores de NF- κ B, así como una alternativa al uso de sistemas *in vivo*.

Palabras clave

Líneas celulares reporteras. Caco-2. HT-29. Factor de transcripción NF- κ B. Citoquinas pro-inflamatorias.

Abreviaturas

ADNc: ADN copia

ANOVA: del inglés, *Analysis of Variance*

ARNm: ARN mensajero

BSA: del inglés, *Bovine Serum Albumin*

β -gal: beta-galactosidasa

CAT: Cloranfenicol Acetil Transferasa

CEI: Células Epiteliales Intestinales

DL: Dilución Límite

DMEM: del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: ácido Etilendiamino Tetraacético

et al.: y colaboradores

FSC: del inglés, *Forward-Scattered light*

GALT: del inglés, *Gut-Associated Lymphoid Tissue*

GFP: del inglés, *Green Fluorescent Protein*

GFP⁺: GFP positiva (s)

GPCR: del inglés, *G-protein Coupled Receptor*

HTS: del inglés, *High Throughput Screening*

IBD: del inglés, *Inflammatory Bowel Diseases*

IKK: del inglés, *I κ B Kinase*

IL-1 β : Interleuquina – 1 β

LB: Luria-Bertani

LPS: Lipopolisacárido

MHC: del inglés, *Major Histocompatibility Complex*

MIF: Mediana de la Intensidad de Fluorescencia

MOI: del inglés, *Multiplicity of Infection*

MRS: Man, Rogosa & Sharpe

MyD88: del inglés, *Myeloid Differentiation primary response gene (88)*

NF- κ B: del inglés, *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NLR: del inglés, *NOD-Like Receptor*

NOD: del inglés, *Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like receptor*

NOD2: del inglés, *Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2*

P/E: Penicilina/Estreptomicina

PBS: del inglés, *Phosphate-Buffered Saline*

PEI: Polietilenimina

PI: del inglés, *Propidium Iodide*
PRR: del inglés, *Pattern Recognition Receptor*
ROS: del inglés, *Reactive Oxygen Species*
SCD: del inglés, *Single Cell Deposition*
SD: del inglés, *Standard Deviation*
SEAP: del inglés, *Secreted Alkaline Phosphatase*
SFB: Suero Fetal Bovino
SSC: del inglés, *Side-Scattered light*
TA: Temperatura Ambiente
TBE: del inglés, *Tris/Borate/EDTA*
TIR: del inglés, *Toll-IL-1 Receptor*
TLR: del inglés, *Toll Like Receptor*
TNF- α : del inglés, *Tumor Necrosis Factor – α*
TSB: del inglés, *Tryptic Soy Broth*

Índice

1. Introducción	11
1.1. Sistemas reporteros	11
1.2. Células epiteliales intestinales y su relación en la inmunidad.....	13
1.3. Agentes inmunomoduladores.....	18
2. Objetivos.....	21
2.1. Objetivo general	21
2.2. Objetivos específicos.....	21
3. Metodología.....	22
3.1. Reactivos generales	22
3.2. Análisis por citometría de flujo.....	22
3.3. Análisis por microscopía confocal y de epifluorescencia	23
3.4. Líneas celulares	23
3.4.1. Caco-2 y HT-29	23
3.4.2. Criopreservación y revitalización de las líneas celulares	23
3.4.3. Recuento celular y determinación de viabilidad con Azul de Tripán	24
3.4.4. Determinación de viabilidad utilizando Ioduro de Propidio	24
3.5. Generación de la línea celular Caco-2-pNF- κ B-hrGFP	25
3.5.1. Transformación de bacterias con el plásmido pNF- κ B-hrGFP.....	25
3.5.2. Transfección de la línea celular Caco-2 con el plásmido pNF- κ B-hrGFP	27
3.5.3. Curva de sensibilidad al antibiótico de selección	29
3.5.4. Enriquecimiento celular	29
3.5.5. Generación de clones.....	29
3.6. Caracterización de las líneas celulares reporteras	30
3.7. Polarización de la línea celular Caco-2-pNF- κ B-hrGFP.....	31
3.7.1. Cinética de polarización	31
3.7.2. Caracterización preliminar de la línea Caco-2-pNF- κ B-hrGFP polarizada	32
3.8. Evaluación preliminar de las líneas reporteras	32
3.9. Análisis estadístico	33
4. Resultados Obtenidos	34

4.1.	Generación de la línea celular reportera Caco-2-pNF- κ B-hrGFP	34
4.1.1.	Plásmido pNF- κ B-hrGFP	34
4.1.2.	Curva de sensibilidad al antibiótico de selección	35
4.1.3.	Puesta a punto de las condiciones de transfección de la línea Caco-2.....	35
4.1.4.	Transfección de la línea Caco-2 con el plásmido pNF- κ B-hrGFP	37
4.1.5.	Enriquecimiento celular y generación de clones	38
4.1.6.	Selección de clones.....	42
4.2.	Caracterización de la línea celular reportera Caco-2-pNF- κ B-hrGFP	45
4.2.1.	Caracterización del pool de clones.....	45
4.2.2.	Caracterización de los clones de Caco-2-pNF- κ B-hrGFP	46
4.3.	Polarización de la línea celular Caco-2-pNF- κ B-hrGFP	48
4.4.	Caracterización de la línea celular reportera HT-29-pNF- κ B-hrGFP	51
4.4.1.	Caracterización de los clones de HT-29-pNF- κ B-hrGFP	51
4.5.	Comparación de ambas líneas reporteras	53
4.6.	Evaluación preliminar de las líneas reporteras	55
5.	Discusión	58
5.1.	Generación de la línea celular reportera Caco-2-pNF- κ B-hrGFP	58
5.2.	Caracterización de las líneas celulares Caco-2-pNF- κ B-hrGFP y HT-29-pNF- κ B-hrGFP....	62
5.3.	Polarización de la línea Caco-2-pNF- κ B-hrGFP	64
5.4.	Evaluación preliminar del sistema	64
6.	Análisis Económico	66
7.	Conclusiones	68
8.	Referencias bibliográficas	70

1. Introducción

1.1. Sistemas reporteros

Muchos fenómenos fisiológicos, incluida la comunicación celular, el desarrollo celular, la regulación del crecimiento, proliferación y oncogénesis, se pueden atribuir a una expresión diferencial de genes. Estos genes se encuentran regulados en respuesta a señales intrínsecas y extrínsecas. Los sistemas reporteros son utilizados con el fin de obtener información de la relación existente entre la activación/inhibición de las diferentes vías y sus efectos en la expresión génica, en los cuales, elementos de respuesta específicos son fusionados a genes que codifican para proteínas reporteras. Estos genes reporteros son utilizados como indicadores en el monitoreo de actividad transcripcional en células, el estudio de promotores y secuencias *enhancer*, estudio del procesamiento y traducción del ARNm, monitoreo de eficiencias de transfección, estudio de interacciones proteína-proteína, localización subcelular y eventos de recombinación (1-3).

La unidad del gen reportero consiste de un promotor y del ADNc de un gen reportero, como ser enzimas, proteínas luminiscentes, proteínas fluorescentes, entre otros. El concepto central de un gen reportero se basa en que, el mismo, se encuentra unido a una secuencia reguladora, que al ser introducido en un sistema biológico, provee de una señal fácilmente medible cuando la expresión de este gen es modulada (2). Esta señal puede ser medida analizando directamente la cantidad de ARNm del gen reportero, la proteína reportera o la actividad enzimática del gen (1). Estos genes reporteros pueden ser constitutivos, utilizados para identificar el sitio de transcripción, y monitorear el nivel y la duración de la actividad génica; así como también, inducibles, siendo una expresión génica controlada, ya sea tejido-específica o activada en presencia de algún compuesto, factores de transcripción o promotores endógenos (4).

Para la generación de líneas celulares reporteras, se requiere que los genes reporteros seleccionados cumplan ciertos requisitos. En primer lugar, el gen reportero debe estar ausente o expresarse en muy bajos niveles en la línea celular seleccionada; además, debe poder ser detectado por un método simple, cuantitativo, reproducible, sensible, rápido y seguro. Por otro lado, el marcador reportero no debe modificar la fisiología celular (5). Ejemplos de estos marcadores reporteros son: GFP (del inglés, *Green Fluorescent Protein*), fosfatasa alcalina, luciferasa, cloranfenicol acetil transferasa (CAT), Beta-galactosidasa (β -gal), entre otros (5).

La proteína GFP es utilizada como gen reportero en células, donde luego de ser excitada a 395 nm, emite una fluorescencia verde con un pico máximo a 509 nm. Es una proteína altamente estable en cuanto a temperatura, pH y proteólisis, y puede ser detectada directamente en células vivas (5). Esta proteína ha revolucionado la biología celular en las últimas décadas debido a sus múltiples usos (6). Como ser para estudios de localización proteica y expresión génica en células vivas, seguimiento *in*

vivo de crecimiento celular y movimiento, especialmente en animales transparentes, entre otros. La misma tiene la capacidad de plegarse autocatalíticamente sin la necesidad de sustratos externos ni co-factores.

High Throughput Screening (HTS) es un procedimiento de análisis en simultáneo de una gran cantidad de moduladores y efectores biológicos frente a un objetivo específico. Esta nueva tecnología, permite acelerar el descubrimiento de agentes inmunomoduladores mediante el análisis de grandes bibliotecas de compuestos, a una razón que puede alcanzar miles de compuestos por día o por semana (7). Estos sistemas se basan en la medición de fluorescencia o luminiscencia, dado que facilitan el procesamiento de la muestra y además, proveen altos niveles de sensibilidad.

Los sistemas reporteros son comúnmente utilizados para la generación de líneas celulares estables reporteras de ciertas vías de señalización específicas. Las transfecciones para obtener líneas celulares estables, a diferencia de las transitorias, presentan la ventaja que la progenie de células hijas heredan la modificación genética, por lo tanto no es necesario realizar nuevos experimentos para introducir el ADN cada vez que se requiera producir la molécula. Sin embargo el principal obstáculo cuando se está trabajando con inserción al azar del ADN, es la baja frecuencia de inserción y consecuentemente, un bajo número de clones que se transfectan de manera estable (5). Para la generación de una línea celular estable, se deben considerar los pasos mencionados en el esquema de la Figura 1. En donde, a partir del gen de interés y de la selección del vector de expresión, se desarrollan distintas estrategias de clonado. Se incorpora el vector de expresión en la línea celular previamente seleccionada por el método de inserción elegido y, posteriormente, se cultiva la línea celular en presencia del antibiótico de selección de acuerdo al vector de expresión elegido (por lo general, dos a tres meses) y se realiza una estrategia de clonado. Luego, se procede al *screening* de los clones, de manera que se eligen aquellos clones con las características deseadas y se optimizan las condiciones de cultivo, se constituyen los bancos celulares (banco maestro y banco de trabajo) y se analiza la estabilidad de la línea celular generada (5).

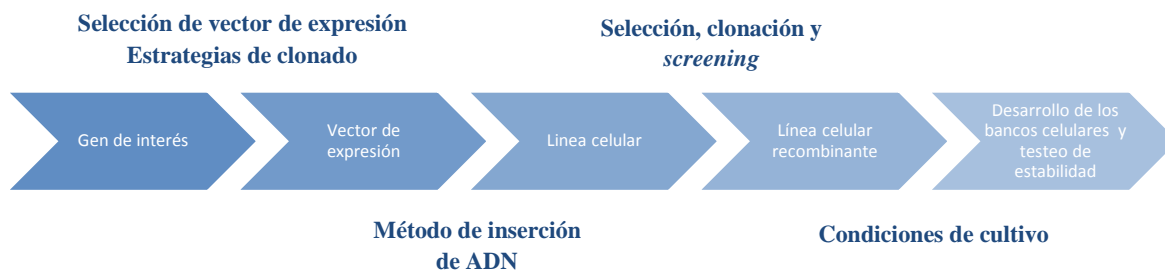


Figura 1. Esquema de generación de una línea celular estable.

El desarrollo de modelos *in vitro* aparece como una herramienta atractiva para la selección y estudio de moléculas bioactivas y de microorganismos con potencial probiótico. Estas líneas celulares reporteras se pueden emplear como método de *screening* primario y puede ser aplicado en la evaluación de compuestos a gran escala (HTS).

1.2. Células epiteliales intestinales y su relación en la inmunidad

La inflamación forma parte de la respuesta del sistema inmune innato. Este proceso ocurre en respuesta frente a cualquier tipo de lesión. Esto genera un aumento del flujo sanguíneo, del metabolismo celular, vasodilatación, emisión de mediadores solubles y extravasación de fluidos. En algunos trastornos, el proceso inflamatorio es continuo y se desarrollan enfermedades de inflamación crónica. La infiltración de células del sistema inmune innato, específicamente neutrófilos y macrófagos, caracteriza la inflamación aguda, mientras que la infiltración de linfocitos T y células de la sangre son características de la inflamación crónica. Los monocitos y macrófagos tienen un rol importante en ambos tipos de inflamación (8).

El regulador central involucrado en la inflamación es el factor de transcripción nuclear NF- κ B (del inglés, *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Este factor es el encargado de la relocalización y activación de los macrófagos en el sitio de infección, así como también de la expresión de genes *target* que median la proliferación celular, secreción de moléculas anti-microbianas y citoquinas (9).

La activación de este factor de transcripción está involucrada en la patogénesis de enfermedades crónicas inflamatorias, como por ejemplo asma, artritis reumatoidea y enfermedades inflamatorias del intestino (IBD, del inglés *Inflammatory Bowel Disease*) (10).

Se ha observado que el NF-κB cumple un rol importante en la relación existente entre la inflamación y el cáncer. La generación de un microambiente inflamatorio es un componente esencial en todos los tumores. Muchas causas ambientales del desarrollo de cáncer están asociados con alguna forma de inflamación crónica (11). En particular, se vio que el padecer IBD aumenta considerablemente el riesgo de contraer cáncer colorectal (11).

El epitelio intestinal participa en procesos de absorción, digestivos y secretorios y juega un rol fundamental en la interacción con otras células del sistema inmune (12). Además, exhibe una gran cantidad de adaptaciones físicas y un sistema inmune asociado denominado GALT (del inglés, *Gut-Associated Lymphoid Tissue*), capaz de generar respuestas inmunes protectoras frente a patógenos e inducir tolerancia frente a componentes inocuos presentes en el lumen, como los antígenos provenientes de la dieta (12,13).

Las células epiteliales intestinales (CEI) poseen microvellosidades, borde en cepillo en la superficie apical rico en actina, el cual impide la invasión y adhesión de microorganismos, y además, uniones estrechas las cuales previenen el tráfico paracelular (14). La barrera física se ve reforzada por adaptaciones bioquímicas como la producción de mucus por las células caliciformes, la presencia de glicocálix y la secreción de un amplio rango de péptidos antimicrobianos producidos por las células de Paneth, que incluye defensinas, catelicidinas y calprotectinas (15,16).

El intestino delgado se encuentra colonizado por, aproximadamente 10^{14} microorganismos comensales, compuesto de 1000-5000 especies distintas, que viven en simbiosis con su huésped (17,18). Estas bacterias (denominadas en su conjunto microbiota intestinal humana) funcionan integradamente desde el punto de vista inmunológico y metabólico. La presencia de la misma, resulta esencial para el correcto desarrollo del sistema inmune de mucosas y para la protección contra patógenos. Además, poseen un rol nutricional, que se basa en la producción de vitamina K y otros componentes del complejo de la vitamina B (19-21).

Los beneficios de la microbiota se evidencian en situaciones en las que se rompe la tolerancia a la misma, como es el caso de las enfermedades inflamatorias crónicas intestinales (IBD) (22). La Enfermedad de Crohn y la Colitis Ulcerosa son dos manifestaciones clínicas de IBD que se caracterizan por inflamación intestinal y son el resultado de una compleja interacción de factores genéticos, inmunológicos y ambientales. Alrededor del 0,1% de la población de regiones industrializadas sufre estas patologías, y la incidencia de la Enfermedad de Crohn está en aumento (23). Si bien se desconoce el factor desencadenante de las IBD, se conoce que existe un control desregulado de las interacciones entre los pacientes y su propia microbiota. Se ha visto que estos

pacientes tienen un número incrementado de bacterias asociadas a la superficie celular del epitelio intestinal, lo que sugiere una falla en los mecanismos que limitan el contacto directo entre la microbiota y el epitelio (24). Hasta el momento las IBD no tienen cura y el tratamiento farmacológico se realiza mediante la administración de drogas anti-inflamatorias no esteroideas o agentes inmunosupresores que tienen la desventaja de presentar efectos secundarios, además de ser un control inadecuado de estas enfermedades (24). Actualmente existe un interés creciente en manipular deliberadamente la biota comensal para lograr beneficios sobre la salud, mediante el enriquecimiento con determinados microorganismos capaces de colonizar el intestino.

Las CEI son las primeras que entran en contacto con la microbiota y con los antígenos presentes en el lumen, y en determinadas situaciones, pueden actuar como células presentadoras de antígeno. Expresan constitutivamente moléculas de MHC (del inglés, *Major Histocompatibility Complex*) de clase I y en respuesta a estímulos expresan moléculas de MHC de clase II en la cara basolateral (25,26).

Por otro lado, las CEI presentan varios receptores de reconocimiento de patrones (PRR, del inglés, *Pattern Recognition Receptor*) de tipo TLR (del inglés, *Toll Like Receptor*) y los NOD (del inglés, *Nucleotide-binding Oligomerization Domain Like Receptor*), que se ubican en las membranas celulares y en el citosol, respectivamente. Al presente se describieron 13 TLR, que son activados por distintos ligandos, además de estar ubicados en distintos compartimientos. El TLR-2 forma heterodímeros con TLR-1 y -6 y reconoce lipoproteínas y ácidos lipoteicos que integran el peptidoglicano de bacterias Gram positivas. El TLR-3 reconoce ARN de doble cadena, producto viral sintetizado en células infectadas. El TLR-4 se activa por LPS, componente principal de la membrana de bacterias Gram negativas y necesita un co-receptor (CD14) para la activación de la cascada de señalización. El TLR-5 detecta la flagelina de bacterias Gram negativas y Gram positivas. TLR-7 y -8 reconocen ARN de cadena simple y moléculas sintéticas antivirales y TLR-9 interacciona con motivos CpG (27). Tanto el TLR-11 como el -12 tienen como ligando la profilina presente en *Toxoplasma gondii* (28). El TLR-13 fue descubierto recientemente, que detecta específicamente la secuencia del ARN ribosomal 23S de bacterias (29-32). Algunos TLRs se encuentran en la superficie celular (TLR-1, -2 y -5) y otros se encuentran secuestrados en compartimientos intracelulares (TLR-3, -7, -8 y -9) (27). La dimerización de los TLRs por unión a sus respectivos ligandos, inicia una cascada que, luego de diversas interacciones proteína-proteína y cambios conformacionales, resulta en la activación de factores de transcripción que lleva a la producción de diferentes citoquinas, quimioquinas y otras moléculas efectoras inflamatorias (27).

Por otro lado, se encuentran los NOD2 (del inglés, *Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2*), pertenecientes a la familia de los NLRs (del inglés, *NOD-Like Receptors*). Estos receptores detectan ligandos intracelulares, como ser el ácido mesodiaminopimélico, presente en el peptidoglicano bacteriano. La unión de estos ligandos a los receptores NOD desencadena la activación del factor de transcripción NF- κ B (15). Además, las CEI poseen los GPCR (del inglés, G-

protein Coupled Receptor), encargados de detectar adenosina, ácidos grasos de cadena corta, como ser butirato, y la proteína A de la capa-S de las bacterias (15).

Las CEI se encuentran en continuo contacto con bacterias tanto benéficas como patológicas. Se encuentran localizadas de manera tal que funcionan como vigilancia inmunológica. Como se explicó previamente, las CEI expresan TLRs, NLRs y GPCRs, las cuales reconocen componentes microbianos y modulan las respuestas celulares a través de la activación de NF- κ B, entre otros, promoviendo la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas y péptidos antimicrobianos (15) (Figura 2).

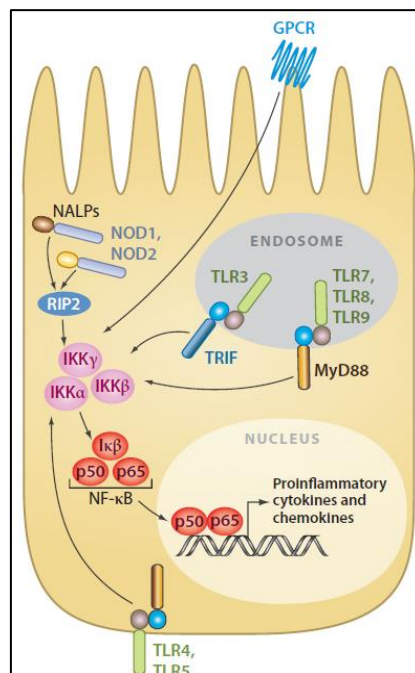


Figura 2. Receptores involucrados en la respuesta inmune innata y sus respectivas cascadas de señalización en las CEI. El esquema muestra la ubicación de los receptores de reconocimiento de patrones innatos y sus respectivas cascadas de señalización en las CEI de mamíferos. Estos receptores convergen en una cascada de señalización común, la de NF- κ B, regulando la transcripción de citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas (Adaptado de Hill *et al.*, 2010).

La mayoría de las vías de señalización a través de los PRR convergen en la activación del factor de transcripción NF- κ B (Figura 3) (27,33,34). Es un factor dimérico que desempeña un papel clave en la regulación del sistema inmune, participando en la activación de las cascadas inflamatorias y en el mantenimiento de la homeostasis (27,33). La familia de factores de transcripción de NF- κ B consiste de cinco miembros en células de mamífero: p65 (RELA), REL, RELB, p50 y p52, los cuales pueden formar homodímeros o heterodímeros (34). En células sin estimular, los complejos de NF- κ B están en su forma inactiva en el citoplasma unido a proteínas inhibitoras I κ Bs, que enmascaran la señal de localización nuclear. En presencia de un estímulo pro-inflamatorio, como ser TNF- α , se produce la activación de NF- κ B por fosforilación de I κ B α por el complejo de señalización de kinasas (IKK), disociándose del dímero NF- κ B. Este último trasloca al núcleo y se une a secuencias κ B, induciendo

la expresión de genes específicos vinculados con citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas (15,35-38). La vía de activación canónica de este factor de transcripción es la que induce la expresión de dichos genes involucrados en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria. Además, esta vía es la responsable de controlar la expresión de proteínas con actividades antioxidante, pro-proliferativa y antiapoptóticas (39).

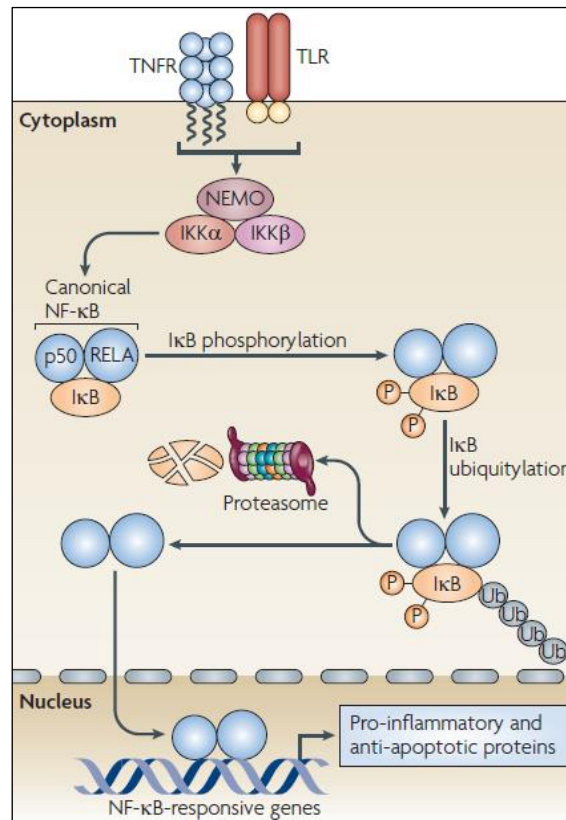


Figura 3. Vía de activación canónica de NF-κB. Representación esquemática de la vía de activación del factor de transcripción NF-κB a través de los receptores TNFR y/o TLR. (Adaptado de Pasparakis, 2009).

