

Universidad ORT Uruguay

Facultad de Ingeniería

**GENERACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR
PRODUCTORA DE TNF- α HUMANO.**

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

Juan Manuel Valle – 233298

Tutora: Ana Paula Mulet

2022

Declaración de autoría

Yo, Juan Manuel Valle, declaro que el trabajo que se presenta en esa obra es de mi propia mano. Puedo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el proyecto final de la carrera Licenciatura en Biotecnología;
- 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.



Juan Manuel Valle

10 de marzo 2022

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutora Ana Paula Mulet por el apoyo brindado a lo largo de este proyecto. Por su disposición y mentoría en todo momento.

A la empresa Nanogrow por su disposición en todo momento y por ceder amablemente el plásmido utilizado en este trabajo.

A todas las personas del Laboratorio de Biotecnología ORT y mis compañeros de carrera que siempre estuvieron dispuestos a brindar su apoyo.

Por último, agradecer a mi familia y amigos que siempre estuvieron presentes apoyándome a lo largo de la carrera y el desarrollo del proyecto final. Sin lugar a duda sin el apoyo brindado en los momentos difíciles el camino hubiese sido muy difícil de transitar.

Resumen

El factor de necrosis tumoral (TNF) es una proteína de la superfamilia de las citoquinas con un rol preponderante en la regulación de la inflamación, la inmunidad adaptativa, la apoptosis y la respuesta autoinmune. Su producción descontrolada puede desencadenar enfermedades como aterosclerosis, artritis reumatoide, psoriasis, entre otras. Los tratamientos de estas enfermedades se basan en la producción de anticuerpos monoclonales anti-TNF- α lo cual requiere la proteína recombinante manteniendo su estructura lo más similar a la humana posible. Además de su uso médico, esta proteína es requerida para llevar a cabo un sinnúmero de investigaciones científicas que permitan comprender aún más su función y, por lo tanto, su participación en los diferentes procesos fisiológicos.

En este trabajo se propuso obtener una línea celular recombinante estable capaz de producir TNF- α . La línea celular seleccionada fue HEK-293 dado que se contaba con dicha línea en el laboratorio y es, junto a la línea celular CHO, una de las más utilizadas para realizar transfecciones estables. Se obtuvo la secuencia codificante (CDS) de TNF- α a partir de ADN copia de células HeLa tratadas con lipopolisacárido (LPS) y se clonó mediante enzimas de restricción en el plásmido pcDNA3.1. Se transformaron bacterias *Escherichia coli* con la construcción y se seleccionaron mediante PCR con cebadores específicos para el CDS de TNF- α . Las células HEK-293 se transfectaron con el plásmido pcDNA3.1+TNF- α utilizando lipofectamina y fue expuesta durante 3 semanas al antibiótico de selección G418 para eliminar las células que no fueron transfectadas en forma estable con el plásmido. En simultáneo con la transfección se envió a secuenciar el plásmido para confirmar la secuencia nucleotídica del CDS insertado. Frente a resultados no concluyentes de la secuenciación se procedió a la realización de un ensayo de restricción para confirmar si el plásmido contiene el CDS de TNF- α . Los resultados de este ensayo impulsaron un análisis retrospectivo de los pasos de digestión y concluyó que el plásmido utilizado presentaba el CDS de hC5aR1 y no el CDS de TNF- α .

A pesar de esto, se logró realizar la transfección estable de la línea HEK-293 con el plásmido pcDNA3.1_hC5aR1, esta línea celular será de utilidad para la empresa Nanogrow que la podrá utilizar para ensayos de screening y pruebas de actividad biológica de anticuerpos capaces de reconocer la proteína hC5aR1. Se llevó a cabo la caracterización de la línea celular policlonal y se logró establecer líneas celulares monoclonales.

Palabras clave

HEK-293, TNF- α , hC5aR1, transfección, monoclonal, policlonal, G418, cultivo celular.

Abreviaturas

°C: Grados Celsius

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ADNc: Ácido desoxiribonucleico copia

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

CO₂: Dióxido de carbono

CDS: Región codificante

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

Dnasa: Desoxirribonucleasa

dNTP: Nucleótidos trifosfato

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid*

g: Unidad de fuerza gravitatoria

hC5aR1: Receptor humano quimiotáctico 1 de anafilatoxina C5a

IC₅₀: Concentración que reduce a la mitad la viabilidad celular

kb: Kilobase

kDa: Kilo Dalton

L: Litro

LAB: Luria Bertani Agar

LB: Luria Bertani

LPS: Lipopolisacárido

M: Molar

mM: Milimolar

mL: Mililitro

ng: Nanogramo

PBS: *Phosphate-buffered saline*

PCR: *Polymerase chain reaction*

PRR: Receptores de reconocimiento de patrones

SFB: Suero fetal bovino

TAE: tris-acetato-EDTA

TNF- α : *Tumor necrosis factor*

μg: Microgramo

μL: Microlitro

V: Volts

v/v: Concentración volumen/volumen

w/v: Concentración peso/volumen

Índice

Tabla de contenido

1.	Introducción	11
1.1	Sistema inmune innato.	11
1.2	Sistema del complemento.....	12
1.2.1	Receptor Quimiotáctico 1 de anafilatoxina C5a.	12
1.3	Factor de necrosis tumoral- α	13
1.3.1	Producción de TNF- α a nivel celular.	13
1.3.2	Regulación de la producción de TNF- α	14
1.3.3	Funciones biológicas de TNF- α	14
1.3.4	Mecanismos efectores del TNF- α	16
1.3.5	Patogénesis asociada al TNF- α e importancia en su uso a nivel clínico.	18
1.4	Sistemas de producción de proteínas recombinantes.	19
1.5	Línea celular HEK-293.	20
1.6	Obtención de líneas celulares recombinantes.....	21
1.6.1	Transfección estable.	22
2.	Objetivos	24
3.	Metodología	25
3.1	Materiales	25
3.2	Procedimientos generales	25
3.2.1	Electroforesis de ADN/ARN en gel de agarosa.	25
3.2.2	Cuantificación de ADN.	26
3.2.3	Subcultivo de células adherentes.....	26
3.2.4	Cultivo celular.	¡Error! Marcador no definido.
3.3	Descongelado de células HeLa.	27
3.4	Inducción de la expresión de TNF- α en línea celular HeLa con LPS.	27