Como modelos de CEI, se encuentran la línea celular Caco-2 (HTB-37, ATCC ®) y HT-29 (HTB-38, ATCC ®) originalmente obtenidas de un adenocarcinoma de colon humano. La línea celular Caco-2 es utilizada como modelo de epitelio polarizado para estudiar los mecanismos de diferenciación celular en el intestino. Estas células, luego de alcanzar la confluencia, detienen la proliferación y se diferencian de manera espontánea hacia un fenotipo similar al de los enterocitos del intestino delgado, presentando borde en cepillo, uniones estrechas, localización basal del núcleo, bajo consumo de glucosa y aumento de la actividad de la enzima sacarasa-isomaltasa (40-42). Por otro lado, las HT-29 son utilizadas como modelo de células epiteliales no polarizadas (43-45).

Los sistemas reporteros de la actividad del factor de transcripción NF-κB se basan en la utilización de distintos plásmidos que poseen sitios de unión al factor de transcripción NF-κB. Entre ellos, se encuentra el plásmido pNiFty2-SEAP el cual se utilizó por Lakhdari *et al.* para transfectar establemente células Caco-2 y HT-29. Este plásmido posee el gen reportero de la fosfatasa alcalina

secretada (SEAP). De esta manera, los autores lograron realizar un *screening* de bibliotecas metagenómicas de la microbiota intestinal humana (44,45).

Por otro lado, Romier *et al.* desarrollaron un modelo transitorio en la línea Caco-2 con un plásmido NF- κ B-dependiente de luciferasa, el cual posee el gen de luciferasa bajo control transcripcional de cuatro copias del elemento de respuesta de NF- κ B. Este sistema fue utilizado para examinar los efectos de polifenoles en la inducción de la activación de NF- κ B por parte de citoquinas pro-inflamatorias y LPS (46).

En otra investigación, se co-transfectó transitoriamente la línea celular RAW-264.7 (línea celular de macrófagos murina) con el plásmido reportero NF- κ B-luc y un plásmido de expresión de GFP para determinar los efectos inflamatorios de nitroalquenos derivados del ácido linolénico y del ácido oleico (47).

Bambou *et al.* desarrollaron un sistema reportero en donde se transfectó transitoriamente células HT-29 y Caco-2 con el plásmido NF- κ B reportero Ig κ -luciferasa. Dicho plásmido fue construido insertando tres copias del sitio de *immunoglobulin K chain enhancer* KB río arriba del promotor de conalbúmina, seguido del gen de luciferasa (48). Este sistema se desafió frente a *E. coli* MG1655 y una mutante isogénica aflagelada y se observó su capacidad de activación del factor de transcripción NF- κ B (49).

En la Unidad de Biología Celular del Institut Pasteur de Montevideo se generó la línea reportera HT-29-pNF- κ B-hrGFP en el contexto de la tesis de maestría de Inés Tiscornia, y se utilizó para evaluar bacterias potencialmente probióticas (50).

1.3. Agentes inmunomoduladores

Existen una variedad de agentes inmunomoduladores que son utilizados con el fin de tener un control sobre la homeostasis del intestino, así como también para controlar las IBD.

Los probióticos son microorganismos vivos con propiedades beneficiosas para la salud (51). Estos microorganismos deben cumplir con una serie de requisitos. La cepa utilizada debe: no ser patogénica, no degradarse en la mucosa intestinal, no poseer genes transferibles de resistencia a antibióticos, ser susceptible a antibióticos, ser capaz de sobrevivir en el tracto intestinal, colonizar el intestino, producir sustancias antimicrobianas, antagonizar bacterias patógenas y estar al menos, en estudios de fase 2 en cuanto a efectos beneficiosos en la salud (52,53). Los mismos se utilizan como una estrategia terapéutica y profiláctica en algunos casos de alteraciones inflamatorias del intestino, como ser el tratamiento de patologías como IBD, tratamiento y prevención de gastroenteritis viral aguda, diarrea asociada a uso de antibióticos, alergias pediátricas y enterocolitis necrotizante (23). Se

ha propuesto que parte de estos beneficios se atribuyen a la acción inmunomoduladora de estas bacterias. Recientemente, han sido elucidados algunos de los mecanismos por los cuales los probióticos ejercen su función (54). La mayoría de los probióticos funcionan a través de un incremento en la respuesta inmune, modulación de la microbiota intestinal, así como también a través de la producción de bacteriocina, reducción en la acumulación de lípidos e inducción de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés, *Reactive Oxygen Species*) (54). Los probióticos son ampliamente utilizados en la industria alimentaria, son agregados en el proceso de producción de yogurt, queso e incluso leche.

Los prebióticos son ingredientes presentes en las comidas, poco digeribles por el huésped, que poseen un efecto benéfico en la salud del mismo a través de una estimulación selectiva del crecimiento o actividad de microorganismos específicos de la biota bacteriana. Hoy en día se utilizan la inulina, fructo-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos y fibra soluble, como ser pectina y goma guar, como principales prebióticos. Además, fibras presentes en la dieta pueden actuar como prebióticos induciendo cambios en la composición de la microbiota comensal y afectando directamente al sistema inmune en las mucosas. Además, los prebióticos son capaces de proveer resistencia a la colonización por parte de microorganismos patógenos, inhibiendo la adherencia de los mismos al epitelio intestinal (54).

Por otro lado, existen compuestos sintéticos y naturales que son utilizados en la modulación del sistema inmune. Por ejemplo, los polifenoles, los cuales son los antioxidantes más abundantes en la dieta humana, encontrándose en muchos productos derivados de plantas. Los polifenoles han demostrado tener propiedades anti-inflamatorias y la idea de utilizar compuestos naturales como método de prevención de la inflamación intestinal, está avalado por la percepción pública (46). Otro ejemplo de la literatura son los ácidos grasos nitrados. Se ha demostrado que estos inhiben la secreción de citoquinas pro-inflamatorias inducidas por LPS, además de inducir la nitroalquilación de la proteína p65 del factor de transcripción NF- κ B, inhibiendo su unión al ADN, por lo tanto, inhibiendo su vía de activación (47).

A pesar de que existen otros sistemas reporteros de la vía de activación del factor NF- κ B en células Caco-2, como el de Lakhdari *et al.*, este no se encuentra completamente caracterizado, además de utilizar la fosfatasa alcalina como gen reportero (44,45).

Al presente, no existen reportes en la literatura de la existencia de células Caco-2 establemente transfectadas con el gen que codifica para la proteína GFP, expresada bajo el control de un promotor que contiene múltiples sitios de unión a NF- κ B (plásmido pNF- κ B-hrGFP). En este sentido, resulta de gran interés contar con esta herramienta a fin de realizar *screening* de posibles agentes inmunomoduladores utilizando las ventajas de la proteína GFP. Permitiendo, además, el estudio comparativo con la línea HT-29-pNF- κ B-hrGFP previamente generada en el laboratorio.

Por todo lo expuesto previamente, surge la necesidad y resulta interesante, disponer de un modelo epitelial que permita la evaluación y selección primaria de agentes potencialmente inmunomoduladores y posteriormente, analizarlos en sistemas más complejos, como por ejemplo modelos *in vivo*. Este método también podría ser utilizado para estudiar diversas situaciones patológicas donde el equilibrio de la microbiota con el entorno se encuentra alterado (como ser en las IBD) e incluso ser utilizado como profiláctico.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Generación y caracterización de la línea celular Caco-2 reportera de la actividad del factor de transcripción NF- κ B y su posterior comparación con la línea HT-29-pNF- κ B-hrGFP.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Generar una línea celular recombinante Caco-2-pNF- κ B-hrGFP reportera de la actividad del factor de transcripción NF- κ B.
- ✓ Caracterizar el *pool* de clones de la línea Caco-2-pNF- κ B-hrGFP.
- ✓ Caracterizar los clones de la línea Caco-2-pNF- κ B-hrGFP, evaluando su respuesta frente a distintos estímulos pro y anti-inflamatorios.
- ✓ Caracterizar los clones de la línea HT-29-pNF- κ B-hrGFP, evaluando su respuesta frente a distintos estímulos pro y anti-inflamatorios.
- ✓ Comparar la respuesta de ambas líneas reporteras.

3. Metodología

3.1. Reactivos generales

Las sales que se utilizaron para la preparación de soluciones provienen de Sigma (US). Además, se obtuvo de la misma compañía: ampicilina, higromicina, Polietilenimina (PEI), Tripsina-EDTA, Penicilina/Estreptomicina (P/E), Tampón fosfato salino sin calcio ni magnesio (PBS), Dimetilsulfóxido (DMSO), Lipopolisacárido (LPS) de *E.coli* (serotipo 026:B6), medio Luria-Bertani (LB), agar, Seroalbúmina bovina (BSA), Ioduro de propidio (PI) y la citoquina recombinante humana, Factor de Necrosis Tumoral – α (TNF- α).

La citoquina Interleuquina – 1 β (IL-1 β) se obtuvo de R&D Systems (US) y de Invivogen (US). El medio de cultivo para células DMEM (del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) y el SFB (Suero Fetal Bovino) se adquirieron de Gibco (US).

Los medios de cultivo para bacterias Man, Rogosa & Sharpe (MRS) y el caldo de tripton y soja (TSB) se obtuvieron de Oxoid (GB).

Las sondas moleculares *DAPI Nucleic Acid Stain* y *Texas Red® -X phalloidin* (Phallotoxins) que se utilizaron para microscopía confocal y de epifluorescencia, se obtuvieron de Life Technologies (US).

El plásmido pNF- κ B-hrGFP se adquirió de Stratagene (US) y el plásmido pIRES2-AcGFP1 de Clontech Laboratories, Inc. (US).

3.2. Análisis por citometría de flujo

Se utilizó un citómetro de flujo CyAn™ ADP (Beckman Coulter, Inc.) equipado con un láser de 488 nm y uno de 635 nm. Se colectaron 10.000 eventos en la región de análisis (R1), definida en el gráfico SSC (del inglés, *Side-Scattered light*) vs FSC (del inglés, *Forward-Scattered light*) (granularidad vs tamaño celular), donde se excluyeron los detritos celulares. Además, se excluyeron los dobletes (a través de la región definida como R2) mediante el gráfico de Ancho de pulso vs FSC. Los análisis de GFP vs PI y GFP vs FSC se realizaron tomando en cuenta la intersección de las regiones R1 y R2 (denominada G2).

Por otro lado, se analizaron histogramas de los canales de fluorescencia correspondientes a cada caso en particular, de los cuales se obtuvo el porcentaje de células positivas y el valor de la mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF), dependiendo del caso. Se utilizó un umbral entre 5 y 10%.

En cada experimento se utilizaron como controles: células sin fluorescencia y sin teñir con PI, células teñidas únicamente con PI y células sólo con el fluorocromo (GFP). Para la adquisición de datos y su posterior análisis se empleó el programa Summit versión 4.3.

3.3. Análisis por microscopía confocal y de epifluorescencia

Se utilizó un microscopio confocal Leica TCS-SP5, equipado con láseres de excitación de 488 nm, 543 nm, 594 nm y 633 nm. Se utilizaron los láseres de excitación 505 nm para visualizar DAPI y 594 nm para rodamina (actina). Para el análisis de las imágenes se utilizó el *software* LAS AF Lite versión 2.6.0. de Leica. El microscopio de epifluorescencia empleado Olympus IX81, se encuentra equipado con filtros de excitación de 360-370 nm, 470 – 495 nm, 530-550 nm, 300-400 nm y campo claro. Se utilizaron los filtros de excitación de 360-370 nm para DAPI y 530-550 nm para Rodamina.

3.4. Líneas celulares

3.4.1. Caco-2 y HT-29

Las líneas celulares epiteliales continuas, Caco-2 (ATCC ® HTB-37) y HT-29 (ATCC ® HTB-38), derivan de un adenocarcinoma de colon humano. Las mismas se cultivaron a 37°C en una atmósfera húmeda controlada con 5% de CO₂. En general, se utilizó DMEM suplementado con 10-20% de SFB en presencia/ausencia de 100 U/mL de Penicilina y 100 µg/mL de Estreptomicina, dependiendo del ensayo.

La descomplementación del SFB empleado para suplementar los medios se efectuó durante 40 min en un baño de agua termostatzado a 56°C.

Estas líneas crecen en adherencia y para el mantenimiento en cultivo, se emplearon botellas de 25, 75 y 150 cm², realizando pasajes de las mismas mediante el empleo de tripsina cada vez que alcanzaban un 80% de confluencia y por un máximo de 20 pasajes.

3.4.2. Criopreservación y revitalización de las líneas celulares

Para la conservación de las líneas celulares, se utilizó una mezcla crioprotectora que consiste en 10% DMSO y 90% SFB utilizando una cámara que utiliza isopropanol y permite realizar un enfriamiento progresivo de 1°C por minuto (Nalgene). Una vez que las líneas celulares se encontraban en fase de crecimiento exponencial, estas fueron tripsinizadas, contadas en cámara de Neubauer y centrifugadas a 260g durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular se resuspendió en

el volumen necesario de mezcla crioprotectora para obtener una concentración entre 2 y 3×10^6 células/mL. Se dispensó entre 1 – 1,5 mL de la suspensión celular por criotubo. Los criotubos así preparados, fueron colocados en la cámara de congelación con isopropanol y almacenados en un freezer a -80°C durante 24-48 h. Al cabo de este tiempo, fueron transferidos a un tanque que contiene nitrógeno líquido.

Para el descongelado y revitalización de las líneas celulares criopreservadas, se colocó un criotubo en un baño de agua a 37°C . Las células descongeladas se transfirieron a un tubo cónico que contenía 9 mL de medio de cultivo a 37°C y fueron centrifugadas a 260g durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* celular en 1 mL de medio de cultivo. Posteriormente, se realizó el recuento celular con el objeto de evaluar número y viabilidad de las células recuperadas. Las células fueron sembradas en el formato de placa o botella que correspondiera de acuerdo a la cantidad de células contadas.

3.4.3. Recuento celular y determinación de viabilidad con Azul de Tripán

Se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer, empleando las diluciones convenientes de acuerdo con la densidad celular de la muestra. La concentración de células viables se determinó empleando el método de exclusión con Azul de Tripán, en el cual el colorante se incorpora en las células muertas, debido a que la integridad de la membrana plasmática de las mismas se encuentra comprometida. Las muestras obtenidas de los cultivos celulares, fueron mezcladas con una solución de Azul de Tripán 0,5% en PBS y sembradas en la cámara (55).

3.4.4. Determinación de viabilidad utilizando Ioduro de Propidio

Para evaluar la viabilidad celular por citometría de flujo se utilizó PI. Las células no viables incorporan el colorante y presentan señal positiva en el canal FL3 del citómetro. En el momento de realizar la adquisición, se adicionó PI a una concentración final de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a cada tubo de citometría que contenía las células resuspendidas en 300 μL de PBS 1X y se procedió a la adquisición de los datos en el citómetro de flujo.

3.5. Generación de la línea celular Caco-2-pNF-κB-hrGFP

3.5.1. Transformación de bacterias con el plásmido pNF-κB-hrGFP

Para la obtención de la línea, se trabajó con el plásmido pNF-κB-hrGFP (Figura 4) que contiene el gen de la hrGFP (*humanized recombinant Green Fluorescent Protein*) bajo control de un promotor inducible con múltiples sitios de unión al factor de transcripción NF-κB. Esta variante de GFP presenta optimización de codones para lograr máxima expresión en células humanas. El gen reportero se encuentra dirigido por el elemento promotor básico TATA box y un elemento *enhancer* en cis inducible (*enhancer element*). Además, contiene el origen de replicación bacteriano pUC y el gen de resistencia a ampicilina para la amplificación y selección en bacterias. El gen que confiere resistencia a higromicina para la selección de células establemente transfectadas, se encuentra bajo regulación del promotor de la timidina quinasa y río abajo del gen se encuentra la señal de poliadenilación de la timidina quinasa.

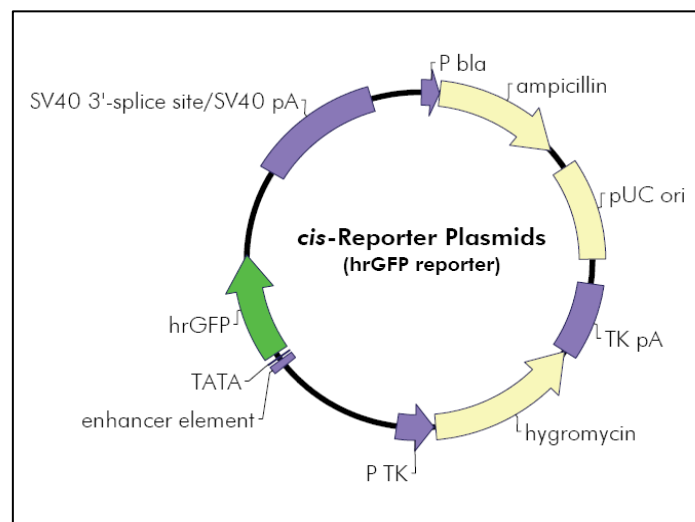


Figura 4. Mapa del plásmido pNF-κB-hrGFP. Plásmido que contiene el gen de la hrGFP bajo control de un promotor con múltiples sitios de unión al factor de transcripción NF-κB. El gen reportero hrGFP se encuentra dirigido por el elemento promotor básico TATA box (TATA) y un elemento *enhancer* en cis inducible. Contiene el origen de replicación bacteriano pUC (pUC ori) y el gen de resistencia a ampicilina para la amplificación y selección en bacterias. El gen que confiere resistencia a higromicina para la selección de células establemente transfectadas, se encuentra bajo regulación del promotor de la timidina quinasa (P TK). Río abajo del gen, se encuentra la señal de poliadenilación de la timidina quinasa (TK pA).

Con el fin de amplificar el plásmido pNF-κB-hrGFP, se utilizaron bacterias *Escherichia coli* DH5- α quimiocompetentes comerciales (Invitrogen) y los siguientes medios de cultivo:

Caldo LB: Se pesaron 20 g del polvo deshidratado comercial LB y se disolvieron en 1 litro de agua destilada. El caldo se fraccionó en frascos Schott de 250 mL de capacidad (100 mL por frasco) y se autoclavó durante 15 min a 1 atmósfera a 120°C.

Caldo LB-Ampicilina: Al momento de utilizar, se adicionaron a 10 mL de caldo LB, 10 μ L de una solución stock de ampicilina 100 mg/mL. La concentración final de ampicilina fue de 100 μ g/mL. Este medio se alicuotó de a 3 mL en tubos cónicos de 15 mL.

Agar LB: Se pesaron 20 g de LB, 15 g de agar y se adicionó 1 litro de agua destilada. Posteriormente, 200 mL de medio fueron fraccionados en frascos Schott de 500 mL de capacidad. Los recipientes fueron esterilizados en autoclave durante 15 min a 1 atmósfera a 120°C. Finalmente, el medio se repartió en placas de Petri estériles de 90 mm de diámetro (20 mL por placa) y fueron almacenadas a 4°C.

Agar LB-Ampicilina: Se fundió 100 mL de agar LB y se lo suplementó con 100 μ L de una solución stock de 100 mg/mL de ampicilina, en el momento que la temperatura del medio alcanza aproximadamente los 50°C. Luego de homogeneizar correctamente, se procedió a adicionar 20 mL del mismo en placas de Petri estériles de 90 mm de diámetro.

Se utilizaron bacterias *E. coli* DH5- α quimiocompetentes que fueron transformadas por choque de calor siguiendo el protocolo de Invitrogen *Subcloning EfficiencyTM DH5 α TM Competent Cells*. Brevemente, se descongelaron en hielo 50 μ L de bacterias *E. coli* DH5 α y se le adicionó 20 ng del plásmido. Se incubó en hielo por 5 min. Se procedió a realizar el choque de calor por 30 seg en un termobloque a 42°C y se las colocó en hielo por 2 min. Luego, se adicionaron 500 μ L de caldo LB y se las incubó a 37°C por 1 h en agitación (225 rpm). Luego de centrifugar las bacterias a 1200g por 5 min se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 110 μ L de caldo LB fresco. Se sembró en una placa de Petri con LB-Ampicilina 100 μ L y en otra placa 10 μ L de la suspensión bacteriana y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Se seleccionaron colonias aisladas de una de las placa de Petri y se sub-cultivaron en caldo LB-Ampicilina durante 24 h a 37°C en agitación a 225 rpm. Posteriormente, se procedió a realizar el aislamiento y purificación del plásmido (*mini-prep*) utilizando el kit comercial *Nucleospin Plasmid* (Macherey-Nagel). Para determinar la concentración del plásmido se utilizó el equipo NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) y para la pureza del mismo, se determinó la relación A_{260}/A_{280} . Luego, se visualizó el plásmido extraído en un gel de agarosa al 1,5% en tampón TBE (del inglés, *Tris/Borate/EDTA*) 0,5X teñido con el reactivo *Gel RedTM Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium). Basándose en este gel, se seleccionó una colonia la cual se replicó en un cultivo de 5 mL de LB con ampicilina y a las 24 h se escaló dicho cultivo, a uno de 100 mL de LB con ampicilina para su posterior congelación y obtención de mayor cantidad de ADN (*midi-prep*), utilizando el kit comercial *Nucleobond- XtraMidi Plus* (Macherey-Nagel). Para la criopreservación de bacterias transformadas con el plásmido pNF- κ B-hrGFP, se utilizó una mezcla de 88% caldo LB: 12% Glicerol.

3.5.2. Transfección de la línea celular Caco-2 con el plásmido pNF-κB-hrGFP

Con el fin de evaluar las eficiencias de transfección de distintos reactivos, se utilizó el plásmido pIRES2-AcGFP1 como reportero, debido a que permite analizar el porcentaje de células que expresan GFP sin necesidad de estimular las mismas, como sucede con el pNF-κB-hrGFP. Se evaluaron los reactivos transfectantes *Lipofectamine®2000* y *Lipofectamine®LTX* (Invitrogen) y PEI ramificado (Sigma). Se analizó la expresión de GFP por citometría de flujo luego de 48 h post transfección.

Para la generación de la línea celular reportera se realizaron distintas metodologías. Por un lado, se utilizaron dos reactivos transfectantes lipídicos, *Lipofectamine®2000* y *Lipofectamine®LTX*. Por otro lado, se realizó un protocolo de electroporación.

Utilizando el reactivo *Lipofectamine®2000*, un día previo a la transfección se plaquearon $1,25 \times 10^6$ células totales en una botella de 25 cm², para que las células se encuentren en un 80% de confluencia al momento de transfectar. Luego, se diluyeron 10 µg de ADN en 0,5 mL de *OptiMEM® I Reduced Serum Medium* y se mezcló suavemente. Posteriormente, se diluyeron 25 µL del reactivo *Lipofectamine®2000* previamente mezclado en 0,5 mL de *OptiMEM® I Reduced Serum Medium*. Se incubaron por 5 min a temperatura ambiente (TA). A continuación se combinó el ADN diluido con el reactivo transfectante diluido, se mezcló suavemente y se incubó por 20 min a TA. Finalmente, se realizó un cambio de medio a la botella con DMEM suplementado con 10% de SFB con un volumen final de 5 mL y se añadió la mezcla del complejo ADN:lípido (relación 1:2,5). Se incubó a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ por 18-48 h, cambiando el medio de cultivo luego de 4-6 h. Para las células transfectadas con el plásmido pNF-κB-hrGFP, transcurridas las 48 h se comenzó con el proceso de selección con higromicina por un período de dos meses. Al mismo tiempo que se comenzó con la selección, se analizó la eficiencia de transfección a través de la expresión de la proteína GFP. Para ello, se sembraron $1,25 \times 10^5$ células por pozo en una placa de 48 pozos y fueron estimuladas con la citoquina pro-inflamatoria TNF-α con una concentración de 50 ng/mL. Transcurridas 48 h, se analizó por citometría de flujo. Este estímulo fue el utilizado como estímulo pro-inflamatorio a lo largo de la investigación para evaluar la expresión de la proteína GFP.

El reactivo transfectante *Lipofectamine®LTX* requiere que el día previo a la transfección se siembren 4×10^5 células totales en una botella de 25 cm². La densidad celular estuvo en 50-80% al momento de la incorporación del ADN. Se diluyeron 5,0 µg de ADN en 1250 µL de *OptiMEM® I Reduced Serum Medium*. Se añadió 5µL del *PLUS™ Reagent* previamente mezclado, al ADN diluido, se mezcló suavemente y se incubó de 5-15 min a TA. Posteriormente, se diluyeron 12,5 µL de *Lipofectamine®LTX* (relación ADN:lípido 1:2,5) en la solución previa, se mezcló suavemente y se incubó por 25 min a TA para lograr la formación de complejos ADN:lípido. Se añadió esta solución a la botella y se completó con DMEM suplementado con 10% de SFB hasta alcanzar los 5 mL. Se incubó a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Para las células transfectadas con el plásmido

pNF- κ B-hrGFP, transcurridas las 48 h se comenzó con el proceso de selección con higromicina por un período de dos meses. Al mismo tiempo que se comenzó con la selección, se analizó la eficiencia de la transfección por citometría de flujo estimulando las células como se describió previamente.

La otra metodología utilizada, consistió en electroporar las células utilizando un electroporador. En este caso se utilizó el electroporador ECM® 830. Se tomaron 2×10^7 células totales, las mismas fueron lavadas con PBS 1X mediante centrifugación a 200g por 5 min. Se resuspendió el *pellet* celular en 0,5 mL de PBS 1X frío. Se añadió el volumen de ADN correspondiente a 20 μ g a la cubeta de electroporación, el mismo resuspendido en agua MiliQ. Luego se añadió la suspensión celular y se incubó en hielo durante 10 min. Se electroporó con las siguientes condiciones:

- ✓ Voltaje: 200 V
- ✓ Tiempo del pulso: 40 ms
- ✓ Número de pulsos: 2
- ✓ Intervalo entre pulsos: 100 ms
- ✓ *Polarity*: unipolar

Posteriormente, se incubaron las células por 5 min en hielo y se las transfirió a un tubo cónico que contenía 5 mL de medio de crecimiento (DMEM suplementado con 10% de SFB). Se centrifugó a 200 g por 5 min y se descartó el sobrenadante, resuspendiendo el *pellet* en medio DMEM suplementado con 10% de SFB y se sembraron en una botella de 25 cm², previamente habiendo realizado el recuento celular y determinación de la viabilidad.

Para la incorporación del plásmido utilizando PEI, se comenzó termostatazando PBS 1X a una temperatura de 25-37°C. Luego, se alicuotó 50 μ L y se le añadió 1,5 μ g de ADN. Por otro lado, se realizó una dilución 1:25 del PEI ramificado (1 mg/mL) en PBS 1X. Se añadió 50 μ L de dicha dilución a los 50 μ L de ADN (relación ADN:PEI es 1,5:2). Se homogeneizó inmediatamente y se incubó durante 15 min a TA. Luego se realizó un cambio de medio de cultivo a las células y se le agregaron 100 μ L de la solución ADN-PEI ramificado.

Además de ensayar distintas metodologías, se trabajó con el plásmido circular y con el plásmido linealizado. El mismo se linealizó con la enzima *NheI* de New England BioLabs (NEB). Se incubó por 3 h a TA, 28,4 μ g de plásmido circular con 10 μ L de la enzima *NheI* (10 U/ μ L), 5 μ L de BSA (100X), 50 μ L de NEBuffer 2 (10X) y el volumen necesario de agua MiliQ para alcanzar los 500 μ L.

Luego de realizada la digestión enzimática, se procedió a la purificación del plásmido linealizado con un kit comercial *ChargeSwitch®-Pro PCR Clean-Up Kit* (Life Technologies) siguiendo el protocolo sugerido por los proveedores.

3.5.3. Curva de sensibilidad al antibiótico de selección

Para determinar la mínima concentración citotóxica del antibiótico de selección (higromicina), se realizó una curva de sensibilidad. Para ello, en una placa de 24 pozos se sembraron 6×10^4 células por pozo. Se trabajó con un rango de 25-300 $\mu\text{g/mL}$ de higromicina y con un control sin el agregado del antibiótico. Luego de dos semanas de selección, se determinó la concentración mínima citotóxica.

3.5.4. Enriquecimiento celular

Luego de la selección con higromicina por un período de dos meses, se procedió a realizar un enriquecimiento de las células transfectadas. Para ello, se emplearon dos estrategias distintas utilizando el separador celular MoFlo Legacy (Beckman Coulter). La primera de ellas, constó en descartar las células que no expresan GFP en presencia del estímulo pro-inflamatorio. La otra metodología se basó en dos separaciones celulares sucesivas. Una primera separación se basó en la selección de células que no expresen GFP en ausencia de un estímulo pro-inflamatorio y, una segunda separación en donde se seleccionaron las células que expresan GFP en presencia del estímulo pro-inflamatorio. De esta manera, se logra reducir de manera estadísticamente significativa la expresión inespecífica de la proteína GFP (ruido o *background*).

Dependiendo de la estrategia, las células fueron previamente estimuladas con $\text{TNF-}\alpha$ (50 ng/mL) durante 24 h. En ambas metodologías se partió de una botella de 75 cm^2 , las células se tripsinizaron y se filtraron utilizando una malla de serigrafía (tamaño de poro: 50 μm). Luego se realizó el recuento celular y se determinó la viabilidad con Azul de Tripán. Las mismas se centrifugaron a 260g por 5 min y se resuspendieron en el volumen necesario para obtener una suspensión celular de 2×10^6 cél/mL. Se utilizaron células Caco-2 para realizar las configuraciones del equipo. Luego de realizada la separación, se realizó un recuento de las células obtenidas y se centrifugaron a 260g por 5 min. Se resuspendieron en el volumen adecuado de DMEM suplementado con 20% de SFB y 1% de P/E y fueron sembradas en el formato apropiado a la cantidad de células recuperadas.

3.5.5. Generación de clones

Una vez obtenido el *pool* de clones de la línea reportera Caco-2-pNF- κB -hrGFP, se procedió al aislamiento de clones individuales. En este caso, se ensayaron dos metodologías distintas. Una de ellas consistió en la clonación por el método de dilución límite (DL) (56) y la otra por *Single Cell Deposition* (SCD) utilizando el MoFlo Legacy (Beckman Coulter).

Para el método de DL, se comenzó filtrando la suspensión celular con una malla de serigrafía (tamaño de poro: 50 μm) luego se realizó un recuento celular determinando la viabilidad. Se

realizaron las diluciones pertinentes y se ajustó la concentración celular de manera de sembrar dos placas de 96 pocillos, una de ellas con 1 célula/pozo y la otra con 5 células/pozo. Se incubaron ambas placas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 15 días, renovando el medio de cultivo cada cuatro días con higromicina.

Para el método de SCD, se estimuló una placa de 6 pozos con TNF- α (50 ng/mL) 48 h previo a la separación celular. El día de la separación celular, se prepararon dos placas de 96 pozos con 100 μ L de medio que contenían una mezcla de medio condicionado: medio fresco (50:50), suplementado con 20% de SFB y 1% P/E. El medio condicionado es un medio DMEM suplementado con 10% SFB que estuvo en contacto con la línea celular parental, Caco-2, por lo que posee factores de crecimiento necesarios para el crecimiento celular. Luego de la preparación de las placas, se procedió a levantar las células con Tripsina-EDTA, filtrar con la malla de serigrafía y se realizó el recuento y determinación de viabilidad celular. Se ajustó la concentración celular a 1×10^6 cél/mL. Utilizando el separador celular, se dispensó una célula GFP⁺ (GFP positiva) por pozo en las placas previamente preparadas. Al día siguiente, se realizó un cambio de medio, y se agregó el antibiótico de selección, higromicina.

Se realizó un seguimiento de cada clon, verificando el crecimiento y una vez alcanzada la confluencia, fueron amplificados gradualmente (placas de 48, 24, 12, etc. pozos). Asimismo, se verificó que los mismos no expresaran la proteína GFP en ausencia del estímulo pro-inflamatorio utilizando el microscopio de epifluorescencia con el filtro de excitación para FITC (470-495 nm).

Una vez obtenidos los clones de la línea celular reportera, se procedió a realizar una caracterización preliminar de los mismos y así, seleccionar los mejores. Para ello, se estimularon los distintos clones con la citoquina TNF- α (50 ng/mL) y se evaluó por citometría de flujo el porcentaje de células GFP⁺ en células estimuladas. Como control de inespecificidad o *background* se determinó el porcentaje de células GFP⁺ en aquellas células sin estimular. De esta manera, se seleccionaron aquellos clones que presentaron un alto porcentaje de células GFP⁺ luego de ser estimuladas, con un bajo porcentaje de células GFP⁺ en células sin estimular.

3.6. Caracterización de las líneas celulares reporteras

Una vez seleccionados los clones de la línea celular Caco-2-pNF- κ B-hrGFP y con los clones de la línea HT-29-pNF- κ B-hrGFP, se realizó la caracterización de las mismas en lo que respecta a la cinética de respuesta frente al agregado de un estímulo pro-inflamatorio (TNF- α). Asimismo, se realizaron las curvas de dosis-respuesta frente a distintos estímulos (LPS, TNF- α e IL-1 β).

Para la cinética de respuesta frente a un estímulo pro-inflamatorio, se sembraron en una placa de 48 pozos, $2,5 \times 10^5$ células por pozo con medio DMEM suplementado con 10% de SFB para los clones de

la línea Caco-2-pNF- κ B-hrGFP y 1×10^4 células por pozo en una placa de 96 pocillos para los clones de la línea HT-29-pNF- κ B-hrGFP. Transcurridas 24 h se realizó la estimulación con la citoquina TNF- α (50 ng/mL) y durante 18, 24, 48, 72 y 96 h. Se analizó el porcentaje de células GFP⁺ utilizando el citómetro de flujo.

Se realizó la curva de dosis-respuesta frente a TNF- α , IL-1 β y LPS sembrando 48 h antes de la estimulación, $2,5 \times 10^5$ células por pozo en una placa de 48 pozos para los clones de la línea Caco-2-pNF- κ B-hrGFP. Para los clones de la línea HT-29-pNF- κ B-hrGFP se sembraron 1×10^4 células por pozo en una placa de 96 pocillos, 24 h previas a la estimulación. Luego, se adicionaron a las células TNF- α (0,05 – 100 ng/mL), IL-1 β (0,0016 – 10 ng/mL) o LPS (1 y 10 μ g/mL) (46).

Para la caracterización de las líneas celulares reporteras se trabajó con células sin estimular como control. Para el análisis, se restó el porcentaje de células GFP⁺ en células sin estimular, al porcentaje de células GFP⁺ en células estimuladas para cada hora y cada concentración de estímulo.

3.7. Polarización de la línea celular Caco-2-pNF- κ B-hrGFP

La línea celular Caco-2 tiene la capacidad de polarizarse, luego de alcanzada la confluencia, hacia un fenotipo similar al de los enterocitos del intestino delgado. Se realizó una cinética de polarización para determinar el tiempo óptimo en el cual las células se encuentran polarizadas.

3.7.1. Cinética de polarización

Para el estudio de la cinética de polarización se empleó la marcación de la actina con la sonda faloidina para poder evaluar por microscopía confocal la distribución de la misma durante la polarización.

En una placa de 12 pozos, se sembraron 5×10^5 células por pozo, conteniendo vidrios de 13 mm de diámetro. Luego de alcanzada la confluencia, se realizó la marcación de la actina en las células con *Texas Red®-X Phalloidin* (Invitrogen) a los 4, 7, 11, 14 y 19 días. Se utilizaron células no confluentes como control.

Brevemente, se retiró el medio de cultivo y se lavó dos veces con 200 μ L de PBS 1X. Posteriormente se fijaron las células con 4% de PFA por 10 min a TA y se permeabilizaron con PBS 1X-Tween 0,2% realizando dos a tres lavados por 5 min a TA. Para la marcación, se utilizó una dilución 1:100 de *Texas Red®-X Phalloidin* y se incubaron las células por media hora a TA. Luego se realizaron dos lavados con PBS 1X. Asimismo, se marcó el núcleo celular con la sonda DAPI, para lo cual, luego de la marcación de la actina, se procedió a incubar las células con una dilución 1:1000 de DAPI por 10

min a TA. Luego de la marcación, se procedió a montar el vidrio con las células en un porta objetos utilizando el reactivo *ProLong® Gold reagent* (Invitrogen). Los preparados se observaron luego de 24 h en el microscopio confocal utilizando los láseres 360-370 nm para DAPI y 530-550 nm para detectar la actina.

3.7.2. Caracterización preliminar de la línea Caco-2-pNF-κB-hrGFP polarizada

Se procedió a realizar una caracterización de la línea celular Caco-2-pNF-κB-hrGFP polarizada. En una placa de 48 pozos, se sembraron 8×10^4 células por pozo y se mantuvieron en cultivo durante 21 días realizando cambios de medio de cultivo cada dos días. Pasado este tiempo, las células fueron estimuladas durante 48 h con LPS (10 μg/mL), IL-1β (0,0016 ng/mL, 0,04 ng/mL, 1 ng/mL y 10 ng/mL) y TNF-α (0,05 ng/mL, 0,8 ng/mL, 12,5 ng/mL y 100 ng/mL). Finalmente, se evaluó la activación de NF-κB por citometría de flujo.

3.8. Evaluación preliminar de las líneas reporteras

Se desafió el sistema con agentes con propiedades inmunomoduladoras reportadas en otros modelos celulares, como ser un ácido graso y microorganismos. El ácido graso utilizado es un nitroalqueno derivado del ácido oleico, OA-NO₂ (*esterified nitrooleate*). Está reportado en la literatura que dicho ácido graso, es capaz de modular negativamente la activación del factor NF-κB en la línea celular de macrófagos murino RAW-264.7 (47).

Por otro lado, se desafiaron las células reporteras con microorganismos que presentan efectos inmunomoduladores reportados en células dendríticas, como ser *Lactobacillus reuteri* ATCC 23272 (57-60) y *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (58,61,62). Paralelamente, se ensayó la bacteria *Escherichia coli* DH5-α (sin capacidad inmunomoduladora reportada) como control negativo.

Para el compuesto lipídico, se realizó un ensayo en el que se sembraron en una placa de 96 pocillos 5×10^4 células por pozo para el clon de la línea HT-29-pNF-κB-hrGFP. Se realizó una pre-incubación de 2 h con el ácido graso (5 μM) en células sin estimular y estimuladas con TNF-α (3 ng/mL). Se evaluó la activación del factor de transcripción NF-κB a las 24 h por citometría de flujo.

Por otra parte, se sembraron en una placa de 48 pozos 1×10^5 células por pozo del clon de la línea Caco-2-pNF-κB-hrGFP. Se realizó una pre-incubación de 2 y 18 h con el ácido graso (5 μM) en células sin estimular y estimuladas con TNF-α (3 ng/mL). Se evaluó la activación del factor de transcripción NF-κB a las 48 h por citometría de flujo.

Se realizaron co-cultivos de las cepas bacterianas con la línea celular reportera Caco-2-pNF- κ B-hrGFP, sembrando 8×10^4 células por pozo en una placa de 48 pozos. Luego de 48 h, se realizó una pre-incubación de las células durante 2 h con las bacterias. Luego se adicionó el estímulo pro-inflamatorio y el antibiótico gentamicina para evitar el sobrecrecimiento bacteriano. Se evaluó la activación del factor de transcripción NF- κ B a través de la expresión de GFP, medida por citometría de flujo. Para ello, se realizaron dos subcultivos al 1% partiendo de las cepas congeladas utilizando el medio MRS para *L. reuteri* y *L. plantarum* (37°C, sin agitación) y TSB para *E. coli* DH5 α (37°C, 220 rpm). El día del co-cultivo, las bacterias fueron lavadas dos veces con PBS 1X (4000g por 5 min) y se midió la absorbancia a 570 nm utilizando el lector de placas de Elisa, Multiskan EX Microplate Photometer (Thermo Scientific). Luego, utilizando las curvas de correlación (Abs 570 nm vs. UFC/mL) de cada bacteria, se determinó la concentración de la suspensión bacteriana y se ajustó de manera de tener una relación bacteria: célula eucariota de 50:1, una MOI (del inglés, *Multiplicity of Infection*) de 50. Se incubaron por un período de dos horas sin antibiótico y posteriormente se adicionó gentamicina y TNF- α o IL-1 β , dependiendo del caso. Se incubaron por 48 h a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y se evaluó la expresión de la proteína GFP por citometría de flujo.

3.9. Análisis estadístico

Los datos se reportan como la media +/- el desvío estándar (SD). Cada condición fue realizada por triplicado, con la excepción de aquellos casos donde se especifiquen otras condiciones. Para la comparación entre distintos factores y su interacción, se utilizó el ANOVA bifactorial y para la comparación con un factor sólo y su control, se utilizó el análisis estadístico ANOVA unifactorial, asumiendo distribución normal. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas que presentaron un valor $P < 0.05$. Se trabajó con el *software* GraphPad Prism versión 5.01 demo para el análisis.

4. Resultados Obtenidos

4.1. Generación de la línea celular reportera Caco-2-pNF- κ B-hrGFP

4.1.1. Plásmido pNF- κ B-hrGFP

Para la amplificación del plásmido a utilizar, se transformaron bacterias *E.coli* DH5- α quimiocompetentes, tal como se describió en Metodología. Se seleccionaron cuatro colonias producto de la transformación y se realizó la purificación plasmídica de cada uno de ellos para confirmar la presencia del plásmido. Luego, se seleccionó un clon y se procedió a amplificarlo para obtener cantidad suficiente para su uso posterior. La concentración del plásmido obtenido luego de la purificación, fue de 2836 ng/ μ L.

Dado que el plásmido linealizado se integra de manera más eficiente al genoma celular que el plásmido circular, se realizó una linealización del mismo con la enzima *NheI*. Luego de la digestión y purificación a partir de un gel de agarosa, se obtuvo una concentración de 124 ng/ μ L. En la Figura 5 se observa que el plásmido linealizado presenta una mayor migración con respecto al circular y tiene el tamaño indicado (7,3 kilobases).

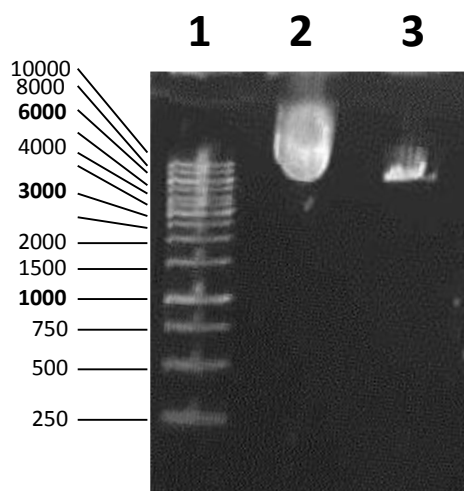


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa del plásmido pNF- κ B-hrGFP circular y linealizado. La linealización se realizó con la enzima *NheI* (NEB). Carril 1: Marcador de peso molecular GeneRuler™ de 1 kb (Fermentas - #SM0311). Carril 2: pNF- κ B-hrGFP circular. Carril 3: pNF- κ B-hrGFP linealizado.

4.1.2. Curva de sensibilidad al antibiótico de selección

Se estudió la sensibilidad de la línea parental Caco-2 a la higromicina en un rango de concentraciones de 25 – 300 µg/mL. Al cabo de dos semanas, se observó muerte total en las concentraciones mayores a 50 µg/mL. Por este motivo, se eligió 50 µg/mL para continuar con el trabajo.

4.1.3. Puesta a punto de las condiciones de transfección de la línea Caco-2

Con el fin de poner a punto las condiciones de transfección de la línea celular Caco-2, se utilizaron varios reactivos transfectantes y el plásmido pIRES2-AcGFP1, el cual posee el gen de la proteína GFP como reportera y la ventaja que la expresión de GFP es constitutiva. Se utilizaron tres reactivos transfectantes, PEI, *Lipofectamine®2000* y *Lipofectamine®LTX*, con una relación ADN:lípido 1:2,5. Se evaluó la eficiencia de transfección por citometría de flujo luego de 48 h (Figura 6). Para el caso de PEI se obtuvo un 2% de células GFP⁺ y un 6% para *Lipofectamine®2000*. La mayor eficiencia se logró con el reactivo *Lipofectamine®LTX*, la cual fue de un 15%. Sin embargo, con este reactivo se observó una mayor toxicidad celular (25%), comparando con el reactivo PEI (5%) y *Lipofectamine®2000* (10%).

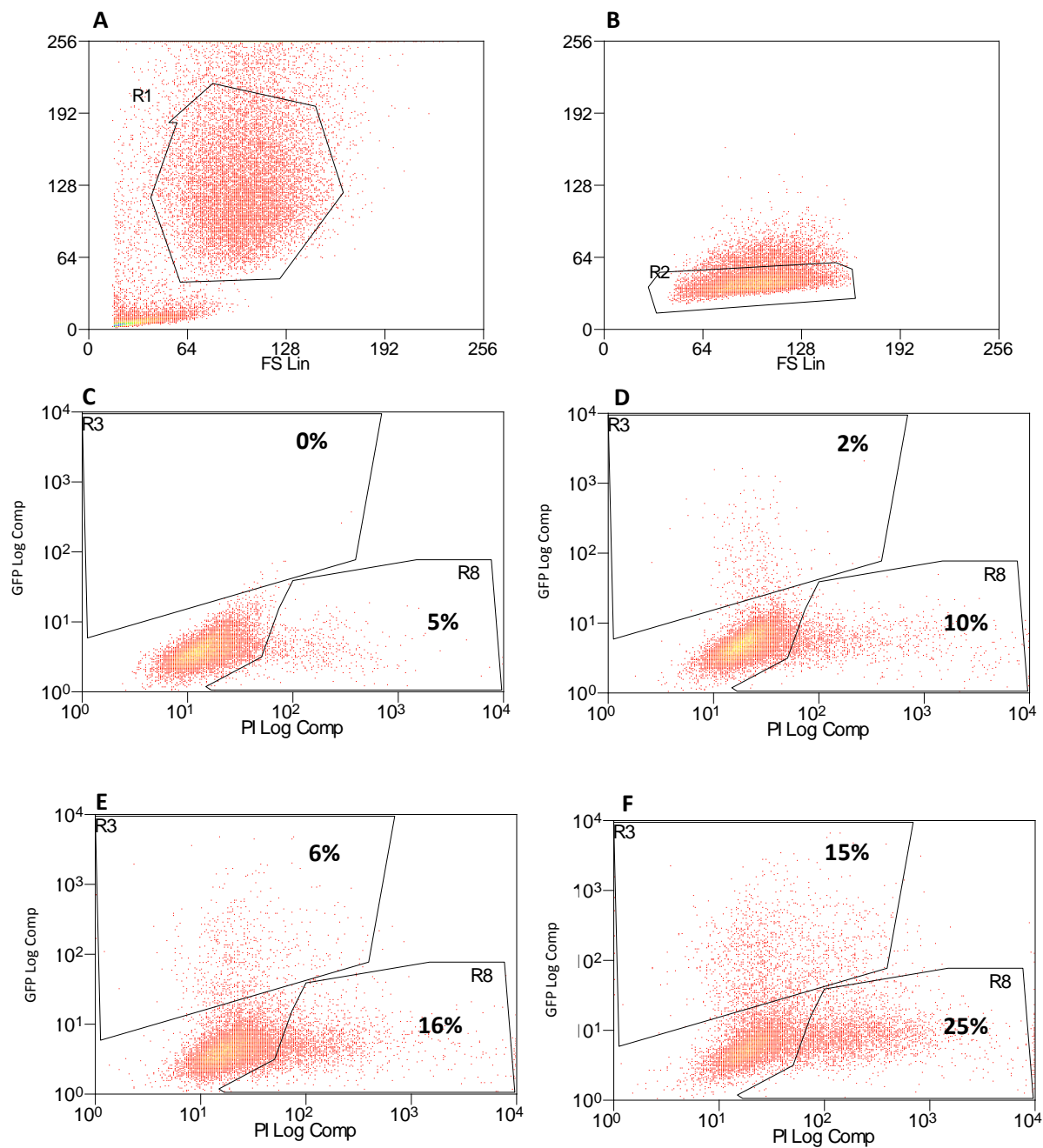


Figura 6. Comparación de distintos reactivos transfectantes en células Caco-2 con el plásmido pIRES2-AcGFP1. Gráfico de SSC vs FSC (A) y Ancho de pulso (*Pulse Width*) vs FSC (B) con las regiones R1 y R2 de interés. Gráfico de puntos indicando la expresión de GFP vs PI de la población de interés (C, D, E y F). La región R3 corresponde a las células vivas GFP⁺ y la R8 a las células no viables en la población seleccionada. (C) Células sin transfectar. Células transfectadas con: PEI (D), *Lipofectamine@2000* (E) y *Lipofectamine@LTX* (F).

4.1.4. Transfección de la línea Caco-2 con el plásmido pNF- κ B-hrGFP

Debido a que de los tres reactivos transfectantes utilizados, el reactivo *Lipofectamine*[®]*LTX* fue el que mostró una mayor eficiencia de transfección transitoria. Se continuó trabajando con él para obtener la línea estable Caco-2-pNF- κ B-hrGFP. Se realizó una transfección con el plásmido lineal y otra con el plásmido circular, y 48 h post-transfección se comenzó con el proceso de selección con higromicina, a una concentración de 50 μ g/mL. Luego de dos meses de selección, se evaluó el porcentaje de células GFP⁺ frente a los estímulos pro-inflamatorios TNF- α e IL-1 β .