3.5 Extracción de ARN con TRIzol.	27
3.6 Retrotranscripción del ARNm a ANDc.	28
3.7 Obtención del ADN codificante de TNF- α a partir del ADNc.	28
3.8 Digestión del ADN codificante de TNF- α con NheI y XhoI.	29
3.9 Purificación del CDS de TNF- α digerido.....	30
3.10 Obtención del plásmido pcDNA3.1.	30
3.11 Digestión del plásmido pcDNA3.1 con NheI y XhoI.	31
3.12 Purificación del plásmido digerido.	31
3.13 Ligación entre el plásmido pcDNA3.1 y el CDS de TNF- α	31
3.14 Transformación de células competentes con el plásmido pcDNA3.1+TNF- α	32
3.15 Análisis de las placas y <i>colony</i> PCR de varias colonias presentes en la placa de transformantes con el producto de ligación.....	32
3.16 Miniprep a partir de las colonias positivas y congelado de stock bacteriano.	33
3.17 Ensayo de restricción del plásmido pcDNA3.1+TNF- α	34
3.18 Curva de muerte con antibiótico en células HEK-293.....	35
3.19 Transformación de células HEK-293 con el plásmido pcDNA3.1+TNF- α	35
3.20 Congelado de células HEK-293 TNF- α	36
3.21 Curva de crecimiento y análisis de proteínas en el sobrenadante.	36
3.22 Aislamiento clonal de células HEK-293 TNF- α	36
3.23 Ensayo de expresión.....	37
3.24 Citometría de flujo.	38
4. Resultados y discusión.....	39
4.1 Obtención de la secuencia codificante de TNF- α	39
4.2 Amplificación del CDS de TNF- α	41
4.3 Obtención del plásmido pcDNA3.1_hC5aR1.	43
4.4 Obtención del plásmido digerido.....	44
4.5 Obtención del plásmido pcDNA3.1+TNF- α	46

4.6	Curva de muerte con antibiótico en células HEK-293.....	47
4.7	Obtención de la línea HEK-293_TNF+ α estable.....	49
4.8	Caracterización de plásmido pcDNA3.1+TNF- α	49
4.9	Caracterización de crecimiento de células HEK-293_hC5aR1.....	54
4.10	Citometría de flujo	56
4.11	Ensayo de expresión del CDS de hC5aR1.....	58
5	Conclusiones y perspectivas a futuro.....	61
5.1	Conclusiones	61
5.2	Perspectivas a futuro	61
6	Bibliografía	63
7.	Anexo.....	67

1. Introducción

1.1 Sistema inmune innato.

El sistema inmune innato es considerado como la primera línea de defensa del organismo. Los principales agentes inductores de la respuesta inmune innata son los microorganismos o agentes externos. Además, también funcionan como inductores de este sistema agentes internos relacionados al daño tisular y traumatismos. Para que esta respuesta se inicie es necesario el reconocimiento, a través de receptores presentes en ciertas células, de estos inductores. Estos receptores son denominados receptores de reconocimiento de patrones o PRR. (1, 2)

Los PRR son expresados en la membrana de numerosos tipos celulares entre los que destacan los macrófagos y las células dendríticas. Dentro de los PRR podemos encontrar diferentes familias, la principal familia es conocida como receptores de tipo toll o TLR. Esta familia de receptores es considerada como el principal sistema de alarma del sistema inmune y está presente en la superficie y el citoplasma de numerosos tipos celulares del sistema inmune innato (neutrófilos, monocitos/macrófagos, células dendríticas y mastocitos). (1–3)

Cuando estos sensores reconocen algún agente inductor se inicia la fase efectora celular que consiste en la promoción de la activación de los linfocitos CD4 y CD8 y la secreción de mediadores inflamatorios. Estos mediadores inflamatorios son generalmente citoquinas y metabolitos del ácido araquidónico. Las citoquinas secretadas forman un conjunto muy numeroso y diverso de mediadores, con una gran variedad de funciones. Las citoquinas son secretadas por un gran número de células diferentes de forma transitoria. Estas son reconocidas por receptores presentes en las células para desencadenar su función efectora. A su vez, diferentes citoquinas presentan cierto solapamiento en sus funciones generando que existan sinergias y antagonismo entre ellas. Es importante destacar que una citoquina puede actuar sobre diferentes tipos celulares, generando múltiples funciones, siempre y cuando estas células presenten receptores capaces de reconocer a esta proteína. (1, 2, 4)

1.2 Sistema del complemento.

El sistema del complemento es uno de los mecanismos que forman parte de la inmunidad innata, este sistema está compuesto por más de 30 proteínas que actúan en forma de cascada para desencadenar diversas funciones efectoras. Las funciones efectoras son las siguientes: lisis, opsonización, activación, depuración de inmunocomplejos y potenciación de los linfocitos B. Los componentes que forman parte de este sistema generalmente se encuentran en un estado inactivo o con muy bajo nivel de actividad, algunas de estas proteínas son: C1, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8 y C9. (5)

Existen 3 principales vías por las cuales se activa el sistema del complemento; vía clásica, vía alternativa y vía de las lectinas. La vía alternativa y la de las lectinas cobran protagonismo como parte de la respuesta inmune innata frente al ingreso de un patógeno al organismo. En cambio, la vía clásica corresponde a un mecanismo efectivo de la respuesta humoral. (4, 5)

A lo largo de la cascada de activación del complemento, muchas de las proteínas mencionadas anteriormente sufren ataques proteolíticos por parte de ciertas enzimas produciendo de esta manera fragmentos proteicos de menor tamaño, algunos de estos fragmentos continúan con la cascada de señalización activando otras proteínas del complejo, otras desencadenan funciones efectoras y otras contribuyen a establecer un ambiente proinflamatorio. (4, 5)

1.2.1 Receptor Quimiotáctico 1 de anafilatoxina C5a.

El receptor quimiotáctico 1 de anafilatoxina C5a (C5aR1) es un receptor transmembrana que se expresa principalmente en células del sistema mieloide. Su ligando es la molécula proinflamatoria C5a generada como resultado de la proteólisis de la molécula C5 del sistema del complemento. La interacción entre el receptor C5aR1 y su ligando produce la regulación de las respuestas del sistema inmune adaptativo y el establecimiento de un microambiente inmunosupresor que impide la respuesta inmune antitumoral. (7)

1.3 Factor de necrosis tumoral- α .

El factor de necrosis tumoral (TNF) es una de las tantas proteínas que conforman la superfamilia de citoquinas que presentan un rol preponderante en la regulación de la inflamación, la inmunidad adaptativa, la apoptosis y la respuesta autoinmune.(8, 9) Dentro de todas las funciones en las que esta citoquina se ve involucrada se pueden destacar principalmente tres: induce la apoptosis mediada por caspasas, induce la liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-6 e IL8) y desempeña un rol primordial en la inflamación; también participa en los procesos de activación, proliferación, diferenciación y migración de células inmunocompetentes a través de su rol en la estimulación de la expresión de moléculas de adhesión endotelial, permitiendo el rápido transporte de los leucocitos al espacio extracelular. (10)