En la Figura 7 se muestran los resultados obtenidos para ambas transfecciones luego del período de selección. Cuando se utilizó el plásmido circular, un 20% de células expresaron GFP en respuesta al estímulo, con un 5% de señal inespecífica (células sin estimular). Por otro lado, la transfección con el plásmido lineal, mostró un 37% de células GFP⁺, sin embargo, se observó un 13% de expresión de GFP en las células sin estimular. Estos resultados muestran que la incorporación del plásmido lineal al genoma celular fue más eficiente.

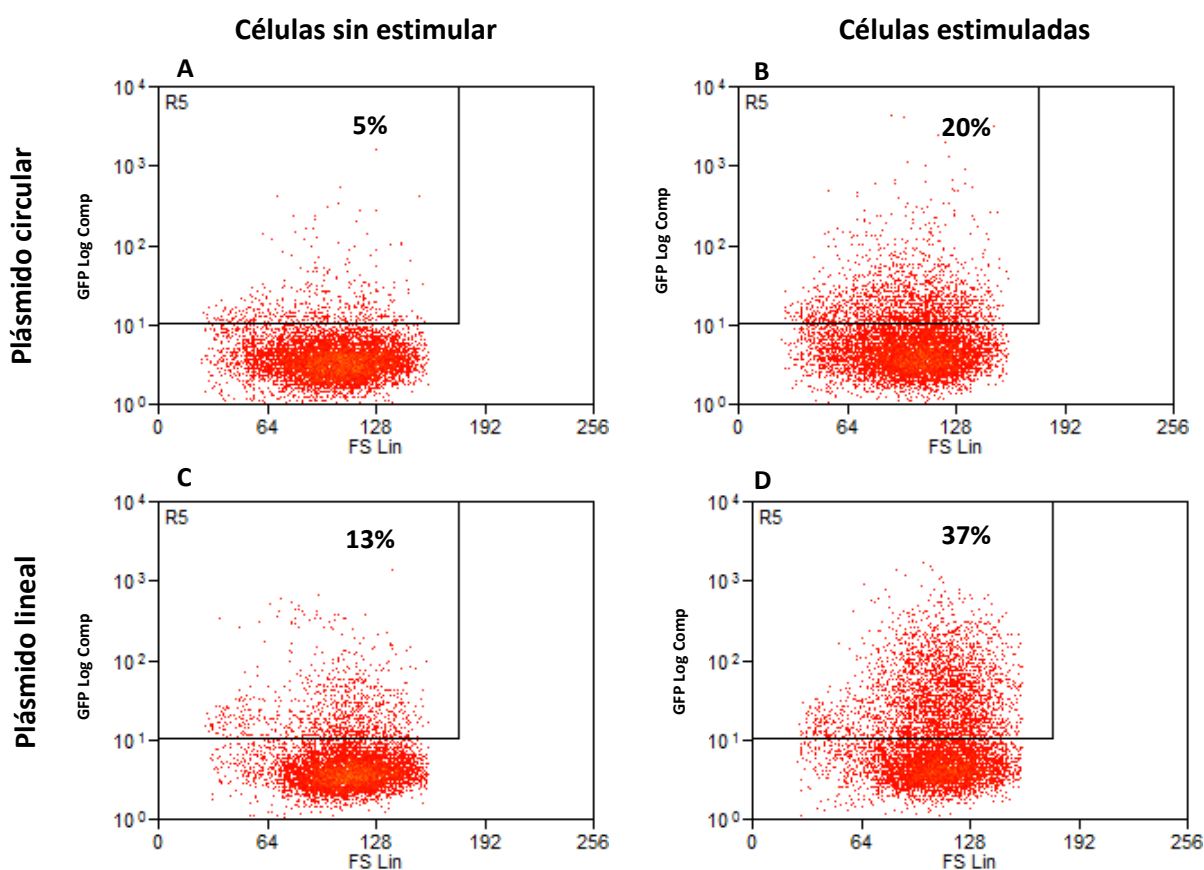


Figura 7. Comparación de líneas celulares generadas empleando *Lipofectamine*[®]*LTX* y el plásmido circular (A, B) o linealizado (C, D). Gráfico de puntos indicando la expresión de GFP en función del tamaño celular de la población de interés. Células sin estimular (A, C). Células estimuladas con TNF- α (50 ng/mL) e IL-1 β (25 ng/mL) (B, D).

Con el objetivo de aumentar el porcentaje de células que respondan al estímulo y lograr disminuir el porcentaje de señal inespecífica, se empleó la electroporación como técnica para la incorporación del ADN plasmídico. Se comenzó con el proceso de selección cinco días post-incorporación del ADN plasmídico y se continuó por un mes. En este caso, se obtuvo un 21% de células GFP⁺ luego de ser estimuladas, con un 3,5% de señal inespecífica (Figura 8).

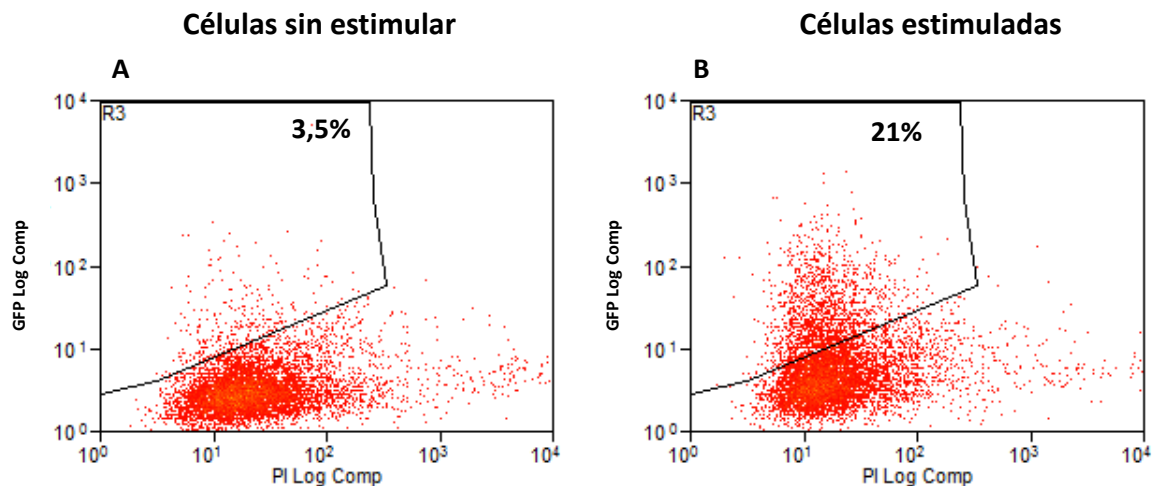


Figura 8. Línea celular generada empleando electroporación y el plásmido circular. Gráfico de puntos indicando la expresión de GFP en función de la marcación de PI de la población de interés. Células sin estimular (A). Células estimuladas con TNF- α (50 ng/mL) e IL-1 β (25 ng/mL) (B).

4.1.5. Enriquecimiento celular y generación de clones

Con el objetivo de aumentar el porcentaje de células que responden a los estímulos pro-inflamatorios utilizados (medida por la expresión de GFP) se realizaron distintas metodologías de enriquecimiento celular utilizando un separador celular. Una de ellas se basó en descartar las células que no expresaron GFP luego de recibir el estímulo pro-inflamatorio. Esta aproximación se utilizó en las células transfectadas con el plásmido circular. La otra metodología, constó en dos separaciones celulares sucesivas. Una primera separación, se basó en la selección de células que no expresaron GFP en ausencia de un estímulo pro-inflamatorio y una segunda separación, donde se seleccionaron aquellas células que expresaron GFP en presencia del estímulo pro-inflamatorio. De esta manera, se logra reducir de manera estadísticamente significativa la expresión inespecífica de la proteína GFP. Esta estrategia se utilizó para las células transfectadas con el plásmido lineal.

4.1.5.1. Transfección con el plásmido circular

Las células transfectadas con el plásmido circular, fueron enriquecidas mediante el criterio de expresión de GFP en presencia del estímulo pro-inflamatorio. Éstas fueron posteriormente amplificadas y congeladas. Una vez que se contó con el *pool* de clones, se procedió a realizar la SCD para la generación de clones dispensando una célula por pozo utilizando el separador celular MoFlo

Legacy. Esta metodología realiza la deposición de una célula por pozo en una placa de 96 pocillos. Como criterio de selección, se empleó la región que contenía a las células que expresaron GFP luego de ser estimuladas. Las células así sembradas, fueron crecidas y amplificadas gradualmente a los formatos de placa más grandes, hasta alcanzar el formato de botella de 25 cm² y realizando los cambios de medio necesarios. Una vez alcanzada dicha escala, se procedió a criopreservar cada clon y a evaluar individualmente su capacidad de respuesta por citometría de flujo.

De la placa de 96 pocillos, se lograron amplificar a un formato de 48 pozos, 10 clones. Sin embargo, de esos 10 clones, se lograron criopreservar únicamente cuatro clones (Tabla 1). Durante el proceso de amplificación se evaluaron por citometría de flujo dichos clones (sin estimular) y se continuó trabajando con aquellos que no expresaban GFP en ausencia del estímulo pro-inflamatorio o lo hacían en proporciones muy bajas.

4.1.5.2. Transfección con el plásmido linealizado

Por otro lado, se realizó el enriquecimiento de la línea celular transfectada con el plásmido linealizado. Debido al alto porcentaje de células con señal inespecífica, se optó por comenzar realizando un *sorting* en donde la población de interés fueron las células negativas, aquellas que en ausencia del estímulo pro-inflamatorio no expresaron GFP. Previo al *sorting*, un 11% de células expresaban GFP en ausencia del estímulo (Figura 9A). Luego del enriquecimiento, ese porcentaje de inespecificidad disminuyó a un 0,1% (Figura 9B).

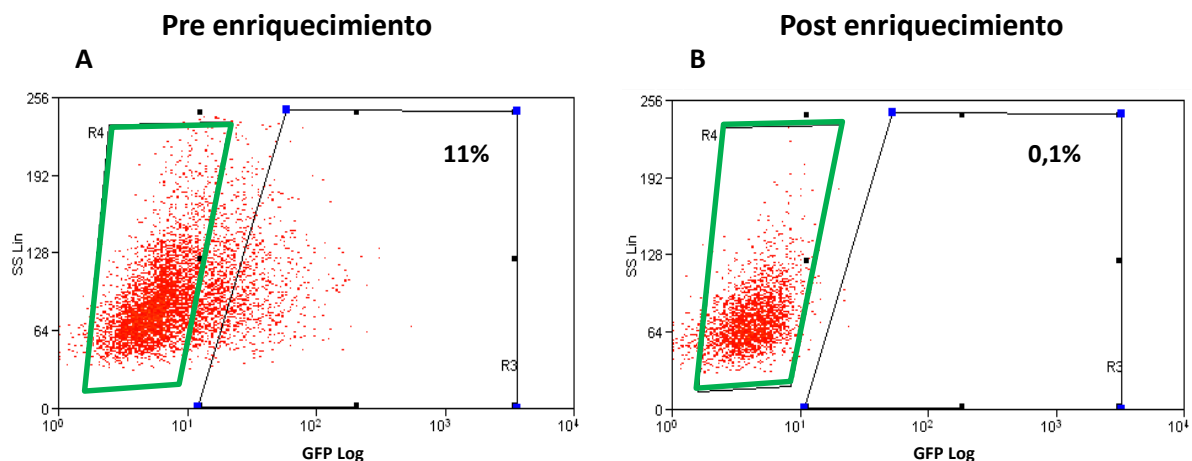


Figura 9. Primer enriquecimiento celular de la línea Caco-2-pNF-κB-hrGFP transfectada con el plásmido lineal. Se realizó un enriquecimiento de la fracción celular que no expresa GFP en ausencia de los estímulos pro-inflamatorios. Gráfico de puntos de la complejidad celular (SS Lin) en función de la expresión de GFP. (A) Pre enriquecimiento. (B) Post enriquecimiento. El recuadro verde indica la fracción celular que fue enriquecida.

Estas células fueron amplificadas y criopreservadas. Luego de unas semanas en cultivo, se realizó una estimulación de las células con TNF- α durante 48 h y posteriormente se enriqueció la población que respondió (GFP⁺, 13%). Debido a que la recuperación que se obtuvo luego de la separación celular fue muy baja, no fue posible determinar la pureza de la población *post-sorting*.

Luego de realizados los dos enriquecimientos (*pool* de clones), los clones fueron amplificadas y criopreservadas. Posteriormente, se estudió la activación de NF- κ B realizando una estimulación con el estímulo pro-inflamatorio TNF- α . Luego de 48 h se evaluó por citometría de flujo su respuesta utilizando PI para determinar viabilidad celular. Como se muestra en la Figura 10, en ausencia del estímulo se observó un 5% de células GFP⁺ mientras que en las células que fueron estimuladas se observó un 50%. El aumento en la señal inespecífica en comparación con el valor obtenido luego del sorting (0,1%) puede deberse a que se trabajó con un *pool* de clones que durante el proceso de amplificación pudo haber sobrecrecido una población con mayor señal inespecífica.

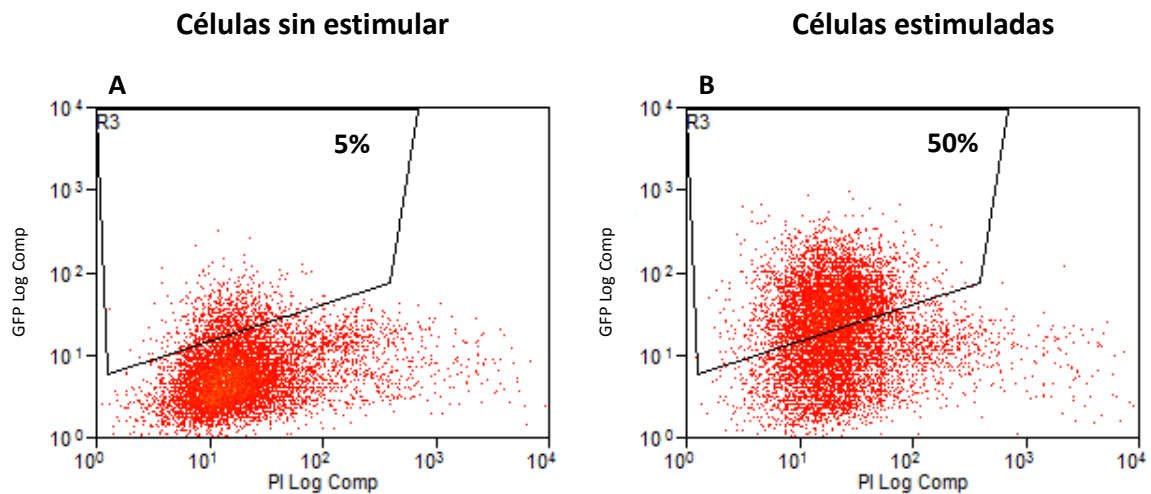


Figura 10. Análisis de la línea celular Caco-2-pNF- κ B-hrGFP transfectada con el plásmido linealizado luego de los dos enriquecimientos. Gráfico de puntos indicando la expresión de GFP en función de la marcación con PI de la población de interés. (A) Células sin estimular. (B) Células estimuladas con TNF- α (50 ng/mL).

En la Figura 11 se muestra una comparación entre las células Caco-2-pNF- κ B-hrGFP transfectadas con el plásmido linealizado luego de realizar los dos enriquecimientos celulares sucesivos. Las células fueron evaluadas en presencia/ausencia del estímulo pro-inflamatorio (TNF- α). Se logró reducir el porcentaje de GFP inespecífico (de 18% a 5%), así como se consiguió aumentar la cantidad de células que responden al estímulo (50% frente a 45%) (Figura 11B). Asimismo, en las células estimuladas se observaron dos poblaciones con una intensidad de fluorescencia correspondiente a una expresión de GFP más homogénea. Cabe destacar que la señal específica de GFP (diferencia entre porcentaje de células GFP (+) en presencia del estímulo y en ausencia del estímulo), se amplió luego del enriquecimiento (45% contra 27%), lo que brinda un mayor rango dinámico de trabajo.

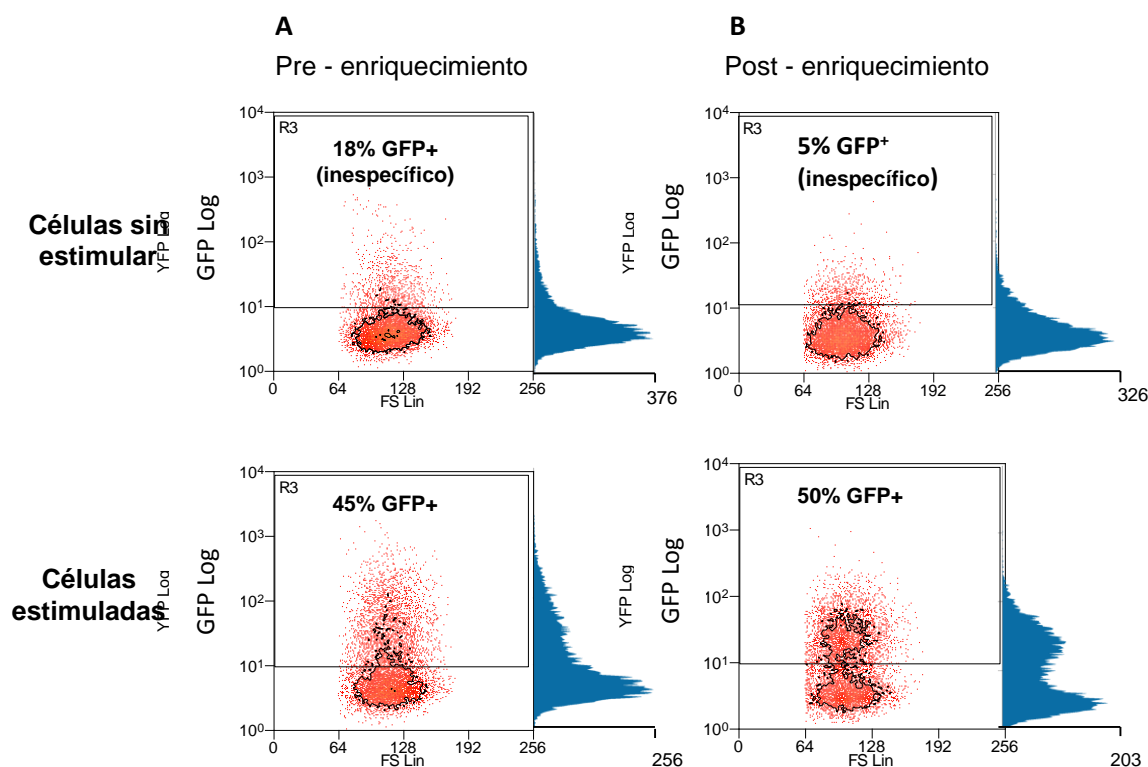


Figura 11. Comparación entre la capacidad de respuesta de las células Caco-2-pNF- κ B-hrGFP previo (A) y luego de ambos enriquecimientos celulares (B). Las células fueron estimuladas con TNF- α , 50 ng/mL por 48 h y posteriormente evaluadas por citometría de flujo. Los gráficos de puntos representan fluorescencia de GFP (GFP Log) en función del tamaño celular (FS Lin). El histograma indica la frecuencia para cada valor de intensidad de fluorescencia de GFP.

Luego de ambas separaciones celulares, se procedió a la generación de clones por el método de DL. Considerando que esta metodología presenta una baja eficiencia y tiene un elevado error asociado, debido al recuento celular y a las altas diluciones, se realizó una placa sembrando 1 célula/pozo y otra de 5 células/pozo. Transcurridas dos semanas, se observaron ambas placas al microscopio y se seleccionaron para continuar trabajando, únicamente aquellos pozos que contenían una única célula.

De la clonación por DL de 5 células/pozo se lograron amplificar desde la placa de 96 pocillos a una de 48 pozos, nueve clones. Sin embargo, cuatro de ellos no respondieron frente a los estímulos pro-inflamatorios. Por lo que finalmente se obtuvieron cinco clones (Tabla 1) los cuales fueron criopreservados.

Por otro lado, de la clonación por DL con 1 célula/pozo lograron alcanzar el formato de 48 pozos, 12 clones. Sin embargo, siete de ellos detuvieron su crecimiento y no fue posible expandirlos a partir de este formato, por lo que se continuó trabajando con los restantes clones. Estos cinco clones (Tabla 1) fueron evaluados por citometría de flujo y criopreservados.

4.1.5.3. Electroporación

Las células que fueron electroporadas se estimularon con TNF- α e IL-1 β y a las 48 h se realizó el enriquecimiento celular. Se logró determinar la pureza, y así, la eficiencia del *sorting*. Previo al enriquecimiento había un 7% de células que respondieron al estímulo (GFP⁺), y luego de enriquecer ese porcentaje aumentó a un 92% (Figura 12). Sin embargo, en los subsecuentes pasos de amplificación estas células no prosperaron y murieron.

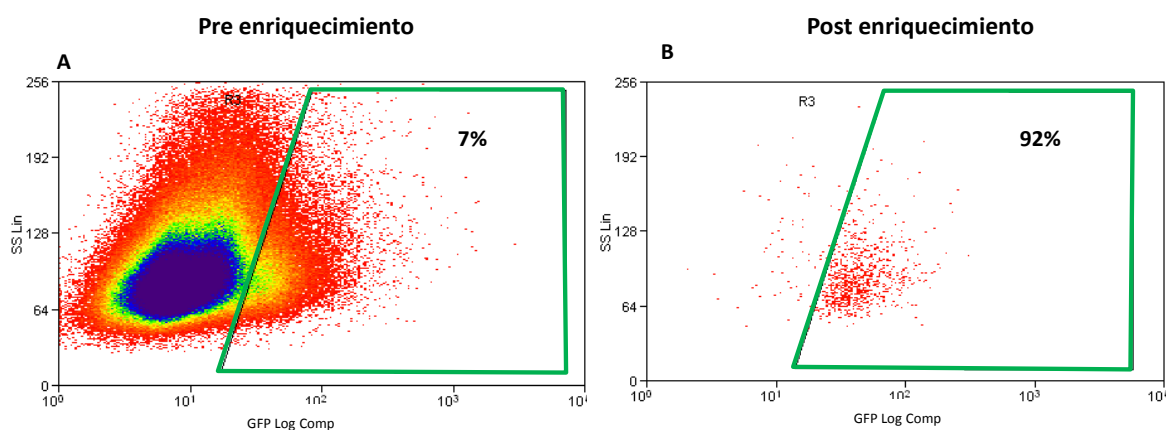


Figura 122. Enriquecimiento celular de la línea Caco-2-pNF- κ B-hrGFP obtenida por electroporación con el plásmido circular. Las mismas fueron estimuladas con TNF- α (50 ng/mL) e IL-1 β (25 ng/mL) y a las 48 h, se realizó el enriquecimiento. Gráfico de puntos de la complejidad celular (SS Lin) en función de la expresión de GFP. Previo al enriquecimiento (A) y post-enriquecimiento (B). El recuadro verde indica la fracción celular que fue enriquecida.

4.1.6. Selección de clones

Para la elección de los mejores clones se consideraron los siguientes parámetros: porcentaje de expresión de GFP inespecífico, porcentaje de expresión de GFP en respuesta al estímulo pro-inflamatorio y la diferencia entre ambos (señal específica). Asimismo, se tuvo en cuenta su velocidad de crecimiento. En la Tabla 1 se muestra un resumen de los clones obtenidos con las distintas metodologías y se resaltan en gris aquellos que fueron seleccionados para continuar con los estudios de caracterización.

Se observó que aquellos clones que se obtuvieron a partir de las dos separaciones celulares sucesivas, presentaron menor porcentaje de expresión inespecífica de GFP. Se eligieron los clones C3 y D5 (obtenidos a partir de la estrategia de clonación por DL, 1 célula/pozo), C2 (obtenido sembrando 5 células/pozo) y C3 (aislado mediante el método de SCD).

Tabla 1. Resumen de los 14 clones estudiados, obtenidos a partir de las diferentes metodologías de clonado. Se muestra el porcentaje de células GFP⁺ en ausencia y presencia del estímulo y la diferencia entre ambos (señal específica). Los clones resaltados en gris son los que fueron seleccionados.

Clon	% de células GFP ⁺		Señal específica
	Sin estímulo	Con estímulo	
Dilución Límite (1 célula/pozo)			
C3	20,5	77,4	56,9
D5	15,9	61,2	45,3
F2	17,5	50,6	33,1
B10	1,8	10,3	8,5
C2	3,9	31,5	27,6
Dilución Límite (5 células/pozo)			
E2	9,0	25,0	16,0
C2	6,3	49,1	42,8
D4	1,7	17,6	15,9
E3	13,1	38,4	25,3
E7	10,6	33,4	22,8
Single Cell Deposition			
C3	14,4	73,7	59,3
D3	39,7	79,2	39,5
B8	46,0	83,7	37,7
E2	33,8	80,9	47,1

Los cuatro clones seleccionados fueron evaluados nuevamente en simultáneo. En la Figura 13, se pueden observar los gráficos de citometría de flujo obtenidos para estos cuatro clones. En todos los casos, el porcentaje de expresión inespecífica de GFP fue menor a 10%. La expresión específica de GFP fue similar o superior a la obtenida en el ensayo resumido en la Tabla 1 (D5 DL, C2 DL y C3 SCD). Particularmente, para el clon C3 DL se obtuvo un elevado porcentaje de células muertas con la consecuente disminución en la expresión específica de GFP (de 56,9% a 39%). Basándonos en esta evaluación, se decidió seguir trabajando con el clon C3 SCD y el clon D5 DL de 1 célula/pozo, dado que existe una mayor probabilidad que haya derivado de una única célula (clonalidad segura), y además la señal inespecífica que este mostró fue baja (15,9%).

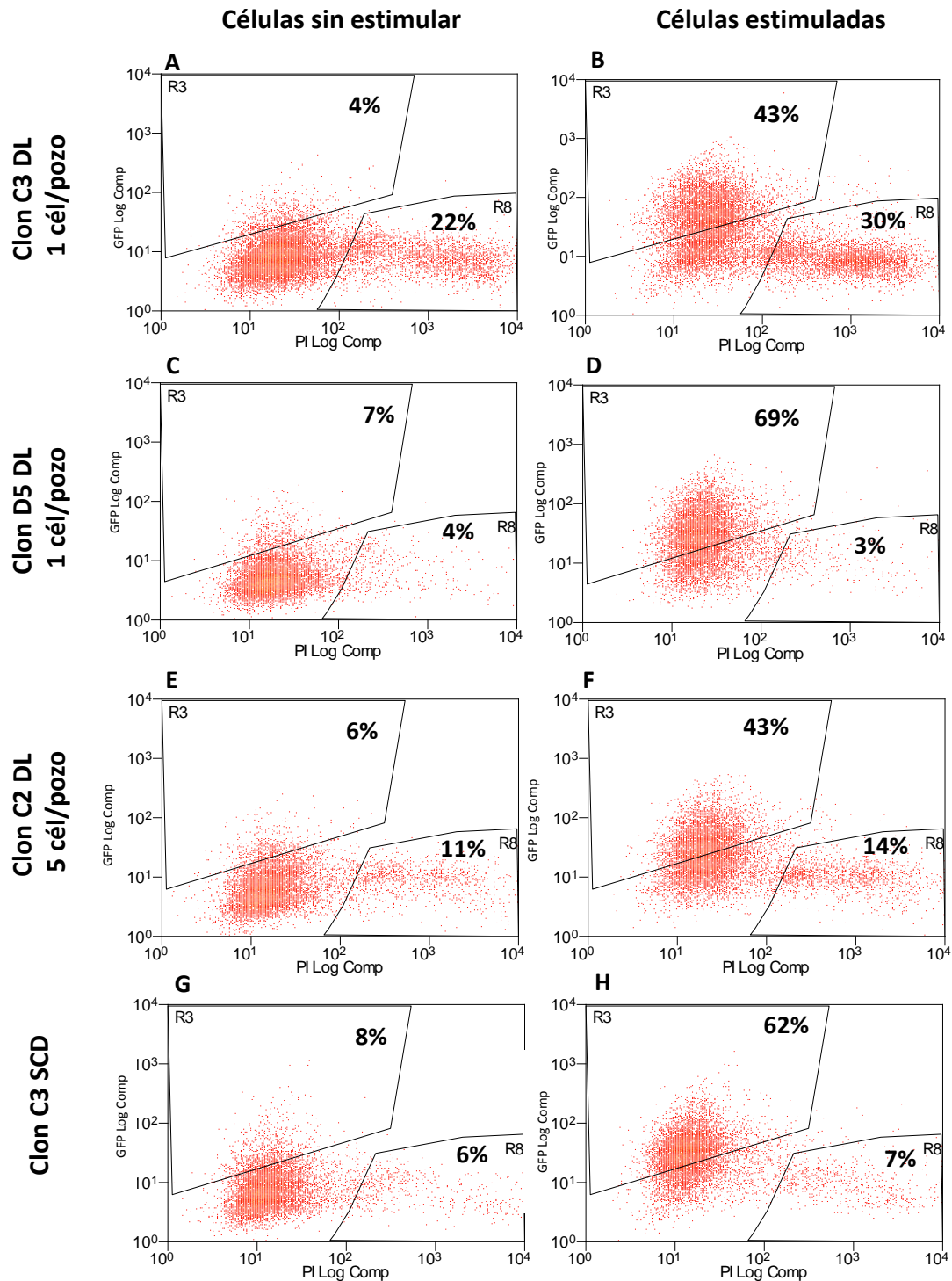


Figura 13. Análisis comparativo de la capacidad de respuesta frente al estímulo de los cuatro clones seleccionados. Gráfico de puntos indicando la expresión de GFP en función de la marcación con PI de la población de interés. La región R3 corresponde a las células vivas GFP⁺ en la población estudiada y la R8 a las células no viables. Células sin estimular (A, C, E, G) y células estimuladas con TNF- α (50 ng/mL) (B, D, F, H). Clon C3 DL 1 cél/pozo (A, B). Clon D5 DL 1 cél/pozo (C, D). Clon C2 DL 5 cél/pozo (E, F). Clon C3 SCD (G, H).

4.2. Caracterización de la línea celular reportera Caco-2-pNF- κ B-hrGFP

4.2.1. Caracterización del pool de clones

Como primera instancia de caracterización se estudió el *pool* de clones de la línea Caco-2-pNF- κ B-hrGFP mientras se generaban y amplificaban los clones individuales. Se evaluó la cinética de respuesta frente al estímulo pro-inflamatorio TNF- α a distintos tiempos (3, 18, 24 y 48 h). Como se observa en la Figura 14, a partir de las 18 h se evidencia un aumento en el porcentaje de células GFP⁺ el cual continuó aumentando hasta las 48 h. Se seleccionó el tiempo de 48 h para utilizar en los siguientes ensayos. Sin embargo, al no haber evaluado tiempos posteriores no podemos afirmar si el porcentaje de células GFP⁺ continúa aumentando o si se mantiene constante.

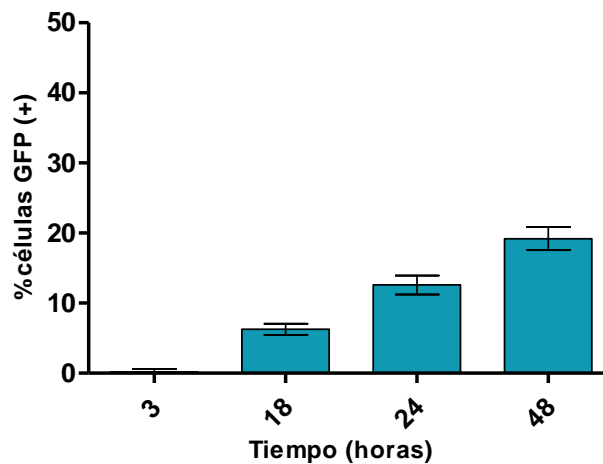


Figura 14. Cinética de activación de NF- κ B del *pool* de clones de la línea Caco-2-pNF- κ B-hrGFP. Las células fueron expuestas a un estímulo pro-inflamatorio (50 ng/mL de TNF- α) y se evaluó la expresión de GFP por citometría de flujo a diferentes tiempos post-estimulación (3, 18, 24 y 48 h).

Posteriormente, se procedió a realizar las curvas de dosis-respuesta luego de exponer a las células durante 48 h a los estímulos: TNF- α (0,4 – 50 ng/mL), IL-1 β (0,008 – 5 ng/mL) y LPS (1 y 10 μ g/mL). En la Figura 15 se muestran las curvas de dosis-respuesta de TNF- α y de IL-1 β . Se observa que el porcentaje de células GFP⁺ aumenta a medida que aumenta la concentración de TNF- α , no habiéndose alcanzado la concentración de saturación en las condiciones ensayadas (Figura 15A). Para el estímulo IL-1 β , se alcanzó el máximo porcentaje de células que expresan GFP a la concentración de 1 ng/mL (Figura 15B). Para el caso de LPS se logró una baja activación del factor de transcripción NF- κ B a las dos concentraciones evaluadas en comparación con los otros estímulos empleados (Figura 16). Sin embargo, la diferencia es estadísticamente significativa.

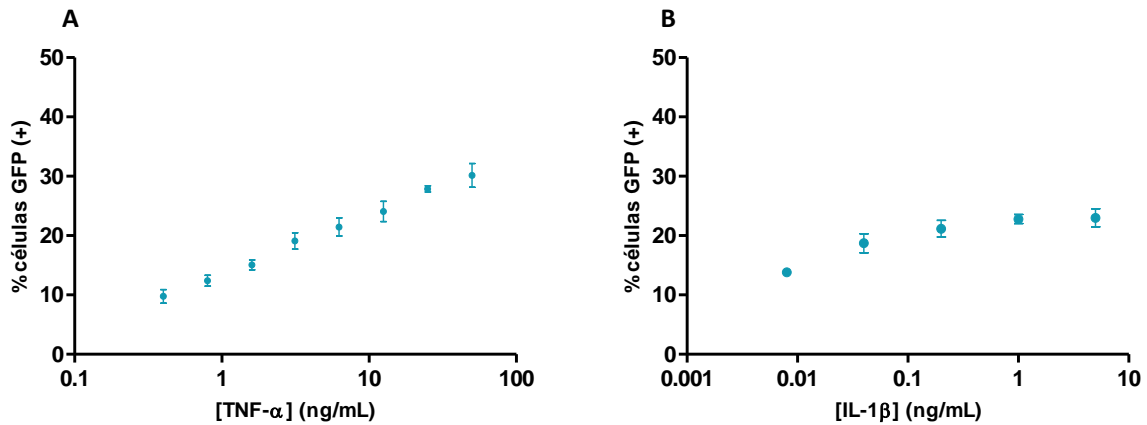


Figura 15. Curva dosis-respuesta frente a TNF- α (A) e IL-1 β (B) del *pool* de clones de la línea Caco-2-pNF- κ B-hrGFP. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de TNF- α (0,4 – 50 ng/mL) y de IL-1 β (0,008 – 5 ng/mL). Se evaluó la expresión de GFP por citometría de flujo a las 48 h.

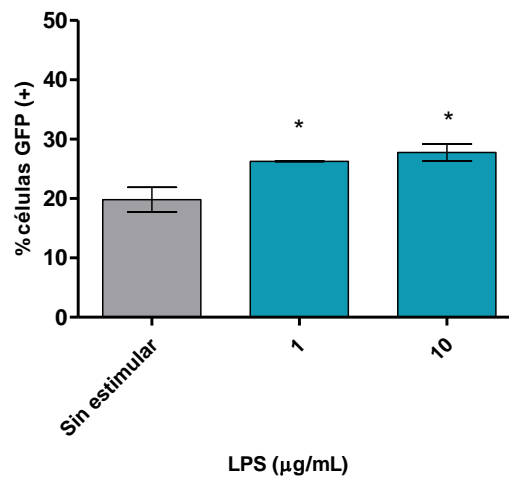


Figura 163. Curva dosis-respuesta frente a LPS del *pool* de clones de la línea Caco-2-pNF- κ B-hrGFP. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de LPS (1 y 10 μ g/mL) y se evaluó la expresión de GFP por citometría de flujo a las 48 h. *: aumento estadísticamente significativo respecto al control sin estimular. $p < 0,05$.

4.2.2. Caracterización de los clones de Caco-2-pNF- κ B-hrGFP

Una vez obtenidos y seleccionados los clones de Caco-2-pNF- κ B-hrGFP se realizó la caracterización de los mismos. Se trabajó por un lado con el clon D5 proveniente de la transfección con el plásmido linealizado y su obtención a partir del método de DL de 1 célula/pozo, y por otro lado con el clon C3 proveniente de la transfección con el plásmido circular y la generación del mismo por el método de SCD.

Se comenzó estudiando la cinética de respuesta frente al estímulo TNF- α analizando a diferentes tiempos (18, 24, 48, 72, 96 y 144 h); (Figura 17). Para el clon C3 SCD se observó expresión de GFP a partir de las 18 h, siendo el máximo porcentaje de expresión a las 96 h. Para el clon D5 DL se

observó un aumento de GFP conforme transcurre el tiempo, detectándose la mayor expresión a las 144 h. A las 48 h ambos clones mostraron un alto porcentaje de células que expresan GFP ($72 \pm 1,0$ % clon C3 SCD y $39 \pm 0,3$ % clon D5 DL, $p < 0,05$). Considerando que se planea utilizar este sistema como herramienta de *screening*, es importante que el ensayo sea lo más corto posible y permita notar diferencias entre las condiciones control y estimulado. Es interesante notar que el clon C3 SCD no sólo presentó un mayor porcentaje de células GFP⁺, sino que también a las 48 h presentó una MIF mayor que el clon D5 DL ($41 \pm 0,9$ vs $24 \pm 0,8$, $p < 0,05$).

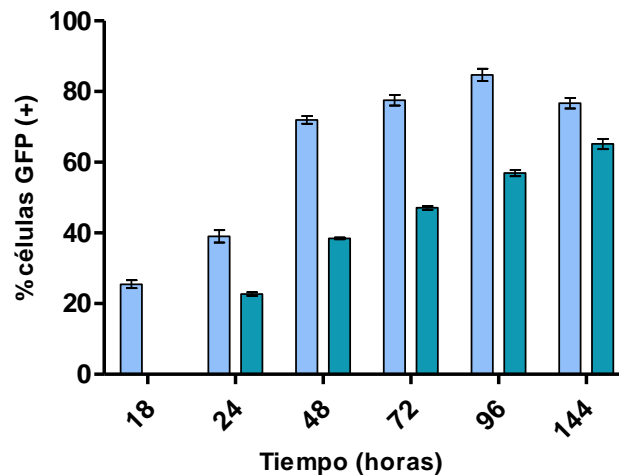


Figura 17. Cinética de activación de NF- κ B mediada por TNF- α evaluada por la expresión de GFP del clon C3 SCD (celeste) y del clon D5 DL (azul) de la línea reportera Caco-2-pNF- κ B-hrGFP. Las células fueron expuestas a un estímulo pro-inflamatorio (50 ng/mL de TNF- α). Se evaluó la expresión de GFP por citometría de flujo a diferentes tiempos post-estimulación (18, 24, 48, 72, 96 y 144 h). No se registró el valor correspondiente al clon D5 DL a las 18 h.

Paso seguido se realizaron las curvas de dosis-respuesta frente a TNF- α (0,05 – 100 ng/mL) (Figura 18A) e IL-1 β (0,0016 – 10 ng/mL) (Figura 18B), evaluando la expresión de GFP a las 48 h por citometría de flujo. Para el estímulo TNF- α se observó una respuesta diferencial, la cual fue dosis-dependiente. Se pudo determinar la dosis del estímulo que produce el equivalente al 50% de la respuesta máxima (IC50) obtenida para ambos clones. Para el clon D5 DL fue de 10 ng/mL, mientras que para el clon C3 SCD fue de 5 ng/mL. El clon C3 SCD presentó una mayor respuesta que el clon D5 DL frente a la misma concentración de estímulo. Por otro lado, frente al estímulo IL-1 β , se observó que ambos clones respondieron de forma dosis-dependiente con igual sensibilidad (misma pendiente en la gráfica), siendo la IC50 igual a 0,2 ng/mL para ambos clones.

Debido a que el clon C3 SCD presentó un máximo de expresión a las 48 h y el clon D5 DL a las 144 h, se optó por evaluar la respuesta frente a LPS (1 y 10 μ g/mL) únicamente con el clon C3 SCD. Si bien el porcentaje de señal específica obtenido fue muy bajo ($6,4 \pm 0,8$ % y $6,7 \pm 0,2$ % con un $p < 0,05$ para 1 y 10 μ g/mL, respectivamente) en comparación con los otros estímulos ensayados, esta respuesta fue estadísticamente significativa.

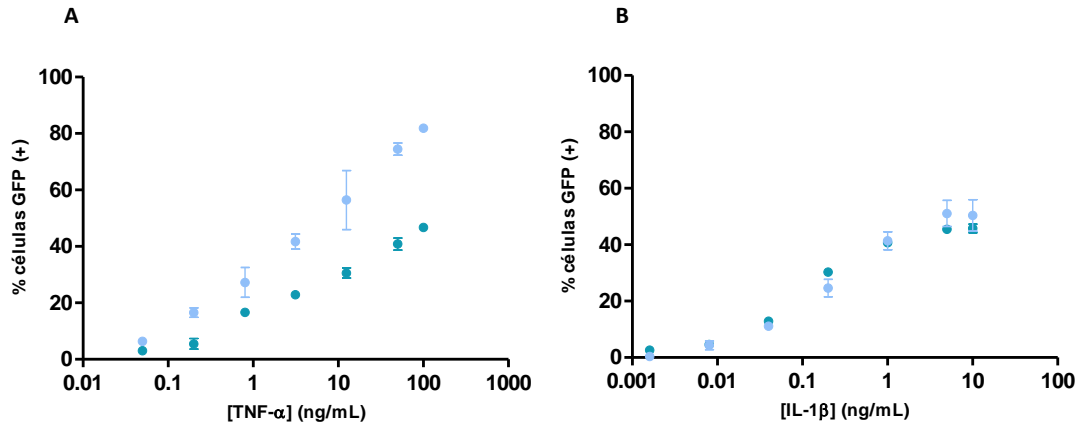


Figura 18. Curva dosis-respuesta frente a TNF- α (A) y frente a IL-1 β (B) del clon C3 SCD (celeste) y del clon D5 DL (azul). Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de TNF- α (0,05 – 100 ng/mL) y de IL-1 β (0,0016 – 10 ng/mL). Se evaluó la expresión de GFP por citometría de flujo a las 48 h.

4.3. Polarización de la línea celular Caco-2-pNF- κ B-hrGFP

Una ventaja de la línea celular Caco-2 es que puede polarizarse presentando características similares a los enterocitos, como ser borde en cepillo y ubicación basal del núcleo. Para evaluar la polarización, se utilizó la marcación de actina para ver su distribución en las células y además una marcación nuclear.

Se realizó la tinción de las células a los 4, 7, 11, 14 y 19 días post-confluencia. Se visualizaron en el microscopio confocal y se obtuvieron imágenes en distintos planos Z. En la Figura 19 se muestran las células sin polarizar y las células polarizadas transcurridos los 19 días post-confluencia. Se observa la distribución de actina y la localización del núcleo en las células sin polarizar (Figura 19A) y en la región basal (Figura 19B) y en la apical (Figura 19C) de las células polarizadas. Del análisis de las imágenes se observa cómo la distribución de actina se modificó, concentrándose en los bordes y asemejándose a un borde en cepillo. Además se logró visualizar la posición del núcleo en la cara basal de las células.

A partir del día 11 las células comenzaron a formar el borde en cepillo con un cambio notorio en la distribución de la actina. Además, se evidenció una traslocación del núcleo hacia la región basal de las células. Al día 19, las mismas se encontraron prácticamente en su totalidad polarizadas, presentando un diferenciado borde en cepillo. Es por este motivo que se decidió tomar como tiempo óptimo de polarización entre los 19 y 22 días.

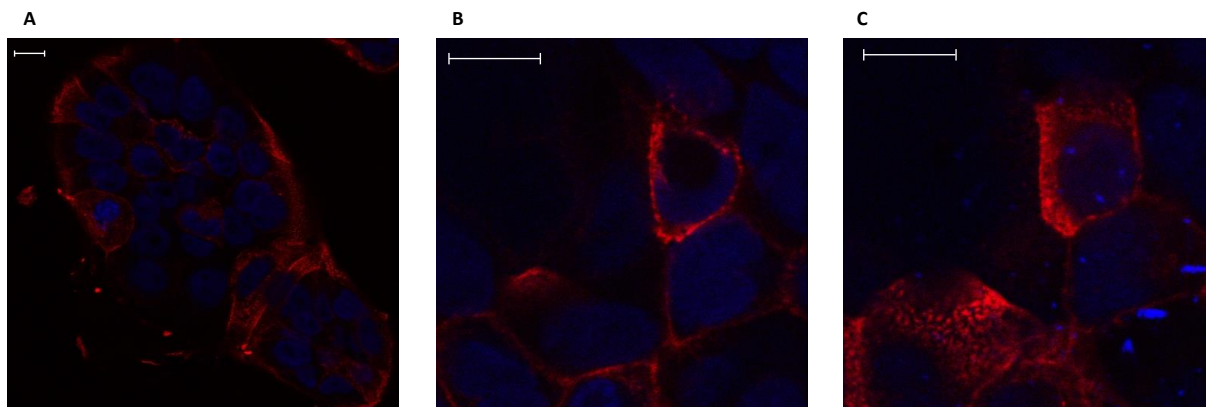


Figura 19. Imágenes de microscopía confocal de las células Caco-2-pNF- κ B-hrGFP clon C3 SCD polarizadas en el día 19. Células sin polarizar (20X) (A), Células transcurridos los 19 días de polarización en la cara basal (60X) (B) y en la cara apical (60X) (C). Se utilizaron los láseres de excitación 505 nm para visualizar los núcleos (DAPI, azul) y el de 594 nm para actina (rodamina, rojo). Barra de escala = 10 μ m.

Una vez que se obtuvieron las células polarizadas, se procedió a evaluar su capacidad de respuesta frente a los distintos estímulos pro-inflamatorios: TNF- α (0,05 ng/mL, 0,8 ng/mL, 12,5 ng/mL, 100 ng/mL), IL-1 β (0,0016 ng/mL, 0,04 ng/mL, 1 ng/mL, 10 ng/mL) y LPS (10 μ g/mL) luego de 48 h. Los resultados se muestran en la Figura 20 donde también se muestran los resultados obtenidos con la línea celular sin polarizar. En ambas curvas se observó que luego de estar polarizadas también responden de forma dosis-dependiente frente a los estímulos TNF- α e IL-1 β . Sin embargo, la respuesta frente al estímulo LPS no fue estadísticamente significativa (Figura 20C). A partir de este ensayo se pudo determinar que las células sin polarizar presentaron una mayor respuesta frente a los estímulos TNF- α e IL-1 β que las células polarizadas.

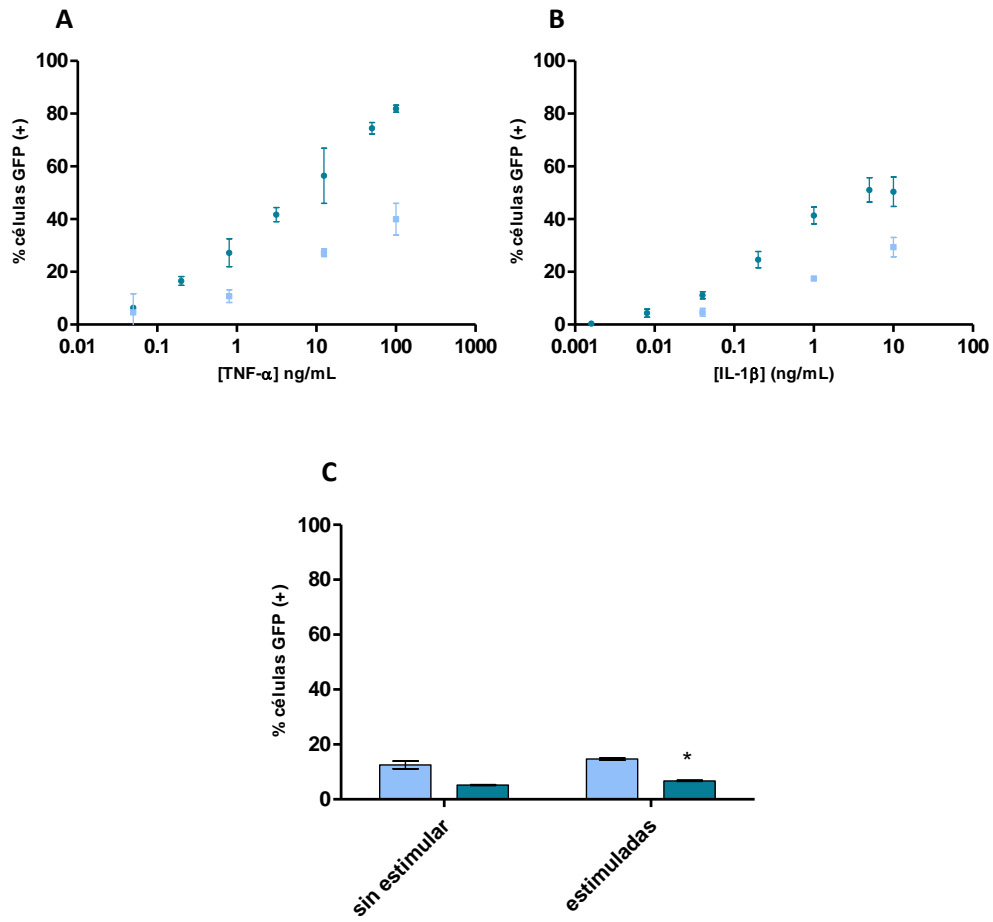


Figura 20. Comparación de las curvas dosis-respuesta para TNF- α (A), IL-1 β (B) y LPS (C) en células polarizadas (celeste) y células sin polarizar (azul) del clon C3 SCD. Las mismas fueron expuestas a diferentes concentraciones de TNF- α (0,05 – 100 ng/mL), IL-1 β (0,0016 – 10 ng/mL) y de LPS a 10 μ g/mL. Se evaluó la expresión de GFP por citometría de flujo a las 48 h. *: aumento estadísticamente significativo de las células sin polarizar estimuladas con respecto al control sin estimular de las células sin polarizar. $p < 0,05$.