1.3.1 Producción de TNF- α a nivel celular.

El TNF- α es una proteína de 185 aminoácidos glicosilada en las posiciones 73 y 172. En una primera instancia esta proteína es sintetizada como propéptido (proteína transmembrana) que posteriormente es escindida por acción de una enzima conocida como TACE. Como resultado de este proceso de clivaje se obtiene la forma soluble conocida como TNF- α .(10) La forma soluble está constituida por 157 aminoácidos y constituye un peso molecular aproximado de 17 Kda, la forma activa requiere de la formación de un homotrímero, unido no covalentemente, de 51 kDa (interacción de 3 moléculas de TNF- α soluble). (9, 10)

En el organismo de los seres humanos son diversas las células que pueden desencadenar la producción de TNF- α . Algunas de estas son: linfocitos T y B, mastocitos, fibroblastos, queratinocitos, osteoblastos, entre otros. Si bien estas células son capaces de producir TNF- α , la célula que es considerada como productor primario de esta citoquina son los macrófagos. La producción puede verse estimulada por una gran cantidad de mediadores, algunos de ellos son: productos bacterianos como el lipopolisacárido (LPS), otras citoquinas como la interleucina 1 (IL-1), algunos virus como el de la influenza A, parásitos e incluso la radiación UV. (9, 13)

1.3.2 Regulación de la producción de TNF- α .

La producción de TNF- α se encuentra principalmente regulada a través de mecanismos de regulación postranscripcionales. Estos mecanismos se basan en el control de la cantidad y la calidad del ARNm que tiene como objetivo traducirse en el ribosoma y de esta manera sintetizar TNF- α . (14)

Este sistema de regulación está conformado por diversos elementos, uno de ellos es la región 3'UTR. Esta región es un elemento de control ubicado en la región 3' no traducida del ARNm. El mecanismo regulador asociado a este elemento está relacionado con su capacidad de determinar si el ARNm será degradado previo a su llegada al ribosoma o si este ARN llegará al ribosoma para traducirse a proteína, esto dependerá de ciertas proteínas que reconocen y se unen a la región AURE presente en el extremo 3'UTR del ARNm. La región 3'UTR está conformada por repeticiones de secuencias AUUUA, cuya función es promover la fragmentación rápida del ARNm en el citoplasma. Esta rápida fragmentación tiene como objetivo limitar la producción de TNF- α para que su producción se lleve a cabo exclusivamente cuando el sistema inmune necesite de su presencia. (14)

Cuando la célula requiere la presencia del TNF- α , por ejemplo, cuando hay presencia de endotoxina bacteriana, el ARNm para el TNF- α puede acumularse e incrementarse hasta 100 veces y la biosíntesis hasta en 10.000 veces, esto es posible debido a la capacidad para hacer que el ARNm existente se estabilice, aumente y sea traducido a proteína. Cuando el estímulo causante del aumento de la expresión finaliza, se reinicia la represión en la expresión del TNF- α y la tasa de biosíntesis se ve ampliamente disminuida. (14)

1.3.3 Funciones biológicas de TNF- α .

El TNF- α es, junto a la IL-1, una de las principales citoquinas involucradas en el establecimiento del shock séptico. Este cuadro clínico corresponde a una respuesta sistémica a una infección la cual provoca una elevada tasa de mortalidad. La mayoría de los síntomas observados en el shock séptico pueden atribuirse a una elevada concentración de TNF- α ,

algunos de estos síntomas son: hipotensión, fiebre, trombosis intravascular, edema pulmonar, necrosis de diversos tejidos y hemorragia. (9, 15)

Se han realizado numerosos estudios que respaldan la idea de que el TNF- α es la primera citoquina que aparece en circulación en los casos de sepsis experimental luego de administrar LPS en animales de laboratorio. Pasados 45 minutos de la administración del lipopolisacárido ya se detecta en forma sistémica el TNF- α , y su pico máximo (a los 90 minutos) coincide con el desarrollo de los síntomas clínicos de la sepsis. Además, se ha visto que el efecto letal causado por la administración intravenosa de endotoxina en ratones de laboratorio se ve suprimido por el pretratamiento con anticuerpos policlonales anti TNF- α . Es importante destacar que el TNF- α actúa en forma sinérgica con otras citoquinas, como por ejemplo la IL-1, en el desarrollo de los síntomas del shock séptico. (15, 16)

Frente a una infección, es indispensable para que se desarrolle la respuesta inmune adquirida la presentación del antígeno a los linfocitos a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). La citoquina TNF- α es capaz de inducir la expresión del complejo MHC clase I al interactuar con las células endoteliales y los fibroblastos de la dermis; y de inducir el complejo MHC de clase II en macrófagos, linfocitos B y células dendríticas. (15, 17)

Además, el TNF actúa en forma directa sobre las células del sistema inmune como linfocitos T, linfocitos B y macrófagos. En los linfocitos T, esta citoquina induce la expresión de receptores capaces de reconocer la IL-2 y potencia la producción de INF- γ , de esta forma se ve aumentada la respuesta de los linfocitos T a IL-2. En lo que respecta a los linfocitos B, se ha visto que el TNF- α actúa como factor de crecimiento para estas células y estimula la secreción de inmunoglobulina M en presencia de IL-2. (15, 18)

La citoquina TNF- α actúa directa e indirectamente sobre los macrófagos. Actúa directamente sobre estas células induciendo la síntesis de IL-1, e indirectamente al estimular la unión de los macrófagos a las células endoteliales favoreciendo de esta manera la presentación de antígeno y la activación de los linfocitos T y B. Además, cuando los macrófagos son activados por TNF- α se ha visto que estas células resultan efectivas para la eliminación de ciertos parásitos a través de la vía del óxido nítrico. (15)

El TNF- α también se caracteriza por actuar sobre diversos tejidos, algunos de ellos son: el endotelio vascular, el sistema nervioso central, hígado, pulmón, tejido muscular, sistema cardiovascular, los adipocitos, entre otros. (14) A nivel del endotelio vascular, el TNF- α presenta una actividad procoagulante que estimula la expresión de factores tisulares y suprime cofactores importantes para la actividad de la proteína C anticoagulante. A nivel de las células endoteliales el TNF- α estimula la producción de IL-1 y puede inducir la expresión de moléculas HLA-A y HLA-B, también activa antígenos que se verán involucrados en la adhesión de leucocitos y plaquetas a la superficie del endotelio. (14)