4.4. Caracterización de la línea celular reportera HT-29-pNF- κ B-hrGFP

4.4.1. Caracterización de los clones de HT-29-pNF- κ B-hrGFP

Para los estudios de caracterización, se seleccionaron dos clones de la línea reportera HT-29-pNF- κ B-hrGFP previamente generados en la Unidad de Biología Celular: clones E5 SCD y F6 DL, clonados mediante la estrategia de SCD y DL (1 célula/pozo), respectivamente. Para la selección de los mismos, se emplearon idénticos criterios que para los clones de Caco-2-pNF- κ B-hrGFP.

La cinética de activación de NF- κ B se realizó utilizando TNF- α a distintos tiempos (18, 24, 48, 72 y 96 h) y se evaluó la respuesta por citometría de flujo (Figura 21). El clon E5 SCD presentó un máximo porcentaje de expresión de GFP a las 24 h, mientras que para el clon F6 DL se observó a las 48 h. Sin embargo, para ambos clones se seleccionó como tiempo de lectura a las 24 h, para la posterior utilización en los diferentes ensayos *in vitro*. Al ser un sistema utilizado como herramienta de *screening*, se busca reducir el tiempo del ensayo y en este caso a las 24 h ya se observó un alto porcentaje de células que expresan GFP en respuesta al estímulo ($97 \pm 0,6$ % para E5 SCD y $71 \pm 13,4$ % para F6 DL, $p < 0,05$). Para este tiempo se observó que la MIF del clon E5 SCD fue mayor que la del clon F6 DL, siendo $83 \pm 12,5$ y $15 \pm 2,5$, respectivamente ($p < 0,05$).

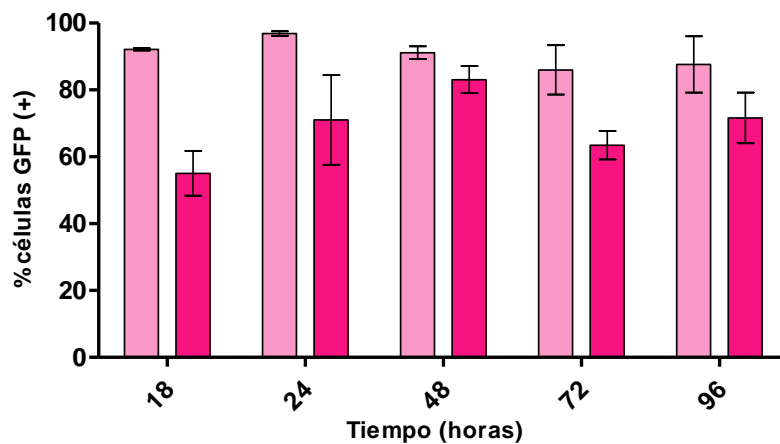


Figura 21. Cinética de activación de NF- κ B mediada por TNF- α evaluada por la expresión de GFP del clon E5 SCD (rosa) y del clon F6 DL (fucsia) de la línea reportera HT-29-pNF- κ B-hrGFP. Las células fueron expuestas a un estímulo pro-inflamatorio (50 ng/mL de TNF- α). Se evaluó la expresión de GFP y la viabilidad celular por citometría de flujo a diferentes tiempos post-estimulación (18, 24, 48, 72 y 96 h).

Por otro lado, se evaluó la respuesta frente a los estímulos: TNF- α (0,05 – 100 ng/mL), IL-1 β (0,0016 – 10 ng/mL) y LPS (1 y 10 μ g/ml). Para el estímulo TNF- α , se observó una respuesta dosis-dependiente diferencial en los dos clones, lográndose determinar que el rango entre 0,5-2,5 ng/mL corresponde a la porción lineal de la curva (Figura 22A). A partir de 3,13 ng/mL se observó saturación de la respuesta para el clon E5 SCD, mientras que para el clon F6 DL se observó a 12,5 ng/mL.

Asimismo, se observó que el clon E5 SCD fue el más sensible, dado que presentó la mayor pendiente en la gráfica.

Con respecto al estímulo IL-1 β (Figura 22B), se observó que el clon E5 SCD respondió de manera dosis-dependiente, alcanzándose la saturación del sistema a partir de 1 ng/mL. Se seleccionó la concentración de 0,2 ng/mL para utilizar en los siguientes ensayos. Para el clon F6 DL no se observó respuesta a concentraciones menores a 1 ng/mL y en el rango de 1-5 ng/mL se obtuvo un $10,5 \pm 4,1\%$ ($p < 0,05$) de señal específica de GFP. Se puede observar la misma tendencia entre el clon E5 SCD y el F6 DL, en donde para las concentraciones 1-5 ng/mL ambos tienen el máximo porcentaje de células GFP $^+$. Si bien para ese rango de concentraciones se ve un aumento estadísticamente significativo, el porcentaje de células GFP $^+$ observado es muy bajo, por lo que no resultaría útil la implementación de esta línea reportera para ensayos de *screening*.

Frente al estímulo pro-inflamatorio LPS (Figura 23), el clon E5 SCD no respondió mientras que el clon F6 DL presentó un aumento en el porcentaje de células GFP $^+$ en las dos concentraciones evaluadas.

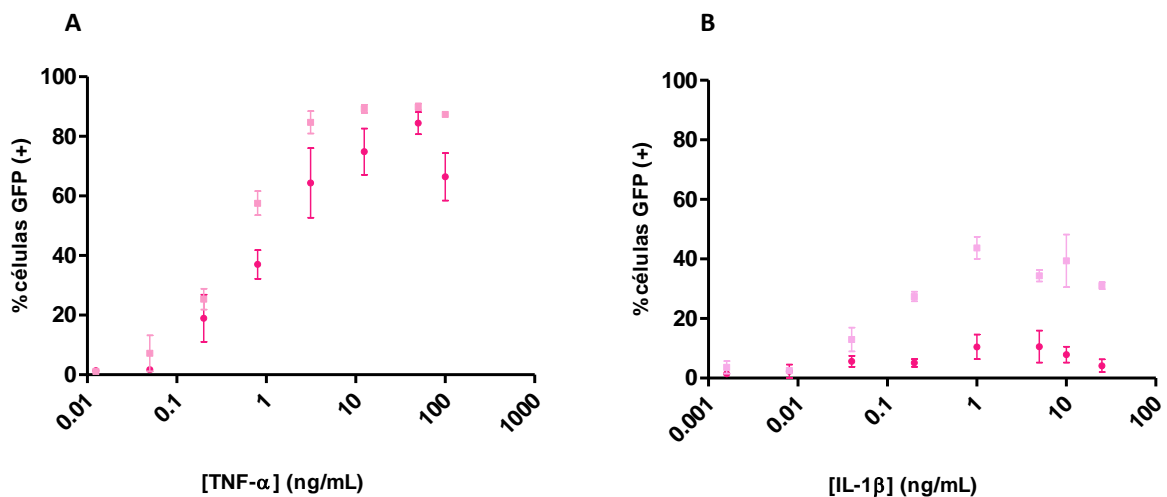


Figura 22. Curva dosis-respuesta frente a TNF- α (A) e IL-1 β (B) del clon E5 SCD (rosa) y del clon F6 DL (fucsia) de HT-29-pNF- κ B-hrGFP. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de TNF- α (0,05 – 100 ng/mL) y de IL-1 β (0,001 – 10 ng/mL) durante 24 h y se evaluó la expresión de GFP por citometría de flujo.

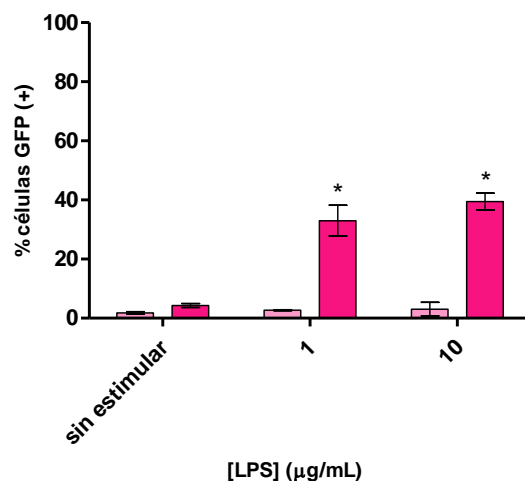


Figura 23. Curva dosis-respuesta frente a LPS del clon E5 SCD (rosa) y del clon F6 DL (fucsia) de HT-29-pNF-κB-hrGFP. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de LPS, 10 µg/mL y 1 µg/mL durante 24 h y se evaluó la expresión de GFP por citometría de flujo. *: aumento estadísticamente significativo respecto al control sin estimular. $p < 0,05$.

4.5. Comparación de ambas líneas reporteras

Una vez que se contó con la caracterización de ambas línea reporteras, se procedió a hacer un análisis comparativo de las mismas.

En primer lugar, se estudió la cinética de activación del factor de transcripción NF-κB para los clones de HT-29-pNF-κB-hrGFP (E5 SCD y F6 DL) y Caco-2-pNF-κB-hrGFP (C3 SCD y D5 DL) (Figura 24). El tiempo de mayor expresión de los clones E5 SCD y F6 DL fue a las 24 h, por lo que se continuó trabajando con el mismo. Debido a que el clon C3 SCD presentó un máximo de expresión a las 48 h y el clon D5 DL a las 144 h, se optó por continuar trabajando exclusivamente con el clon C3 SCD (Caco-2-pNF-κB-hrGFP).

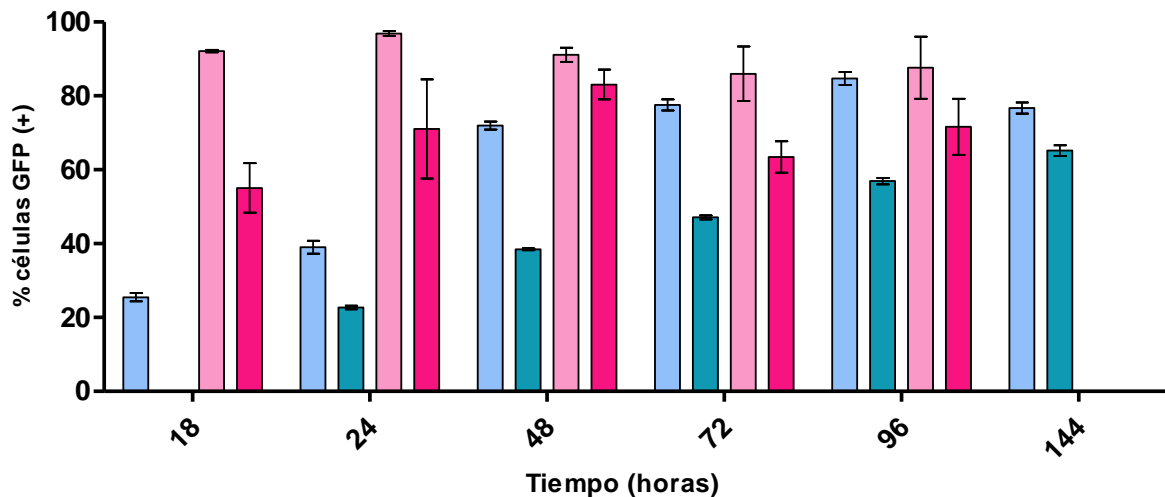


Figura 24. Cinética de activación de NF- κ B de los clones E5 SCD (rosa) y F6 DL (fucsia) de HT-29-pNF- κ B-hrGFP y C3 SCD (celeste) y D5 DL (azul) de Caco-2-pNF- κ B-hrGFP. Las células fueron expuestas a un estímulo pro-inflamatorio (50 ng/mL de TNF- α). Se evaluó la expresión de GFP y la viabilidad celular por citometría de flujo a diferentes tiempos post-estimulación (18, 24, 48, 72, 96 y 144 h). No se registró el valor correspondiente al clon D5 DL a las 18 h y tampoco de los clones E5 SCD y F6 DL a las 144 h.

Se realizó la comparación de las curvas de dosis-respuesta para los cuatro clones (Figura 25). Se observó que los clones derivados de la línea parental HT-29 (E5 SCD y F6 DL) presentaron una mayor respuesta frente a TNF- α que los clones derivados de la línea parental Caco-2 (C3 SCD y D5 DL) (Figura 25A). Por otro lado, en la curva dosis-respuesta correspondiente a IL-1 β se observa que los clones C3 SCD, D5 DL y E5 SCD responden de forma dosis-dependiente frente al estímulo con igual sensibilidad (misma pendiente en la gráfica de la Figura 25B) y límite de detección. Sin embargo, el clon F6 DL no respondió frente al estímulo IL-1 β . Asimismo, se puede observar que el valor correspondiente a la dosis de IL-1 β que produce el equivalente al 50% de la respuesta máxima obtenida (0,2 ng/mL) es aproximadamente el mismo en los clones C3 SCD, D5 DL (Caco-2-pNF- κ B-hrGFP) y E5 SCD (HT-29-pNF- κ B-hrGFP).

Por otro lado, y tal como se mostró previamente, los clones C3 SCD, D5 DL (Caco-2-pNF- κ B-hrGFP) y el clon E5 SCD (HT-29-pNF- κ B-hrGFP) no respondieron frente al estímulo pro-inflamatorio LPS, mientras que el clon F6 DL (HT-29-pNF- κ B-hrGFP) sí logró responder de manera estadísticamente significativa.

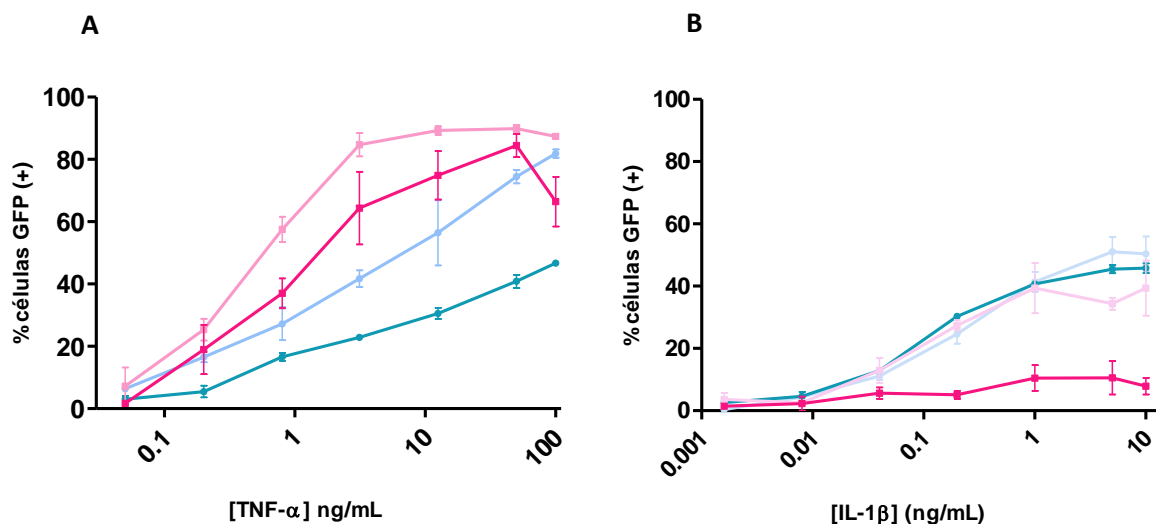


Figura 25. Curva dosis-respuesta frente a TNF- α (A) e IL-1 β (B) para los clones E5 SCD (rosa) y F6 DL (fucsia) de HT-29-pNF- κ B-hrGFP y C3 SCD (celeste) y D5 DL (azul) de Caco-2- pNF- κ B-hrGFP. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de TNF- α (0,05 – 100 ng/mL) o IL-1 β (0,0016 – 10 ng/mL). Se evaluó la expresión de GFP por citometría de flujo a las 24 h en los clones de HT-29-pNF- κ B-hrGFP y a las 48 h en los clones de Caco-2- pNF- κ B-hrGFP.

4.6. Evaluación preliminar de las líneas reporteras

En el punto anterior se demostró que las líneas reporteras generadas respondieron a estímulos pro-inflamatorios en forma dosis-dependiente. Como siguiente paso se desafió el sistema con agentes reportados como moduladores de la activación del factor NF- κ B. Por un lado se trabajó con un compuesto lipídico (nitroalqueno derivado del ácido oléico – OA-NO₂ –) al cual se le describieron efectos inmunomoduladores negativos en la línea celular RAW-264.7 (47), y por otro lado con dos cepas de lactobacilos (*Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus plantarum*). Ha sido reportado que ambas bacterias tienen efectos negativos sobre la activación del factor de transcripción NF- κ B (59,60). En particular, *L. plantarum* tiene la capacidad de mediar la vía de señalización de NF- κ B en células Caco-2 (58).

Se trabajó con el clon C3 SCD (Caco-2-pNF- κ B-hrGFP) y con el clon F6 DL (HT-29-pNF- κ B-hrGFP). El protocolo de desafío empleado para el clon F6 DL fue de una pre-incubación de 2 h con el compuesto lipídico, seguido de una estimulación con TNF- α y posterior evaluación de la respuesta a las 24 h por citometría de flujo (Figura 26). Se observó que el compuesto lipídico no logró disminuir de manera estadísticamente significativa la activación del factor NF- κ B en presencia del estímulo utilizado, como ha sido reportado en la línea RAW-264.7 (47).

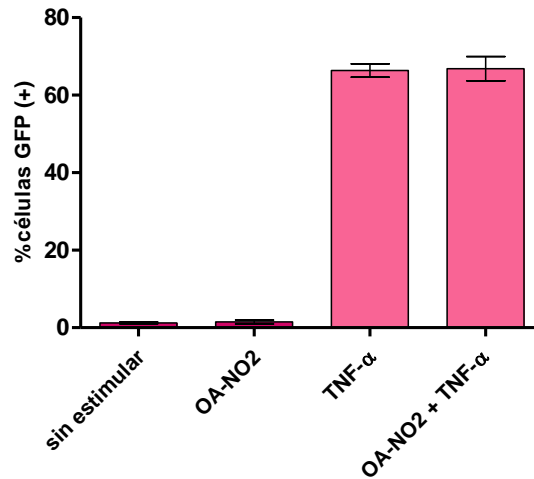


Figura 26. Análisis del efecto del compuesto lipídico OA-NO₂ sobre el clon F6 DL de HT-29-pNF- κ B-hrGFP. El compuesto fue pre-incubado por 2 h y luego se colocó el estímulo pro-inflamatorio (TNF- α , 3 ng/mL) y se evaluó el porcentaje de GFP a las 24 h.

Debido a que no se observó un cambio estadísticamente significativo, se evaluó un mayor tiempo de incubación del compuesto lipídico con el clon C3 SCD antes de la estimulación con TNF- α (Figura 27). Basándose en lo reportado en la literatura, se realizaron dos tiempos diferentes de pre-incubación con el compuesto lipídico (2 h y 18 h), previo a la adición del estímulo pro-inflamatorio (47). Se evaluó la respuesta a las 24 y 48 h de incubación. A las 24 h no se observaron diferencias en ninguno de los tratamientos en comparación con el control (datos no mostrados). Para el tiempo de 48 h se observó que en la condición en presencia de OA-NO₂ y TNF- α hubo un aumento estadísticamente significativo del porcentaje de células GFP⁺ respecto al control de células con TNF- α solo. La adición del compuesto sólo, no tuvo efecto sobre la activación de NF- κ B y tampoco alteró la viabilidad celular (datos no mostrados).

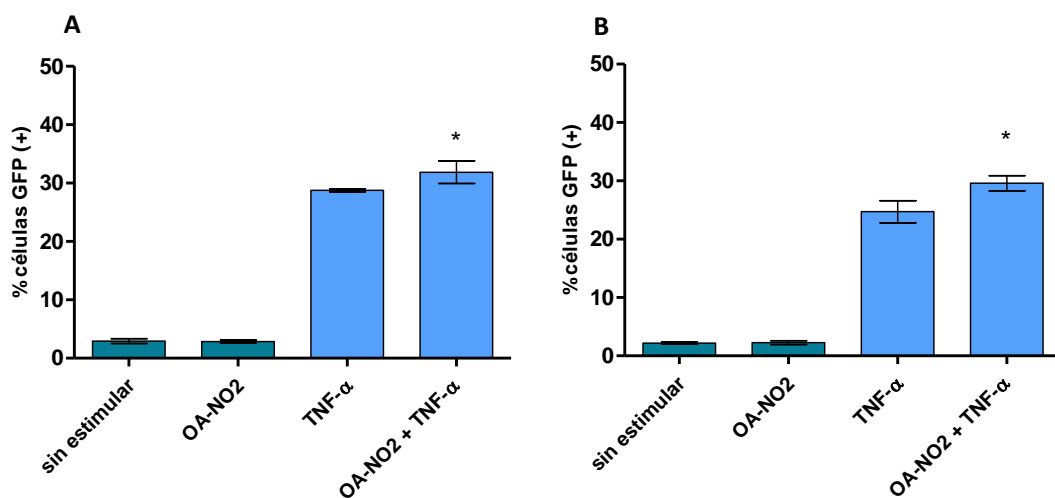


Figura 27. Análisis del efecto del compuesto lipídico OA-NO₂ en el clon C3 SCD de Caco-2-pNF- κ B-hrGFP. El compuesto fue pre-incubado 2 h (A) y 18 h (B), luego se realizó una estimulación con 3 ng/mL de TNF- α y se midió el porcentaje de células GFP⁺ a las 48 h por citometría de flujo. *: aumento estadísticamente significativo con respecto a TNF- α . $p < 0,05$.

Por otro lado, se desafiaron las células reporteras (Caco-2-pNF- κ B-hrGFP clon C3 SCD) frente a los microorganismos *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus plantarum* y *Escherichia coli* DH5- α (Figura 28). En ensayos previos del laboratorio, utilizando el pool de clones de la línea HT-29-pNF- κ B-hrGFP se observó que la condición en presencia de *L. reuteri* y TNF- α disminuyó de manera estadísticamente significativa la activación del factor NF- κ B, mientras que *L. plantarum* no tuvo efecto.

Para el clon C3 SCD la adición de las bacterias *E. coli* DH5- α y *Lactobacillus reuteri* tuvieron un aumento estadísticamente significativo en la activación de NF- κ B con respecto al basal, mientras que *L. plantarum* no. En cuanto al efecto de las bacterias en presencia del estímulo pro-inflamatorio TNF- α , se observó que las tres indujeron un incremento estadísticamente significativo de la activación de NF- κ B respecto al control de TNF- α . Sin embargo, frente a IL-1 β ninguna de las tres bacterias lograron una modulación estadísticamente significativa del factor NF- κ B.

En resumen, con ninguno de los agentes evaluados se observó una modulación negativa inducida por TNF- α o IL-1 β en la activación de NF- κ B, como estaba reportado.

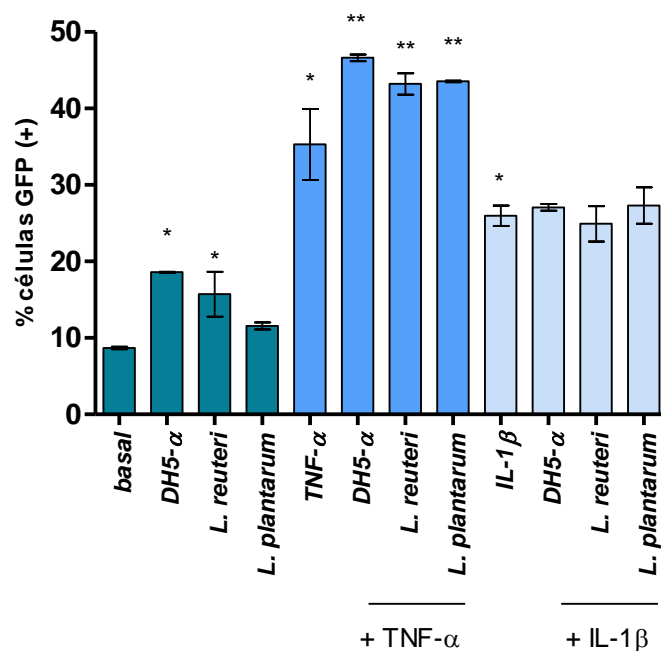


Figura 28. Análisis de co-cultivo heterotípico de bacterias *Escherichia coli* DH5- α , *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus plantarum* con el clon C3 SCD de Caco-2-pNF- κ B-hrGFP. Se realizó una pre-incubación de 2 h con las bacterias en ausencia del antibiótico y luego se adicionó gentamicina y se estimularon con IL-1 β (0,2 ng/mL) y TNF- α (3 ng/ml). Se evaluó la expresión de GFP por citometría de flujo a las 48 h. *: aumento estadísticamente significativo con respecto al basal. **: aumento estadísticamente significativo con respecto a TNF- α . p < 0,05.

5. Discusión

5.1. Generación de la línea celular reportera Caco-2-pNF- κ B-hrGFP

Se generó la línea celular reportera Caco-2-pNF- κ B-hrGFP y se caracterizó la misma, junto con la línea HT-29-pNF- κ B-hrGFP, previamente generada en el laboratorio. Ambas líneas reporteras fueron transfectadas con el plásmido pNF- κ B-hrGFP, el cual posee el gen de la GFP como sistema reportero. Las mismas fueron caracterizadas en cuanto a su cinética de activación del factor de transcripción NF- κ B y además se realizaron las curvas de dosis-respuesta para los estímulos pro-inflamatorios TNF- α , IL-1 β y LPS. Por otro lado, se realizó la cinética de polarización de la línea celular Caco-2-pNF- κ B-hrGFP y se evaluó su respuesta frente a los mismos estímulos pro-inflamatorios. Finalmente, se realizó una evaluación del sistema, utilizando un compuesto lipídico y bacterias con capacidades inmunomoduladoras reportadas.

Como se mencionó previamente, el plásmido pNF- κ B-hrGFP posee el gen de la GFP. La misma proviene de la medusa *Aequorea victoria*. La GFP ha sido modificada para producir una cantidad de variantes de su espectro de absorción-emisión (verde, azul, cian y amarillo), así como proteínas de fusión y biosensores. Esta proteína ha sido utilizada en múltiples usos, como ser trazador de linajes celulares, gen reportero y como reportero de interacciones proteína-proteína (63).

En este trabajo se utilizó la GFP como proteína reportera. Ésta posee ventajas frente a otras proteínas reporteras, como ser la luciferasa y la β -galactosidasa. En primer lugar, la GFP es una proteína de rápida y fácil visualización. Por otro lado, esta proteína permite una fácil determinación de la proporción de células que incorporaron el plásmido, observando célula por célula o detectando el número de células que expresan GFP por citometría de flujo. El uso de luciferasa implica la medida de su actividad, la cual es detectada a través de la conversión de un sustrato generando una señal amplificada, que se mide en un luminómetro. También presenta la desventaja que se determina la actividad poblacional y no de célula por célula (64). Otra ventaja de la GFP frente al ensayo de actividad de luciferasa, es que se puede visualizar en células vivas dado que no requiere sustratos exógenos ni cofactores, mientras que en el ensayo de actividad de luciferasa es necesaria la lisis celular y la adición de un sustrato para revelar el resultado (6). En el contexto de este trabajo, también fue posible evaluar la viabilidad celular al mismo tiempo que visualizar la proteína GFP, y de esta manera, excluir de los análisis las células no viables. Además, el ensayo con luciferasa posee una alta variabilidad, dado que generalmente se debe normalizar por el contenido proteico, teniendo este una alta variabilidad entre ensayos. Por otro lado, cabe destacar que la proteína GFP es estable, siendo su vida media aproximadamente 26 h en células de mamífero, lo que permite su acumulación y su fácil detección en células (65).

En cuanto a la incorporación del ADN plasmídico en células eucariotas, esta se puede realizar mediante el uso de lípidos catiónicos (liposomas), fosfato de calcio, polímeros catiónicos (PEI), dendrímeros activados, partículas magnéticas, DEAE-dextrano, y virus. Además, existen herramientas que se basan en el uso de instrumentos, como la electroporación, microinyección, laserfección y tecnología biolística (66).

Con el fin de lograr una óptima expresión de los genes transfectados, se deben tener en cuenta ciertos factores. Por ejemplo, el pasaje de la línea celular, el estado de confluencia, características de los promotores, tamaño del plásmido y pureza, genes reporteros, marcador de selección, relación ADN:reactivo transfectante, tiempo de incubación y la presencia o no de suero (67). En este proyecto, se trabajó con lípidos catiónicos (*Lipofectamine®2000*, *Lipofectamine®LTX*), con polímeros catiónicos (PEI), así como también se utilizó el método de electroporación.

Los lípidos catiónicos son moléculas anfipáticas que poseen un grupo polar cargado positivamente unido a un dominio hidrofóbico apolar, generalmente compuesto de dos cadenas de alquilo. Estos lípidos catiónicos se unen al ADN que se encuentra cargado negativamente debido a los grupos fosfatos a través de interacciones electrostáticas, formando complejos (liposomas) que son incorporados en las células mediante endocitosis (5).

Una de las principales ventajas de los lípidos catiónicos es la incorporación del ADN con una alta eficiencia, así como también que es un método fácil de utilizar, con pocos pasos, y adaptable a sistemas HTS. Aun así, no es aplicable a todos los tipos celulares, además de que presentan una alta toxicidad debido a la generación de ROS (64). Dentro de estos lípidos catiónicos, se encuentran *Lipofectamine® 2000* y *Lipofectamine®LTX*, ambos de Invitrogen. El fabricante demuestra que en 16 líneas celulares estudiadas, *Lipofectamine®LTX* mostró un aumento de la expresión del plásmido de 2,5 veces y un 25% menos de citotoxicidad comparado con *Lipofectamine®2000* (68). Estos datos han sido confirmados en varias publicaciones, como por ejemplo Hunt *et al.*, 2010 (64).

Los polímeros catiónicos difieren de los lípidos catiónicos en que no contienen parte hidrofóbica y son completamente solubles en agua. Debido a su naturaleza polimérica, los mismos pueden ser sintetizados con diferente tamaño y geometría (lineal o ramificado). La diferencia más importante es que los polímeros catiónicos poseen la habilidad de condensar el ADN más eficientemente. Se utilizan tres tipos, los lineales, ramificados o esféricos (66). En esta investigación se utilizó PEI ramificado.

En este trabajo se muestran las diferencias de eficiencias de transfección entre los dos lípidos catiónicos mencionados previamente y el polímero catiónico. Estas fueron de 2% para PEI ramificado, 6% para *Lipofectamine®2000* y 16% para *Lipofectamine®LTX*. Las bajas eficiencias de transfección obtenidas, coinciden con resultados presentes en la literatura sobre la resistencia de la línea celular Caco-2 a ser transfectada (69).

Cabe destacar que estos valores coinciden con lo reportado en la literatura, en donde una mayor eficiencia de transfección y una menor citotoxicidad son obtenidas utilizando el reactivo transfectante *Lipofectamine®LTX* (64). Por todo lo expuesto, se decidió trabajar con dicho reactivo transfectante.

La electroporación es una tecnología utilizada principalmente en células madre o células primarias, pero su uso se extiende a todas las líneas celulares. Es un método no-químico que no altera la estructura biológica o la función de las células *target*. Se basa en la exposición de las células a un campo eléctrico de alta intensidad que desestabiliza temporalmente la membrana plasmática, generando poros en ella, siendo esta permeabilización reversible. Además, es fácil de realizar y eficiente. Esa alta eficiencia fue corroborada con los resultados obtenidos, ya que se logró alcanzar un 21% de células GFP⁺, con un 3,5% de señal inespecífica. Esa eficiencia de transfección fue mayor a la obtenida con los reactivos transfectantes que se utilizaron.

A causa del potencial eléctrico generado a través de la membrana celular, el ADN plasmídico cargado negativamente, ingresa a las células. Debido a la desestabilización causada, la viabilidad celular es un punto crítico en el uso de esta tecnología, siendo las principales desventajas la gran cantidad de células con las que se debe contar y la baja viabilidad celular obtenida luego del proceso (66,70). Además, la cantidad de ADN necesaria para una correcta incorporación en las células es mayor comparada con la utilizada para las otras metodologías de incorporación de ADN (70). En particular en este trabajo se utilizó el doble de ADN que para los lípidos catiónicos. Es de suma importancia controlar y lograr las condiciones óptimas de los parámetros de permeabilización, como ser la magnitud y la duración del pulso eléctrico generado. Estos valores dependen de cada línea celular y deben ser optimizados, tomando como crítica la resistencia ofrecida por el buffer utilizado. En este caso se trabajó con un voltaje de 200V y un tiempo de pulso de 40 ms (67,70).

Una vez elegido el reactivo transfectante, se optó por trabajar con el plásmido linealizado y con el plásmido circular, con el fin de lograr una mayor eficiencia de inserción al genoma. Está reportado en la literatura, que el plásmido circular es utilizado para realizar transfecciones transitorias dado que se encuentra mejor empaquetado en forma de cromatina (70). Sin embargo, para lograr una transfección estable es conveniente utilizar el plásmido linealizado, dado que posee los extremos libres y es más probable que se integre en el cromosoma del hospedero. Aun así, el ingreso del plásmido linealizado es menor que cuando se utiliza plásmido circular (70).

Se observó que la transfección realizada con el plásmido lineal dio un mayor porcentaje de células GFP⁺ que con el plásmido circular, 37% de células GFP⁺ con 13% de señal inespecífica y 20% de células GFP⁺ con 5% de señal inespecífica, respectivamente. El alto porcentaje (13%) de células que expresaban GFP en ausencia del estímulo en la transfección con el plásmido linealizado se puede explicar porque la integración del plásmido pNF-κB-hrGFP en el genoma de la célula es al azar. Es posible que se haya integrado en una región del genoma que se encuentra constantemente activa,

quizás ubicándose río abajo de promotores constitutivos del genoma celular o incluso en sitios *hotspot* del genoma. Por otro lado, cabe la posibilidad que el plásmido no se haya insertado en su totalidad, sino que lo que se logró insertar en el genoma fue solamente el gen que codifica para la proteína reportera y por eso se encuentra expresada constitutivamente. Asimismo, al estar trabajando con una línea celular con origen cancerígeno ya que deriva de un adenocarcinoma de colon humano, puede existir una activación basal del factor de transcripción NF- κ B, lo que explicaría el alto porcentaje de GFP inespecífico.

Debido al alto porcentaje de señal inespecífica de la transfección con el plásmido linealizado, se optó por realizar un enriquecimiento celular en donde se seleccionaron aquellas células que no expresaban GFP en ausencia del estímulo pro-inflamatorio. Luego, se realizó un nuevo enriquecimiento seleccionando aquellas células que respondían específicamente al estímulo. De esta manera, se logró reducir el porcentaje de inespecificidad y al mismo tiempo aumentar la fracción celular que responde específicamente al estímulo. Este objetivo se logró, generando una reducción de la señal inespecífica a un 5%.

El bajo porcentaje de células que responden a los estímulos pro-inflamatorios, aún siendo resistentes al antibiótico de selección, se puede deber a que el plásmido se haya insertado en una región en donde la cromatina se encuentra condensada, en forma de heterocromatina, por lo que la expresión génica no se llevará a cabo. Una alternativa para la generación de líneas estables es utilizar el sistema de recombinación Cre/LoxP o FLP/FRT, para lograr una integración sitio-dirigida del gen de interés (5).

Para la generación de clones se utilizaron dos metodologías alternativas: clonado por SCD y por DL. La metodología de DL es manual, en la cual se realiza una separación celular, sin discriminar entre células GFP⁺ de GFP⁻. Sin embargo, posee la ventaja de no requerir de equipamiento sofisticado. En cambio, la metodología de SCD es más precisa que el clonado por DL y resulta más eficiente. La selección de células es más fina y más específica, aislándose únicamente aquellas células que poseen la característica deseada, en este caso la expresión de GFP. Asimismo, en el clonado por DL hay más probabilidad que las células sean GFP⁻ o incluso con MIF bajas. Esto se pudo observar al analizar la MIF, en donde el clon proveniente de la SCD tiene una mayor MIF en comparación con el clon proveniente de la DL. Esto se puede explicar dado que en el proceso de clonación por SCD, se seleccionan aquellos clones que presentan una intensidad de fluorescencia mayor a un umbral previamente determinado, obteniéndose células con una MIF alta. Sin embargo, en el clonado por el método de DL, se clonan células que presentan intensidades de fluorescencia tanto altas como bajas, generando una MIF menor a la de los clones obtenidos por el método de SCD.

5.2. Caracterización de las líneas celulares Caco-2-pNF- κ B-hrGFP y HT-29-pNF- κ B-hrGFP

Se logró caracterizar a nivel de cinética de activación del factor NF- κ B ambas líneas reporteras y sus respectivos clones. Los clones derivados de la línea parental Caco-2 (C3 SCD y D5 DL) se comportaron de manera distinta en cuanto a la cinética de activación, dado que el clon C3 SCD tiene su máximo porcentaje de expresión de GFP a las 48 h mientras que el clon D5 DL a las 144 h.

Se encuentra reportado en la literatura que la respuesta a estímulos activadores de NF- κ B es distinta en los distintos clones generados a partir de la misma línea parental (71). Además, está descrito que el sitio de inserción del plásmido reportero podría afectar la expresión del gen reportero, por este motivo resultaría interesante evaluar la ubicación del plásmido en el genoma celular (71).

En este trabajo se lograron generar clones por integración al azar del plásmido, lo que explicaría la respuesta diferencial a los distintos estímulos pro-inflamatorios. Por este motivo, es de suma importancia realizar un *screening* primario de los clones, tanto a nivel de cinética de activación del factor de transcripción como las curvas de dosis-respuesta frente a los distintos estímulos.

En cuanto a los dos clones derivados de la línea parental HT-29 (E5 SC y F6 DL), estos se comportaron de manera similar en cuanto a la cinética de activación del factor de transcripción nuclear, siendo el tiempo óptimo para la lectura final del ensayo 24 h.

En términos de practicidad, es conveniente utilizar un sistema que tenga un menor tiempo de respuesta, para lograr rapidez y eficacia al momento de emplear esta herramienta de *screening*.

La citoquina pro-inflamatoria TNF- α ejerce su acción en la célula a través de los receptores *TNF- α receptors* (TNFR-1 (55 kDa) o TNFR-2 (55 kDa)) que se encuentran en la superficie celular. Ambos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores de TNF. Una vez que se une la citoquina a su receptor, éstos llevan a la activación de NF- κ B a través de la activación de ciertas vías de señalización (72-74). El estímulo TNF- α generó una respuesta dosis-dependiente en los cuatro clones analizados. En ambas líneas, los clones derivados de la metodología de SCD, presentaron una mayor respuesta que los clones obtenidos a través del clonado por DL. Con el SCD se tiene una mayor probabilidad de obtener clones con una señal específica de GFP alta, ya que todas las células depositadas en cada uno de los pozos van a ser GFP⁺. En cambio, en el clonado por DL se depositan células sin discriminar entre células GFP⁺ de GFP⁻.

Asimismo, se observó que el estímulo pro-inflamatorio IL-1 β generó una respuesta dosis-dependiente y con igual sensibilidad en los clones C3 SCD y D5 DL de la línea parental Caco-2 y en el clon E5 SCD de la línea parental HT-29. Sin embargo, el clon F6 DL no respondió frente a IL-1 β , pero sí

frente a LPS. La citoquina IL-1 β incide sobre la célula a través de los receptores *IL-1 receptor* y utiliza la proteína MyD88 como inicio en la cascada de señalización, la cual culmina en la activación de NF- κ B. El estímulo LPS activa el receptor TLR-4 formando un complejo con la proteína MD2 (del inglés, *Myeloid Differentiation protein 2*) y la proteína asociada a la membrana CD14, finalizando en la activación del factor de transcripción NF- κ B (15,16,75-77). El receptor TLR-4 y *IL-1 receptor* pertenecen a la misma superfamilia, denominada *Interleukin-1 Receptor/Toll-like Receptor Superfamily*. Esta superfamilia tiene la particularidad que todos los receptores poseen un dominio en común denominado *Toll-IL-1 receptor* (TIR) (78-80). Es posible que al integrarse el plásmido en el genoma de la célula, este lo haya hecho en una zona del genoma que determine que no se exprese el receptor de IL-1 β o que se exprese de manera no funcional. Lo mismo pudo haber ocurrido en los otros clones, pero para el receptor TLR-4 de LPS. Incluso, por este mismo motivo pudo haber ocurrido que la proteína CD14 no se haya expresado en los clones que no respondieron frente a este estímulo. Una manera de evaluar la expresión del receptor de TLR-4, sería detectándolo por métodos de inmunohistoquímica y visualizarlo por microscopia de epifluorescencia. Una estrategia para evaluar el sitio de inserción y determinar el número de copias con las que se insertó en el genoma, puede ser realizando la técnica de *genome walking*, y corroborar que no esté afectando la expresión de los receptores. La determinación del sitio de inserción y del número de copias del plásmido permitirá tener una línea celular reportera completamente caracterizada.

Una posible razón por la cual algunos clones no responden frente al estímulo pro-inflamatorio LPS se puede deber a que se está trabajando con una medida indirecta de la activación de NF- κ B, a través de la expresión de la proteína GFP. Es posible que el factor de transcripción NF- κ B se haya activado por el estímulo pro-inflamatorio LPS, sin embargo no se logre la expresión de la proteína reportera, por este motivo resulta interesante evaluar directamente la presencia de este factor de transcripción en el núcleo de la célula a través de técnicas, como por ejemplo, *western blot*.

Por otro lado, cabe destacar que tanto el enriquecimiento como la generación de clones se realizaron estimulando las células únicamente con el estímulo pro-inflamatorio TNF- α . Por lo que, en este caso, se seleccionaron únicamente aquellas células que respondieron frente a este estímulo. Por esta razón es que algunos de los clones estudiados no responden frente a IL-1 β o LPS, mientras que todos responden frente a TNF- α . Realizando una estimulación con un *cocktail* pro-inflamatorio (utilizando TNF- α , IL-1 β y LPS) previo al enriquecimiento celular y a la clonación, se hubiera logrado una variedad de clones con una capacidad de respuesta diversa frente a los tres estímulos empleados.

5.3. Polarización de la línea Caco-2-pNF-κB-hrGFP

La cinética de polarización demostró que a los 19-22 días las células Caco-2 se encuentran polarizadas ya que presentaron las principales características de los enterocitos del intestino delgado. Una vez que se realizó la caracterización frente a los distintos estímulos, se observó que respondían de forma dosis-dependiente a TNF- α e IL-1 β , sin embargo, con una menor respuesta.

Está reportado en la literatura que en células epiteliales confluentes polarizadas existen bajos niveles de proliferación, por lo que se las considera en estado quiescente, indicando un estado metabólico inactivo (81). Por este motivo, la producción del receptor de membrana, o de todos los intermediarios en las vías de señalización utilizadas por las citoquinas TNF- α o IL-1 β , puede que hayan bajado su expresión cuando las células se encuentran en un estado de confluencia por un período de 20 días. Este hecho podría explicar el menor porcentaje de células que responden al estímulo en células polarizadas frente a células sin polarizar. Sin embargo, la respuesta observada sería suficiente para detectar cambios en el porcentaje de expresión de GFP, y por lo tanto la modulación de la actividad de NF- κ B.

Una variante que puede ser utilizada en futuros abordajes es el uso de *transwell* para polarizar las células. Estos poseen una membrana de policarbonato, que una vez colocadas las células allí, son capaces de crecer, diferenciarse y polarizarse en una situación más cercana a lo que ocurre a nivel intestinal. Esto es debido a que se cultivan en un ambiente que se asemeja lo más posible al estado *in vivo*. Estos soportes permeables son capaces de permitir a las células tomar y secretar moléculas, tanto en su cara apical como basal, llevando a cabo actividades metabólicas, que se asemejan a lo que ocurre a nivel intestinal (82).

5.4. Evaluación preliminar del sistema

Los resultados preliminares obtenidos en la evaluación del sistema utilizando el compuesto lipídico, indican que el mismo no logró una modulación negativa del factor de transcripción NF- κ B en las líneas evaluadas y en las condiciones ensayadas. Esto se puede deber a que dicha modulación dependa de la línea celular y del estímulo específico, ya que la modulación reportada se describió en la línea celular derivada de macrófagos murino (RAW-264.7) con el estímulo pro-inflamatorio LPS (47). Para evaluar esta diferencia en la respuesta se deben ajustar y optimizar los distintos parámetros del ensayo.

Se evaluaron preliminarmente dos cepas de lactobacilos: *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus plantarum* y *Escherichia coli* DH5 α . Se observó que tanto *L. reuteri* como *E. coli* DH5 α constituyen un estímulo frente al cual las células respondieron, aumentando el porcentaje de células GFP⁺, lo que indica la activación del factor NF- κ B.

Ambos agentes inmunomoduladores fueron utilizados con el fin de evaluarlos como controles positivos de la modulación negativa del factor de transcripción NF- κ B. El hecho de que no se haya logrado esta modulación, resalta el hecho de que los controles utilizados en los modelos celulares no pueden ser extrapolados a otros modelos. En este caso, tanto las bacterias como el compuesto lipídico no lograron modular negativamente el NF- κ B, por lo que surge la necesidad de tener controles apropiados para su validación.

Es posible que la activación de NF- κ B se haya dado, no por un aumento en el número de células que expresan la proteína GFP, sino por un aumento en la intensidad de fluorescencia de esta proteína. Por este motivo, resulta interesante evaluar la MIF para los casos en donde se trabajó con el agente inmunomodulador y con el estímulo, y compararlo con las células estimuladas únicamente con el estímulo pro-inflamatorio. De esta manera se podrá evaluar la actividad de este factor de transcripción.

En futuros abordajes, ambos moduladores (compuesto lipídico y cepas de lactobacilos y *E.coli*) serán evaluados en modificando ciertas condiciones como ser: los tiempos de incubación, dado que para el cultivo heterotípico se utilizó únicamente una pre-incubación de 2 h con los microorganismos; los estímulos utilizados, la presencia/ausencia de antibiótico gentamicina, las bacterias probióticas utilizadas, los clones utilizados, entre otros. Por ejemplo, en el caso del clon F6 DL (HT-29-pNF- κ B-hrGFP), se evaluará su respuesta en presencia del compuesto lipídico utilizando el estímulo pro-inflamatorio LPS, dado que en la literatura se utilizó dicho estímulo (47). Por otra parte, se desafiará el sistema con otras bacterias probióticas con capacidades inmunomoduladoras ya reportadas, como ser *Lactobacillus acidophilus* (83,84) y *Lactobacillus delbrueckii* (85). Asimismo, se evaluarán distintas MOI. Así como también, se realizarán los cultivos heterotípicos y la incubación con el compuesto lipídico utilizando las células polarizadas, dado que esta línea celular es recomendada como modelo de epitelio intestinal polarizado (40,45).

Para la validación de la herramienta generada, se propone definir la sensibilidad y la especificidad de la misma, comparándola con las otras herramientas ya existentes, como por ejemplo los modelos previamente descritos que utilizan otros sistemas reporteros (44-50).

Por otro lado, para la validación del método se realizará la detección directa de NF- κ B. En este trabajo, se utilizó el método de detección indirecta de la activación del factor de transcripción por medio de la expresión de la proteína GFP. Es interesante evaluar la presencia de NF- κ B en el núcleo por la técnica de *western blot* y así lograr vincular la activación del mismo con la expresión de la proteína GFP. Asimismo, se podría realizar un estudio para detectar la fosforilación de las proteínas inhibitorias I κ Bs a través de un análisis por *western blot*, siendo esta, otra manera de detectar la activación del factor de transcripción NF- κ B.