En el hígado, el TNF- α produce un aumento en la expresión de proteínas de fase aguda en los hepatocitos, generando un incremento de estas proteínas en el suero y suprimiendo la síntesis de albúmina. Además, actúa como un estimulador directo de la síntesis de lípidos circulantes, favorece la lipogénesis y aumenta la trigliceridemia. (14)

Como ya se ha mencionado anteriormente, el TNF- α es un poderoso inductor de la respuesta inflamatoria. Es capaz de inducir la producción de IL-2, IL4, IL-6, IL-10, IL-1, IL-18 IFN- γ , factor de crecimiento y transformación beta (TGF- β), factor inhibidor de la migración (MIF), entre otros. También puede inducir la producción de ciertas hormonas como son: el cortisol, la epinefrina, el glucagón, la insulina y la norepinefrina. (14)

1.3.4 Mecanismos efectores del TNF- α .

A lo largo de los años, se ha vuelto cada vez más claro que la señalización de TNF α es una serie compleja de eventos biológicos que involucran al menos a 29 miembros diferentes de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR).(19)

Cuando esta citoquina es reconocida por alguno de estos receptores se inicia una cascada de señalización mediada por proteínas intracelulares, cabe destacar que las proteínas que participan de esta cascada de señalización pueden actuar con cualquier receptor de la familia del TNF. (19)

Se ha comprobado que a través de la interacción del TNF- α y con el receptor TNFR1 se puede inducir la apoptosis y activar el factor de transcripción NF- κ B. Una vez se ha dado la interacción

entre el receptor y el ligando, la región intracelular del receptor se une a una proteína conocida como TRADD, esta proteína es un transductor de señal asociado a TNFR1 capaz de interactuar directamente con TRAF2/RIP y FADD, estas proteínas están involucradas en la activación de NF- κ B y la inducción de la apoptosis respectivamente. El papel que estas moléculas tienen en la activación de las vías señaladas anteriormente se vio respaldada por ensayos realizados en mutantes que carecen de TRAF2/RIP y FADD los cuales podían bloquear la activación NF- κ B mediada por TNF y la muerte celular respectivamente. (10, 15)

El complejo proteico formado por las proteínas TRADD, RIP y TRAF2 activa la quinasa IKK que fosforila al factor inhibitorio κ B, lo que induce su degradación por el proteosoma y la subsecuente activación del factor de transcripción NF- κ B y de la cascada de JNK/AP-1. (15)

Como ya se mencionó anteriormente y como se muestra en la figura 1, FADD es una proteína capaz de unirse a TRADD cuando la citoquina TNF- α se ha unido al receptor TNFR1. La proteína FADD posee un dominio efector de muerte que interacciona con un dominio análogo presente en la caspasa 8 inactiva, esto desencadena la activación de esta proteína. Una vez activada, la caspasa 8 es capaz de activar una caspasa efectora, por ejemplo, la caspasa 3, provocando la apoptosis de la célula. (15)

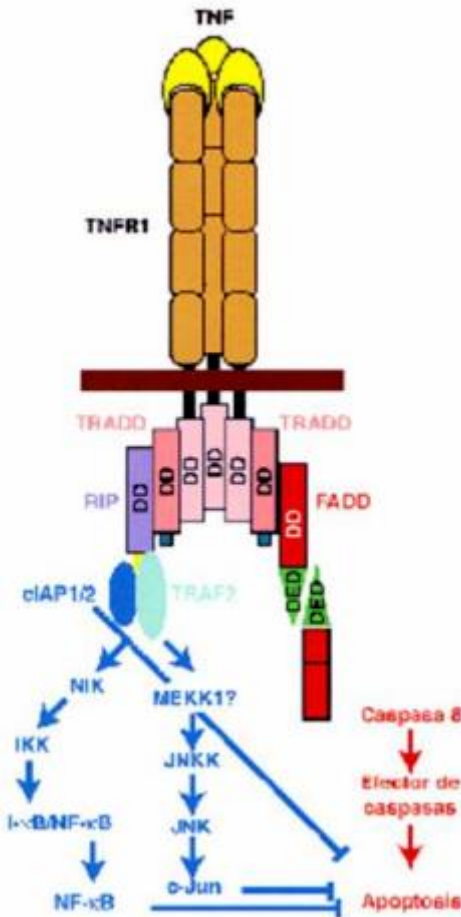


Figura 1. Vías de señalización apoptóticas y anti-apoptóticas asociadas al receptor TNFR1. Fuente: Extraído de Franco y colaboradores (15)

1.3.5 Patogénesis asociada al TNF- α e importancia en su uso a nivel clínico.

Se han realizado experimentos *in vivo* en modelos animales a los cuales se les administró lipopolisacárido bacteriano (LPS) y como resultado de esto se observó un elevado nivel de producción de TNF- α , el modelo animal presentaba muchas características comunes al shock séptico con reacciones proinflamatorias graves. Además, ratones deficientes en TNF- α no sufrieron el shock séptico luego de la administración de LPS, esto sugiere que el TNF- α desempeña un papel importante en el desarrollo de este síndrome. (19) Estos estudios indican que la generación de un nivel alto de TNF- α desencadenan una respuesta inflamatoria y prooxidativa exacerbada, este tipo de respuestas cobra un rol importante en la patogenia de muchas enfermedades. Algunas de estas enfermedades son: la aterosclerosis, la artritis

reumatoide, la psoriasis, la enfermedad inflamatoria intestinal, la enfermedad de Alzheimer y diversos trastornos pulmonares. (10, 14)

El rol preponderante que TNF- α desempeña en la regulación del sistema inmune la convierte en una de las principales moléculas utilizadas en los tratamientos de microinmunoterapia. La microinmunoterapia consiste en administrar pequeñas dosis de moléculas que nuestro sistema inmune utiliza comúnmente (por ejemplo, citoquinas) para restablecer el correcto funcionamiento de la respuesta inmune frente a patógenos. (21)

Enfermedades ya mencionadas anteriormente, como es el caso de la artritis reumatoide, tiene como uno de sus principales causantes un alto nivel de TNF- α . Actualmente existen varias drogas para tratar la artritis reumatoide cuyo principio activo se basa en un anticuerpo monoclonal anti TNF- α . Para la síntesis de estos medicamentos es necesaria la inmunización de animales con el antígeno contra el que se quieren generar los anticuerpos, en este caso TNF- α humano; para ello es necesario contar con un método para sintetizar esta proteína manteniendo su estructura y similitud respecto a la humana. De esta manera se destaca la importancia del TNF- α no solo como principio activo de un medicamento sino también como molécula necesaria para producir otras drogas. (22)

El TNF- α recombinante también cobra un gran interés en el ámbito académico. Es indispensable contar con la disponibilidad de esta proteína en forma recombinante para continuar estudiando sus funciones e implicancias en otras enfermedades, y de esta manera poder comprender mejor como pueden ser tratadas o atenuados sus síntomas. La inmunología es una disciplina aún en desarrollo y el funcionamiento de las citoquinas es un área en constante exploración que requiere la utilización y experimentación con estas proteínas.