6. Análisis Económico

La línea celular reportera generada Caco-2-pNF- κ B-hrGFP primariamente se utilizará como modelo celular *in vitro* para evaluar efectos inmunomoduladores de distintas cepas de bacterias. Constituyendo así, un método de *screening* primario para seleccionar aquellas cepas que posean propiedades atractivas para su posterior empleo como probiótico en el tratamiento y/o prevención de enfermedades. Es necesario poseer una herramienta que sirva para validar el uso de los probióticos, prebióticos y de compuestos sintéticos y naturales, dado que hoy en día su uso está muy extendido. No se conoce completamente el modo de acción de estos agentes inmunomoduladores, por esto, es necesario contar con modelos bien caracterizados que permitan evaluar su capacidad inmunomoduladora.

Las cepas de microorganismos seleccionadas podrán ser empleadas en la industria láctea local, siendo esta una de las principales actividades económicas del país, con una producción lechera de 2.060 millones de litros por año (86). A su vez, su empleo se podrá extender al estudio de compuestos sintéticos y naturales con potencial actividad anti-inflamatoria. Por otro lado, este modelo podrá ser utilizado en la detección de cepas locales con potencial probiótico.

El empleo de dicha línea reportera surge como complemento a las células HT-29-pNF- κ B-hrGFP, y como alternativa a los ensayos que utilizan modelos animales. Esto contribuirá a reducir el número de animales de experimentación utilizados en los modelos *in vivo* para evaluar los distintos compuestos, logrando así una reducción de costos y de tiempo invertidos durante el *screening*. Estos ensayos agudos requieren una cantidad importante de animales, dado que se debe trabajar con un grupo control y un grupo tratado con el compuesto o con el microorganismo que se desea ensayar, y ambos grupos con un mínimo seis animales. Además, para lograr disminuir la variabilidad inherente en los ensayos con animales, es recomendable realizar varias repeticiones de los mismos.

Por otro lado, es importante el personal que se necesita para realizar estos ensayos, el mismo debe estar correctamente capacitado, habiendo realizado cursos específicos de la temática. Asimismo, debe existir personal encargado de la cría y mantenimiento de los animales utilizados. En la actualidad, existe una tendencia a utilizar bioterios con categoría SPF (del inglés, *Specific Pathogen Free*), lo cual aumenta los costos ya que el mantenimiento de estas instalaciones es muy caro.

Más allá del alto costo económico de realizar ensayos con animales, surgen aspectos éticos al respecto. Es por eso que se tiende a reducir el uso de animales de laboratorio. El principio de la 3Rs: reducir, reemplazar y refinar, propuesto en 1959 por William Russell y Rex Burch, está siendo incorporado cada vez más a las leyes de diferentes países relacionadas con la investigación animal (87). En cuanto a la experimentación con animales a nivel nacional, se creó la CNEA (Comisión Nacional de Experimentación Animal) en el marco de la ley 18.611, "Utilización de animales en actividades de experimentación, docencia e investigación científica" en el año 2009 (88). Esta

comisión vela por asegurar el máximo bienestar animal a través de las normativas y regulaciones tanto nacionales como internacionales, basándose principalmente, en la “Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio” (89).

Otros potenciales usos de este sistema, es en el área del cáncer. El NF- κ B está involucrado en la vía de señalización en cáncer, dado que participa en los mecanismos de proliferación celular. Un aumento en la actividad de NF- κ B puede estar directamente relacionado con mutaciones en los genes de NF- κ B u oncogenes que activan la vía de señalización de NF- κ B. Por otro lado, un tumor puede elevar la activación de NF- κ B a través de un incremento de las citoquinas generadas por su propio microambiente (90). Esta herramienta podría ser utilizada en la generación de drogas anti-tumorales. Dado que se tiene un sistema modulador del factor NF- κ B, se buscan drogas que inhiban la translocación al núcleo del mismo (90,91).

Además de todas las posibles aplicaciones a nivel económico, existe la posibilidad de patentar dicha línea y sus aplicaciones. En primer lugar, se debe verificar si el proyecto cuenta con los distintos requisitos indicados por la Ley 17.164 (92). En este caso, se trata de la novedad, altura inventiva y aplicación industrial. Luego de realizada una búsqueda por los distintos sitios de patentes, no se encontró patente que se relacionara con esta investigación, por lo que la misma se considera novedosa. Sin embargo, cabe destacar que se realizó una divulgación de la línea celular reportera en Noviembre del 2013, por lo que de acuerdo al artículo 10 de la Ley 17.164, se tiene un año a partir de esa fecha para presentar la solicitud. Por otro lado, dicha invención no se deduce de forma evidente del estado de la técnica, por lo que posee altura inventiva. Finalmente, en cuanto a la aplicación industrial, la misma lo posee, debido a todo lo expuesto previamente. Por lo que este trabajo tiene la capacidad de ser patentable.

Otra alternativa, es la posibilidad de depositar la línea reportera generada en un banco certificado, como ser ATCC o DSMZ, para su posterior distribución.

7. Conclusiones

En el presente trabajo se logró obtener la línea celular Caco-2-pNF- κ B-hrGFP reportera de la actividad del factor de transcripción NF- κ B. Los clones C3 SCD y D5 DL de esta línea fueron caracterizados en cuanto a la cinética de activación del factor de transcripción y la respuesta frente a los estímulos TNF- α , IL-1 β y LPS.

Tanto el clon C3 SCD como el clon D5 DL, tuvieron una cinética de activación diferencial, en donde el tiempo óptimo para el clon C3 SCD fue de 48 h, mientras que para el clon D5 DL fue de 144 h. Por otro lado, se observó que el clon proveniente de la metodología de SCD presentó un mayor porcentaje de células GFP⁺ y mayor intensidad media de fluorescencia. Ambos clones respondieron de forma dosis-dependiente frente a TNF- α e IL-1 β , sin embargo no respondieron frente al estímulo pro-inflamatorio LPS.

Por otra parte, se determinó que el tiempo óptimo de polarización del clon C3 SCD (Caco-2-pNF- κ B-hrGFP) es entre los 19 y 22 días post-confluencia, a través del seguimiento de la actina por microscopía confocal. De igual forma, se evaluó la capacidad de respuesta de la línea polarizada, observándose una respuesta dosis-dependiente frente a los estímulos TNF- α e IL-1 β . Sin embargo, dicha respuesta fue menor que en las células sin polarizar.

Asimismo, se caracterizaron dos clones (E5 SCD y F6 DL) de la línea reportera HT-29-pNF- κ B-hrGFP previamente generada en el laboratorio. Ambos alcanzaron el máximo porcentaje de células GFP⁺ a las 24 h. Al igual que en los clones derivados de la línea parental Caco-2, el clon proveniente de la SCD, tuvo una mayor cantidad de células con una mayor intensidad de fluorescencia comparado con el clon obtenido por el método de DL (mayor MIF). Estos mismos clones tienen una respuesta dosis-dependiente en cuanto al estímulo TNF- α . Sin embargo, frente a LPS e IL-1 β respondieron de manera diferencial. El clon F6 DL no respondió frente a IL-1 β , pero sí a LPS, mientras que el clon E5 SCD respondió a IL-1 β pero no a LPS.

Por otro lado, se estudió preliminarmente la respuesta frente a microorganismos con capacidades inmunomoduladoras reportadas y frente a un compuesto lipídico sintético. En este caso, se observó que los microorganismos por sí solos presentaron un efecto activador del factor de transcripción, sin embargo, en el sistema Caco-2-pNF- κ B-hrGFP no se observaron efectos de modulación negativa de NF- κ B. En cuanto al compuesto lipídico, no se obtuvo activación por sí solo de la vía de activación de NF- κ B, pero tampoco se observó capacidad de inmunomodulación negativa en este sistema.

Es posible mejorar los resultados obtenidos en ambos ensayos modificando ciertos factores, descritos previamente, y así encontrar las condiciones óptimas con el fin de que el sistema sea

sensible a estos estímulos. De ese modo se podría utilizar el sistema como herramienta de *screening* primario de compuestos o microorganismos con capacidad moduladora de la actividad de NF- κ B.

El sistema reportero generado en este trabajo, es una herramienta útil para el *screening* primario de compuestos sintéticos o naturales, así como también de microorganismos con potencial actividad inmunomoduladora. Además, es una alternativa a los modelos *in vivo* y una posible herramienta para el descubrimiento de drogas anti-tumorales.

8. Referencias bibliográficas

1. Jiang T, Xing B, Rao J. Recent developments of biological reporter technology for detecting gene expression. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 2008;25:41-75.
2. Ghim CM, Lee SK, Takayama S, Mitchell RJ. The art of reporter proteins in science: past, present and future applications. *BMB reports*. 2010;43(7):451-460.
3. Rosenthal N. Identification of regulatory elements of cloned genes with functional assays. *Methods Enzymol*. 1987;152:704-720.
4. Brader P, Serganova I, Blasberg RG. Noninvasive molecular imaging using reporter genes. *J Nucl Med*. 2013;54(2):167-172.
5. Bollati-Fogolín M, Comini MA. Cloning and expression of heterologous proteins in animal cells. En: Castilho L, Moraes A, Augusto E, Butler M, editores. *Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy*. Nueva York (NY): Garland Science; 2008. p. 39-67.
6. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 1994;263(5148):802-805.
7. Szymanski P, Markowicz M, Mikiciuk-Olasik E. Adaptation of high-throughput screening in drug discovery-toxicological screening tests. *Int J Mol Sci*. 2012;13(1):427-452.
8. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clin Exp Immunol*. 2007;147(2):227-235.
9. Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab*. 2011;13(1):11-22.
10. Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest*. 2001;107(2):135-142.
11. Waldner MJ, Neurath MF. Chemically induced mouse models of colitis. En: Enna SJ, Williams M, Kenakin T, McGonigle P, Ruggeri B, editores. *Current Protocols in Pharmacology*. Nueva York (NY): John Wiley and Sons Inc.; 2009. Supl 45: Unidad 5.55.
12. Santaolalla R, Fukata M, Abreu MT. Innate immunity in the small intestine. *Curr Opin Gastroenterol*. 2011;27(2):125-131.
13. Santaolalla R, Abreu MT. Innate immunity in the small intestine. *Curr Opin Gastroenterol*. 2012;28(2):124-129.
14. Natoli M, Leoni BD, D'Agnano I, D'Onofrio M, Brandi R, Arisi I, Zucco F, Felsani A. Cell growing density affects the structural and functional properties of Caco-2 differentiated monolayer. *J Cell Physiol*. 2011;226(6):1531-1543.
15. Hill DA, Artis D. Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:623-667.
16. Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(2):131-144.
17. Brestoff JR, Artis D. Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nat Immunol*. 2013;14(7):676-684.
18. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486(7402):207-214.
19. Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*. 2009;136(1):65-80.
20. Dave M, Higgins PD, Middha S, Rioux KP. The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. *Transl Res*. 2012;160(4):246-257.
21. Sansonetti PJ. To be or not to be a pathogen: that is the mucosally relevant question. *Mucosal Immunol*. 2011;4(1):8-14.
22. Abraham C, Medzhitov R. Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2011;140(6):1729-1737.

23. Hormannsperger G, Haller D. Molecular crosstalk of probiotic bacteria with the intestinal immune system: clinical relevance in the context of inflammatory bowel disease. *Int J Med Microbiol.* 2010;300(1):63-73.
24. Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(3):159-169.
25. Hershberg RM. The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. V. Polarized compartmentalization of antigen processing and Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;283(4):G833-G839.
26. Janeway CAJ, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology.* Science G, editor. New York 2001.
27. Winkler P, Ghadimi D, Schrezenmeir J, Kraehenbuhl JP. Molecular and cellular basis of microflora-host interactions. *J Nutr.* 2007;137(3 Supl 2):756S-772S.
28. Koblansky AA, Jankovic D, Oh H, Hieny S, Sungnak W, Mathur R, Hayden MS, Akira S, Sher A, Ghosh S. Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii.* *Immunity.* 2013;38(1):119-130.
29. Bordon Y. Innate immunity: TLR13, unlucky, but just for some. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(9):618-619.
30. Hidmark A, von Saint Paul A, Dalpke AH. Cutting edge: TLR13 is a receptor for bacterial RNA. *J Immunol.* 2012;189(6):2717-2721.
31. Oldenburg M, Kruger A, Ferstl R, Kaufmann A, Nees G, Sigmund A, Bathke B, Lauterbach H, Suter M, Dreher S and others. TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. *Science.* 2012;337(6098):1111-1115.
32. Shi Z, Cai Z, Sanchez A, Zhang T, Wen S, Wang J, Yang J, Fu S, Zhang D. A novel Toll-like receptor that recognizes vesicular stomatitis virus. *J Biol Chem.* 2011;286(6):4517-4524.
33. Muller CA, Autenrieth IB, Peschel A. Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(12):1297-1307.
34. Pasparakis M. Regulation of tissue homeostasis by NF-kappaB signalling: implications for inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(11):778-788.
35. Dubois B, Goubier A, Joubert G, Kaiserlian D. Oral tolerance and regulation of mucosal immunity. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(12):1322-1332.
36. Stadnyk AW. Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2002;16(4):241-246.
37. Pasparakis M. Role of NF-kappaB in epithelial biology. *Immunol Rev.* 2012;246(1):346-358.
38. DiDonato JA, Mercurio F, Karin M. NF-kappaB and the link between inflammation and cancer. *Immunol Rev.* 2012;246(1):379-400.
39. Wullaert A, Bonnet MC, Pasparakis M. NF-kappaB in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. *Cell Res.* 2011;21(1):146-158.
40. Ferruzza S, Rossi C, Scarino ML, Sambuy Y. A protocol for *in situ* enzyme assays to assess the differentiation of human intestinal Caco-2 cells. *Toxicol In Vitro.* 2011;26(8):1247-1251.
41. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol.* 2005;21(1):1-26.
42. Ferruzza S, Rossi C, Scarino ML, Sambuy Y. A protocol for differentiation of human intestinal Caco-2 cells in asymmetric serum-containing medium. *Toxicol In Vitro.* 2012;26(8):1252-1255.
43. Cencic A, Langerholc T. Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology-a review. *Int J Food Microbiol.* 2010;141 Supl 1:S4-S14.
44. Lakhdari O, Tap J, Beguet-Crespel F, Le Roux K, de Wouters T, Cultrone A, Nepelska M, Lefevre F, Dore J, Blottiere HM. Identification of NF-kappaB modulation capabilities within human intestinal commensal bacteria. *J Biomed Biotechnol [Internet].* 2011 [citado 2014 Enero 21];2011. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2011/282356/>

45. Lakhdari O, Cultrone A, Tap J, Gloux K, Bernard F, Ehrlich SD, Lefevre F, Dore J, Blottiere HM. Functional metagenomics: a high throughput screening method to decipher microbiota-driven NF-kappaB modulation in the human gut. PLoS One [Internet]. 2010 [citado 2014 Enero 21];5(9):e13092. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2948039/pdf/pone.0013092.pdf>
46. Romier B, Van De Walle J, During A, Larondelle Y, Schneider YJ. Modulation of signalling nuclear factor-kappaB activation pathway by polyphenols in human intestinal Caco-2 cells. Br J Nutr. 2008;100(3):542-551.
47. Cui T, Schopfer FJ, Zhang J, Chen K, Ichikawa T, Baker PR, Batthyany C, Chacko BK, Feng X, Patel RP and others. Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators. J Biol Chem. 2006;281(47):35686-35698.
48. Munoz E, Courtois G, Veschambre P, Jalinot P, Israel A. Tax induces nuclear translocation of NF-kappa B through dissociation of cytoplasmic complexes containing p105 or p100 but does not induce degradation of I kappa B alpha/MAD3. J Virol. 1994;68(12):8035-8044.
49. Bambou JC, Giraud A, Menard S, Begue B, Rakotobe S, Heyman M, Taddei F, Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V. *In vitro* and *ex vivo* activation of the TLR5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal *Escherichia coli* strain. J Biol Chem. 2004;279(41):42984-42992.
50. Tiscornia I, Espósito P, Porro V, Hernández P, Cerecetto H, González M, Barreiro E, Bollati-Fogolín M. NF-κB Signalling Pathway: Generation and characterization of a reporter cell line of human origin. En: Jenkins N, Barron N, Alves PM, editores. Proceedings of the 21st annual meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT), Dublin, Ireland, June 7-10, 2009. New York: Springer; 2012. p. 261-263.
51. FAO/WHO. Guidelines for evaluation of probiotics in food. En: Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food; 2002 Abril 30 – Mayo 1; London, Ontario, Canada.
52. Borchers AT, Selmi C, Meyers FJ, Keen CL, Gershwin ME. Probiotics and immunity. J Gastroenterol. 2009;44(1):26-46.
53. Selmi C, Tsuneyama K. Nutrition, geoeidemiology, and autoimmunity. Autoimmun Rev. 2010;9(5):A267-A270.
54. Vieira AT, Teixeira MM, Martins FS. The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. Front Immunol [Internet]. 2013 [citado 2014 Enero 25];4:445. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3859913/>
55. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. Curr Protoc Immunol. 2001;Appendix 3:Appendix 3B.
56. Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell; 2010. xxxi, 732 p.
57. Mohamadzadeh M, Olson S, Kalina WV, Ruthel G, Demmin GL, Warfield KL, Bavari S, Klaenhammer TR. Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(8):2880-2885.
58. Liu Y, Man C, Lv X, Han L, Xue Y, Yang X, Shan Y, Zhang Y, Jiang Y. *Lactobacillus plantarum* NDC 75017 affects il-6 gene expression in Caco-2 cells. Acta Microbiol Sin. 2012;52(10):1237-1243.
59. Liu Y, Fatheree NY, Mangalat N, Rhoads JM. *Lactobacillus reuteri* strains reduce incidence and severity of experimental necrotizing enterocolitis via modulation of TLR4 and NF-kappaB signaling in the intestine. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2012;302(6):G608-G617.
60. Wagner RD, Johnson SJ. Probiotic lactobacillus and estrogen effects on vaginal epithelial gene expression responses to *Candida albicans*. J Biomed Sci. 2012;19(58):1-8.
61. Van Overtvelt L, Lombardi V, Razafindratsita A, Saint-Lu N, Horiot S, Moussu H, Mascarell L, Moingeon P. IL-10-inducing adjuvants enhance sublingual immunotherapy efficacy in a murine asthma model. Int Arch Allergy Immunol. 2008;145(2):152-162.

62. Kim H, Jung BJ, Jung JH, Kim JY, Chung SK, Chung DK. *Lactobacillus plantarum* lipoteichoic acid alleviates TNF-alpha-induced inflammation in the HT-29 intestinal epithelial cell line. *Mol Cells*. 2012;33(5):479-486.
63. UniProtKB. P42212 [Internet]. Cambridge (GB): UniProtKB/Swiss-Prot; 2014 Enero 22 [citado 2014 Febrero 02]. Disponible en: <http://www.uniprot.org/uniprot/P42212>
64. Hunt MA, Currie MJ, Robinson BA, Dachs GU. Optimizing transfection of primary human umbilical vein endothelial cells using commercially available chemical transfection reagents. *J Biomol Tech*. 2010;21(2):66-72.
65. Corish P, Tyler-Smith C. Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Eng*. 1999;12(12):1035-1040.
66. Bio-Rad. Transfection Methods: Overview [Internet]. Hercules (CA): Bio-Rad Laboratories, Inc.; 2012 [citado 2014 Enero 28]. Disponible en: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10-0826_transfection_tutorial_interactive.pdf
67. Colosimo A, Goncz KK, Holmes AR, Kunzelmann K, Novelli G, Malone RW, Bennett MJ, Gruenert DC. Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *Biotechniques*. 2000;29(2):314-318,320-322,324 passim.
68. Gibthai. FAQs [Internet]. Bangkok (TH): Gibthai Co., LTD; 2008 [citado 2014 Enero 25]. Disponible en: http://www.gibthai.com/services/faq_detail.php?page=3&type_id=7
69. Clayburgh DR, Turner JR. Transfection of Caco-2 Cells with siRNA Using the siLentFect™ Lipid Reagent [Internet]. Hercules (CA): Bio-Rad Laboratories, Inc.; 2008 Noviembre [citado 2014 Enero 28]. Disponible en: http://www.biotechniques.com/protocols/RNAi_Protocols/siRNA/Transfection-of-Caco-2-Cells-with-Using-the-siLentFect-Lipid-Reagent/biotechniques-185812.html
70. Potter H, Heller R. Transfection by electroporation. *Curr Protoc Neurosci*. 2011;Appendix 1:1E.
71. El-Guendy N, Sinai AP. Potential problems inherent in cell-based stable NF-kappaB-GFP reporter systems. *Mol Cell Biochem*. 2008;312(1-2):147-155.
72. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*. 2000;50(3):184-195.
73. Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003;14(3-4):193-209.
74. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*. 2001;11(9):372-377.
75. Contassot E, Beer HD, French LE. Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin. *Swiss Med Wkly*. 2012;142:w13590.
76. Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signal*. 2010;3(105):cm1.
77. Guo S, Al-Sadi R, Said HM, Ma TY. Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability in vitro and in vivo by inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR-4 and CD14. *Am J Pathol*. 2013;182(2):375-387.
78. HUGO Gene Nomenclature Committee. TIRAP toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein [Homo sapiens (human)] [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (NCBI); 2014 Febrero 10 [citado 2014 Febrero 13]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/114609>
79. Prince LR, Allen L, Jones EC, Hellewell PG, Dower SK, Whyte MKB, Sabroe I. The role of Interleukin-1beta in direct and Toll-Like Receptor 4-mediated neutrophil activation and survival. *Am J Pathol*. 2004;165(5):1819-1826.
80. O'Neill L. The Toll/interleukin-1 receptor domain: a molecular switch for inflammation and host defence. *Biochem Soc Trans*. 2000;28(5):557-563.
81. Seppen J, Barry SC, Klinkspoor JH, Katen LJ, Lee SP, Garcia JV, Osborne WR. Apical gene transfer into quiescent human and canine polarized intestinal epithelial cells by lentivirus vectors. *J Virol*. 2000;74(16):7642-7645.

82. Corning Incorporated. Transwell® Permeable Supports: Selection and Use Guide [Internet]. Corning (NY): Corning Incorporated; 2010 [citado 2014 Febrero 01]. Disponible en: http://catalog2.corning.com/lifesciences/media/pdf/transwell_guide.pdf
83. Khan MW, Zadeh M, Bere P, Gounaris E, Owen J, Klaenhammer T, Mohamadzadeh M. Modulating intestinal immune responses by lipoteichoic acid-deficient *Lactobacillus acidophilus*. *Immunotherapy*. 2012;4(2):151-161.
84. Mohamadzadeh M, Pfeiler EA, Brown JB, Zadeh M, Gramarossa M, Managlia E, Bere P, Sarraj B, Khan MW, Pakanati KC and others. Regulation of induced colonic inflammation by *Lactobacillus acidophilus* deficient in lipoteichoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108 Supl 1:4623-4630.
85. Santos Rocha C, Lakhdari O, Blottiere HM, Blugeon S, Sokol H, Bermudez-Humaran LG, Azevedo V, Miyoshi A, Dore J, Langella P and others. Anti-inflammatory properties of dairy lactobacilli. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18(4):657-666.
86. DIEA - Estadísticas Agropecuarias (UY). Anuario Estadístico Agropecuario 2012 [Internet]. Montevideo: Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca; 2012 [citado 2013 Septiembre 10]. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/Dieaanterior/Anuario2012/DIEA-Anuario-2012web.pdf>
87. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. Londres (GB): Methuen; 1959. 238 p.
88. Ley 18.611. "Utilización de animales en actividades de experimentación, docencia e investigación científica". Senado y Cámara de Representantes de la República Oriental del Uruguay. (2009 Octubre 21). Disponible en: <http://www.parlamento.gub.uy/leyes/ AccesoTextoLey.asp?Ley=18611&Anchor=>
89. National Research Council (US). Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals., Institute for Laboratory Animal Research (US), National Academies Press (US). Guide for the care and use of laboratory animals. Washington (WA): National Academies Press; 2011. 220 p.
90. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* [Internet]. 2013 [citado 2013 Septiembre 20];12(86). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3750319/>
91. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(4):301-310.
92. Ley 17.164. "Regulanse los Derechos y Obligaciones relativos a las Patentes de Invención, los Modelos de Utilidad y los Diseños Industriales". Senado y Cámara de Representantes de la República Oriental del Uruguay. (1999 Septiembre 2). Diponible en: <http://www.parlamento.gub.uy/leyes/ AccesoTextoLey.asp?Ley=17164&Anchor=>