1.4 Sistemas de producción de proteínas recombinantes.

Existen diversos sistemas de expresión para la producción de proteínas recombinantes, todos estos sistemas tienen ventajas y desventajas a la hora de utilizarlos. La utilización de un sistema u otro depende de muchos factores, uno de los más relevantes es el tipo de proteína que se quiere expresar y la presencia de modificaciones postraduccionales necesarias para que las proteínas expresadas cumplan correctamente con la función deseada. (18–20)

En el caso particular de TNF- α humano se ha logrado expresar de forma recombinante esta proteína en sistemas simples como *Escherichia coli*, sin embargo, algunos autores observaron que moléculas de TNF- α recombinante obtenidas a partir de una línea celular humana presentaban O-glicosilaciones características que no estaban presentes en las moléculas de TNF- α obtenidas a partir de *E. coli*. (26)

Las glicosilaciones son la modificación covalente más frecuente en las proteínas y ocurre por la unión de una o más cadenas de oligosacáridos a la secuencia aminoacídica. Este tipo de modificaciones les confieren ciertas características a las proteínas, entre ellas se destacan: mayor estabilidad ante las modificaciones fisicoquímicas del medio, contribuyen en su correcto patrón de plegamiento, se ven involucradas en la interacción ligando-receptor, entre otros. (27)

En el caso del TNF- α aun no son del todo conocidas las funciones que desempeñan las O-glicosilaciones ya mencionadas. Se ha visto que estas glicosilaciones pueden estar involucradas en el desprendimiento de la forma transmembrana del TNF- α con lo cual es indispensable para el proceso de síntesis, ya que sin esta liberación no se obtendría la forma soluble y funcional de la proteína. (28)

Siendo la función exacta de las glicosilaciones de esta proteína aún desconocida, es importante trabajar con proteínas recombinantes tan similares como sea posible a las que se pueden encontrar en el organismo de interés.

1.5 Línea celular HEK-293.

La línea celular HEK-293 es una línea celular derivada del riñón de un embrión humano con morfología piramidal clásica y presencia de filopodios alrededor de la membrana periférica (Figura 2). Desde que esta línea celular fue generada, hace más de 25 años, se ha utilizado ampliamente como herramienta de expresión para proteínas recombinantes. Aunque su origen es epitelial, cuenta con una maquinaria bioquímica capaz de llevar a cabo la mayor parte del plegamiento y procesamiento postraduccional necesarios para generar proteínas maduras y funcionales a partir de ADN exógeno, tanto de mamíferos como no mamíferos. Si bien esta línea es conocida por su popular utilización en la expresión transitoria de proteínas

recombinantes, también es reconocida por su capacidad de ser transformada de forma estable. HEK-293 cuenta con una serie de características que la vuelven sumamente popular a la hora de ser elegida para realizar ensayos que involucren expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero, algunas de estas características son: su rápida y fácil reproducción y mantenimiento, susceptibilidad a la transfección usando una amplia variedad de métodos, alta eficiencia de transfección y producción de proteínas, fiel traducción y procesamiento de proteínas. (29, 30)

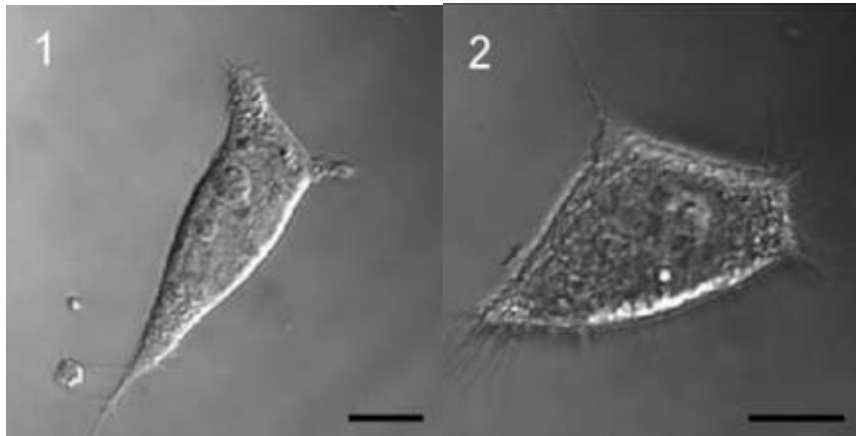


Figura 2. Morfología celular de la línea HEK-293. La imagen 1 representa una célula HEK-293 individual observada a través de un microscopio óptico, puede visualizarse su morfología piramidal clásica y sus procesos asociados. La imagen 2 destaca la presencia de filopodios alrededor de la membrana periférica. Fuente: Extraído de Thomas y colaboradores (29)

1.6 Obtención de líneas celulares recombinantes.

En la actualidad existen una gran cantidad de biofármacos en los que el principio activo está constituido por proteínas recombinantes. Los sistemas de expresión de estas proteínas se basan en la incorporación de un vector, que contiene el gen que codifica para la proteína de interés, en una célula hospedera como bacterias, levaduras y líneas celulares eucariotas. Diversos biofármacos como factores de coagulación, hormonas, citocinas y enzimas han sido aprobados para su distribución comercial. A nivel mundial hay una tendencia al alza en la demanda de medicamentos, sobre todo biofármacos, lo que conlleva a la necesidad de desarrollar un sistema de producción sustentable de biofármacos inocuos, efectivos y de costo razonable. (27)

La expresión en células de mamífero se ha convertido en el sistema dominante en lo que respecta a la producción de proteínas recombinantes para aplicaciones clínicas, esto es debido

a su capacidad para realizar modificaciones postraduccionales y el ensamblaje de la estructura molecular similar a la proteína humana. Los sistemas eucariotas introducen las siguientes modificaciones postraduccionales: glicosilaciones, eliminación de la metionina inicial, ruptura proteolítica de un precursor, formación de puentes disulfuro que darán forma a la estructura terciaria, entre otros. (19, 20, 25)

Las líneas celulares más utilizadas para la producción de proteínas recombinantes son BHK-21, HEK-293 y CHO-K1. Cuando se busca realizar una línea celular recombinante el plásmido para dicho fin debe cumplir con ciertos requerimientos, estos son: un promotor eucariota generalmente de origen viral, un sitio de clonación, una secuencia de poliadenilación, un origen bacteriano de replicación y un marcador de selección. El mecanismo por el cual se produce la introducción del vector a la célula es conocido como transfección. (19, 22)

1.6.1 Transfección estable.

La transfección es un procedimiento que se basa en la introducción de ácidos nucleicos exógenos para producir una célula genéticamente modificada. Este tipo de técnicas pueden ser utilizadas con diversos objetivos, entre ellos generar una célula capaz de producir en forma recombinante una proteína de interés. El material genético introducido (ADN y ARN) existen en las células de forma estable o transitoria dependiendo de la naturaleza de este. En la transfección estable el material genético introducido a la célula se integra al genoma del huésped y la expresión del gen se mantiene incluso después de que las células del huésped se repliquen. A diferencia de los genes transfectados de forma estable, los genes transfectados de forma transitoria sólo se expresan durante un período de tiempo limitado y no se integran en el genoma (Figura 3). (32)

Todas las transfecciones estables comienzan como una transfección transitoria, pero el uso de marcadores de selección (genes de resistencia a antibióticos) expresados en el plásmido permiten la selección de aquellas células que han logrado integrar el plásmido en su genoma. El tratamiento a largo plazo de las células con el antibiótico de selección resulta en el crecimiento de las células que incorporaron el plásmido en forma estable y la muerte de aquellas que no poseen el gen de resistencia al antibiótico de selección. (31)

Como ya se mencionó en apartados anteriores, las proteínas recombinantes tienen un rol muy importante en la industria farmacéutica como principio activo de muchos medicamentos. En ocasiones, debido al alto nivel de complejidad estructural de la proteína que se quiere producir, se requiere que la plataforma de expresión sea una línea celular de mamífero. A un nivel productivo es deseable que la producción de la proteína de interés presente alta homogeneidad y altos rendimientos, esto se logra al seleccionar los mejores clones y realizar la producción a partir de estos. La selección clonal únicamente puede llevarse a cabo a partir de una línea celular transfectada en forma estable. (33)

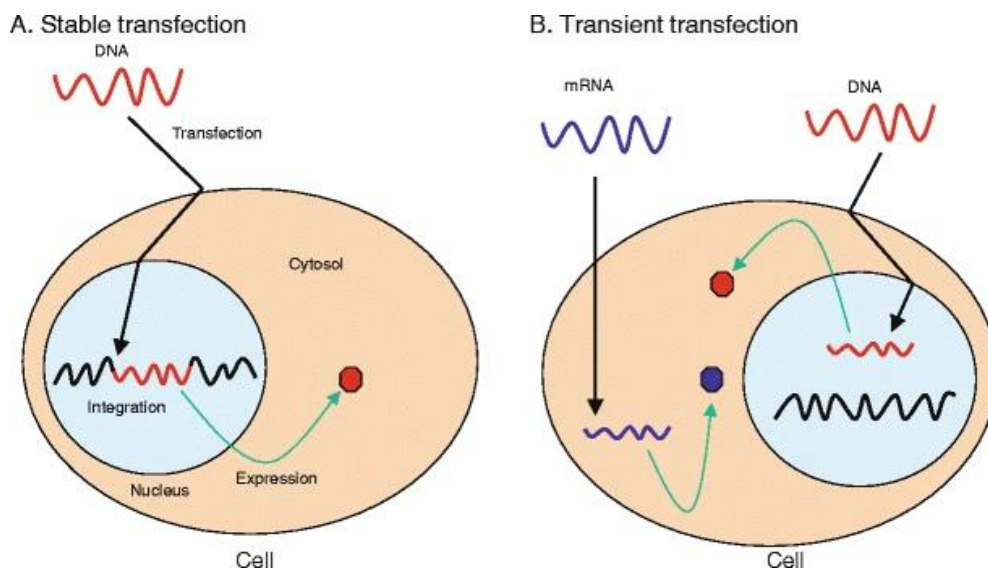


Figura 3. Esquema comparativo de lo que sucede dentro de la célula en la transfección estable (A) y la transfección transitoria (B). Fuente: Extraído de Kim y colaboradores (32)

2. Objetivos

Objetivo general: Generar una línea celular recombinante capaz de producir TNF- α humano en forma constitutiva.

Objetivos específicos:

1. Obtener una construcción conteniendo un *cassette* de expresión del CDS de TNF- α humano.
2. Obtener células HEK-293 transfectadas de forma estable con el plásmido obtenido en el punto anterior.
3. Obtener líneas monoclonales transfectantes.
4. Caracterizar las líneas recombinantes obtenidas.

3. Metodología

3.1 Materiales

•Soluciones:

Ampicilina 100 mg/mL: 1 g de Ampicilina en 10 mL de agua ultrapura.

G418 100 mg/mL: 1 g de Ampicilina en 10 mL de agua ultrapura

Azul de tripan: 0,4 g de azul de tripan en 100 mL de PBS 1X.

Cristal violeta: Cristal Violeta 0,75 % (w/v) en metanol 40% (v/v).

•Buffers:

PBS 10X: KH₂PO₄ 18 mM, Na₂HPO₄ 100 mM, NaCl 1,37 M y KCl 27 mM, pH 7,4.

Buffer TAE 50X: Tris Base 2M, Ácido acético glacial 1 M y EDTA 50 mM pH 8.0.

Buffer de carga 6X ADN: Azul de bromofenol 0,25% (w/v), Xylene Cyanol 0,25% (w/v) y glicerol 30% concentración final.

•Medios de cultivo:

Medio LB: 10 g/L Triptona, 5 g/L Extracto de levadura y 5 g/L NaCl

Medio LB Agar (LAB): 10 g/L Triptona, 5 g/L Extracto de levadura, 5 g/L NaCl y 15 g/L de agar.

3.2 Procedimientos

3.2.1 Electroforesis de ADN/ARN en gel de agarosa.

Dependiendo del tamaño que presente el ADN que se desea medir se determinó el porcentaje de agarosa adecuado para obtener una óptima separación y visualización. La masa de agarosa se colocó en buffer TAE 0,5X y se calentó la solución hasta la ebullición para lograr la completa disolución de la agarosa en el buffer. Los geles fueron suplementados con el agente intercalante GoodView™ en una concentración de 3% (v/v) para su posterior visualización en el transiluminador. Las muestras se sembraron en los pocillos correspondientes utilizando buffer

de carga 6X. Se utilizó buffer TAE 0,5X como buffer de corrida y la duración de la corrida electroforética junto al voltaje se determinó de acuerdo con el tamaño de las muestras y el grado de resolución deseada en el gel.

3.2.2 Cuantificación de ADN.

La concentración de ADN presente en las muestras analizadas se determinó mediante absorbancia a 260 nm. El grado de pureza se realizó mediante el cociente 260/280. Ambos procedimientos se llevaron a cabo en el lector de microplaca *Infinite® M200 PRO NanoQuant* (Tecan), la placa *NanoQuant Plate* (Tecan) y el software *i-control* (Tecan).

3.2.3 Cultivo celular.

Durante esta tesis se utilizaron células HEK-293 originarias de tejido riñón de un embrión humano. Esta línea celular fue cultivada a 37°C con atmosfera controlada de 5% de dióxido de carbono (CO₂) y humedad saturada.

Las células HEK-293 fueron crecidas en medio DMEM + 10% SFB.

3.2.4 Subcultivo de células adherentes.

Para despegar las células adherentes se descartó el medio de cultivo, se lavó con PBS 1X y se agregaron 20 µl/cm² de tripsina-EDTA (Sigma). El cultivo de células en contacto con la tripsina se incubó a 37°C durante 5 a 10 minutos hasta que las células se vieron con forma redondeada y dispersas en la solución. Una vez finalizado el tiempo de incubación se inactivó la tripsina agregando medio de cultivo completo (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) +10% suero fetal bovino (SFB)). A partir de la solución inactivada se realizó el recuento, repique o siembra según corresponda.

3.3 Descongelado de células.

Para descongelar las células se retiró el criovial de interés del nitrógeno líquido y se colocó en hielo. Se colocó el criovial dentro de agua previamente termostatzada a 37°C hasta que el contenido del criovial se encontrara en estado líquido. El contenido del criovial fue mezclado con 9 mL de medio completo y se centrifugó a 260 xg por 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y se resuspendió el pellet de células en 5 mL de DMEM completo. Se determinó la viabilidad y concentración celular mediante recuento en cámara de Neubauer. Teniendo en cuenta el resultado del recuento se colocaron los 5 mL de medio de cultivo en una botella T25 estéril. Se mantuvo un control sobre el crecimiento de las células hasta tener la confluencia necesaria para pasar el cultivo a una botella T75.

3.4 Inducción de la expresión de TNF- α en línea celular HeLa con LPS.

Las células HeLa fueron sembradas en una botella T75, una vez alcanzada una confluencia del 80% se trató con una concentración de 100 ng/mL de LPS durante 20 horas. (34) Posteriormente se realizó la recolección de las células con 1 mL de TRIzol (Invitrogen). Utilizando un rastrillo se levantó la monocapa, se colocó todo el volumen en un tubo eppendorf y se almacenó a -80°C hasta su uso.

3.5 Extracción de ARN con TRIzol.

La extracción de ARN a partir del cultivo de células HeLa se realizó usando TRIzol y siguiendo el protocolo provisto por el fabricante. Brevemente, se descongeló la muestra de células con TRIzol a temperatura ambiente y se le agregaron 200 μ L de cloroformo, se incubó durante 3 minutos y posteriormente se centrifugó a 12000 xg durante 15 minutos a 4°C. Luego de la centrifugación, se transfirió la fase superior (fase acuosa) a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL y se le agregó 0,5 mL de isopropanol, la solución se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó la muestra a 12000 xg durante 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 1 mL etanol 75%, se homogeneizó la muestra utilizando vortex y se centrifugó a 7.500 xg por 5 minutos a 4°C.

El sobrenadante fue descartado y se dejó evaporar el etanol durante 5 a 10 minutos. Se resuspendió el pellet en 30 μL de agua libre de nucleasas y se almacenó a -80°C hasta su uso. La concentración de ARN se determinó a través de la absorbancia 260 nm y la integridad de este fue confirmada en un gel de agarosa 1%.

3.6 Retrotranscripción del ARNm a ANDc.

La retrotranscripción del ARNm se llevó a cabo utilizando el kit M-MLV (Thermo Fisher) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, en un tubo de PCR se colocó 1 μL de oligo (dt) en una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2,5 μg de ARN total, 1 μL de dNTP's 10 mM y agua libre de nucleasas c.s.p 12 μL . La solución se incubó a 65°C durante 5 minutos, transcurrido el tiempo de incubación se la colocó en hielo rápidamente. Se le agregaron 4 μL de *First-strand Buffer 5X*, se homogeneizó la solución y se la incubó a 37°C durante 2 minutos. Luego, se agregó 1 μL de la enzima M-MLV RT y se realizó una incubación a 37°C durante 50 minutos. La enzima se inactivó a 70°C durante 15 minutos. El ANDc se almacenó a -80°C .

3.7 Obtención del ADN codificante de TNF- α a partir del ADNc.

La amplificación del CDS de TNF- α se realizó a partir del ADN genómico de células HeLa utilizando el siguiente procedimiento:

- 10 μL *Phusion HF Buffer*
- 2 μL Cebador sentido
- 2 μL Cebador antisentido
- 0,2 μL *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (NEB)
- 1 μL dNTPs 10 mM
- 2 μL de ADN molde (dilución 1/20 del ADNc)
- Agua libre de nucleasas c.s.p 50 μL

La configuración del ciclado fue la siguiente:

Desnaturalización inicial: 95°C por 1 minuto.

5 ciclos: 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 68°C por 1 minuto.

35 ciclos: 95°C por 30 segundos, 64°C por 30 segundos y 68°C por 1 minuto.

Extensión final: 68°C por 10 minutos.

El volumen total de las reacciones de PCR se corrió en un gel de agarosa, se recortó la banda de interés y se purificó utilizando el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean up system* (Promega). Brevemente, al tubo que contiene el fragmento del gel se le agregaron 10 µL de *Membrane Binding Solution* por cada 10 mg de gel a disolver, el tubo se incubó a 60°C hasta la completa disolución del gel. Luego, se colocó todo el volumen en una columna *SV Minicolumn* se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto. Se centrifugó a 16000 xg durante 1 minuto y se descartó el eluido. A continuación, se adicionaron 700 µL de *Membrane Wash Solution*, se centrifugó a 16000 xg por 1 minuto y se descartó el eluido. Se repitió el paso de lavado, pero utilizando 400 µL de *Membrane Wash Solution* y centrifugando durante 5 minutos. La columna se colocó en un nuevo tubo de elución y se centrifugó a 16000 xg por 1 minuto para eliminar todo el líquido residual de los pasos de lavado. Por último, se colocó la columna en un tubo eppendorf de 1,5 mL, se agregaron sobre la matriz 50 µL de agua libre de nucleasas y se dejó incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Se centrifugó a 16000 xg por 1 minuto para eluir el ADN.

El ADN se cuantificó de acuerdo con lo descrito en el paso 3.2.2 y se almacenó a -20°C.

3.8 Digestión del ADN codificante de TNF- α con NheI y XhoI.

El CDS de TNF- α fue digerido bajo las siguientes condiciones:

- 1 µg de ADN
- 0,5 µL de NheI (Thermo Fisher)
- 1,5 µL de XhoI (Thermo Fisher)
- 4 µL de Buffer Tango 10X
- Agua libre de nucleasas c.s.p 40 µL

La solución se incubó a 37°C durante 1 hora. Finalizado el tiempo de incubación se almacenó a -20°C hasta su uso.

3.9 Purificación del CDS de TNF- α digerido.

El ADN digerido en el paso 3.8 fue purificado utilizando el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean up system* siguiendo las instrucciones del fabricante detalladas en el punto 3.7.

3.10 Obtención del plásmido pcDNA3.1.

Se partió bacterias *E. coli* DH5 α conteniendo el plásmido pcDNA3.1_hC5aR1, las mismas fueron seleccionadas en LBA con ampicilina 100 μ g/mL, amplificadas en LB + 100 μ g/mL de ampicilina y conservadas en 30 % de glicerol a -80°C.

Se realizó una Miniprep a partir del 4,5 mL de cultivo utilizando el kit comercial *ZR Plasmid Miniprep* (Zymoresearch). Brevemente, las bacterias fueron centrifugadas y el pellet bacteriano se resuspendió en 200 μ L de Buffer P1. Luego, se le agregaron 200 μ L de Buffer P2, se homogeneizó invirtiendo el tubo varias veces y se incubó la reacción durante 1 a 2 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación, se le agregaron 400 μ L de Buffer P3, se mezcló y se incubó durante 1 a 2 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas a 12000 xg por 2 minutos y se colocó el sobrenadante a una columna *Zymo-Spin IIN*. La columna se centrifugó a 12000 xg por 30 segundos, se descartó el eluido y se le agregaron 200 μ L de *Endo-Wash Buffer*. Se centrifugó nuevamente, se descartó el eluido y se agregaron 400 μ L de *Plasmid Wash Buffer*. Por último, se colocó la columna en un tubo eppendorf de 1,5 mL y se adicionaron sobre la matriz 30 μ L de agua libre de nucleasas, se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó a 12000 xg por 30 segundos.

Luego de realizada la extracción se cuantificó la concentración de ADN y el cociente 260/280 mediante espectrofotometría. El plásmido se almacenó a -20°C hasta su uso.

3.11 Digestión del plásmido pcDNA3.1 con NheI y XhoI.

La digestión del plásmido de pcDNA3.1 se llevó a cabo utilizando el siguiente procedimiento:

- 2 µg de ADN
- 0,5 µL de NheI (Thermo Fisher)
- 1,5 µL de XhoI (Thermo Fisher)
- 4 µL de Buffer Tango 10X
- Agua libre de nucleasas c.s.p 40 µL

La solución se incubó a 37°C durante 1 hora. Finalizado el tiempo de incubación el plásmido digerido se almacenó a -20°C hasta su uso.

3.12 Purificación del plásmido digerido.

El plásmido purificado se corrió en un gel de agarosa 0.8%, la banda de interés fue cortada y purificada utilizando el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean up system* siguiendo el protocolo presente en el paso 3.7. Se cuantificó la concentración de ADN presente en la muestra purificada y se almacenó a -20°C.

3.13 Ligación entre el plásmido pcDNA3.1 y el CDS de TNF-α.

La ligación se realizó en un volumen de 20 µL utilizando la enzima T4 ligasa (Invitrogen). Se agregaron 100 ng de plásmido y se calculó la cantidad de inserto necesaria usando la siguiente

formula:
$$\frac{\text{tamaño del inserto (kb)}}{\text{tamaño del vector (kb)}} \times \frac{3}{1} = \frac{\text{ng de inserto}}{\text{ng de vector}}$$

Además, se realizó un control de religación en donde no se agregó inserto a la mezcla de reacción.

Teniendo en cuenta todo esto, la mezcla de reacción para la ligación fue la siguiente:

- 1 μ L T4 Ligasa (Thermo Fisher).
- 4 μ L Buffer ligasa 5X.
- 100 ng de pcDNA3.1 digerido.
- 44 ng de inserto digerido.
- Agua libre de nucleasas c.s.p 20 μ L

Las reacciones fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se almacenó a -20°C.

3.14 Transformación de células competentes con el plásmido pcDNA3.1+TNF- α .

Las ligaciones fueron transformadas en células DH5 α electrocompetentes. 5 μ L de la ligación y 1,8 μ L de control de religación se mezclaron con 50 μ L de competentes, el volumen total de la solución se colocó en una cuba de electroporación de 1 mm y se sometieron a un pulso de 1,8 kV.

Las células fueron resuspendidas en 1 mL de medio SOC y se incubaron por 1 hora a 37°C a 210 rpm.

Luego de la incubación el total de las células fueron sembradas en placas de LAB + 100 μ g/mL concentración final de ampicilina.

3.15 Análisis de las placas y *colony* PCR de varias colonias presentes en la placa de transformantes con el producto de ligación.

Las placas fueron analizadas visualmente en busca de diferencias significativas. Luego, 24 colonias se estriaron en placas de LAB + 100 μ g/mL de ampicilina. Con la misma ansa que se realizó el estriado se inoculó el tubo de PCR que contiene los reactivos para la amplificación del CDS de TNF- α .

La amplificación del CDS de TNF- α se realizó utilizando el siguiente procedimiento:

- 2,5 μ L de *Standard Taq Buffer* 10X
- 0,5 μ L dNTP's 10mM
- 0,5 μ L Cebador sentido
- 0,5 μ L Cebador antisentido
- 0,125 μ L *Taq DNA Polymerase* (NEB)
- Agua libre de nucleasas c.s.p 25 μ L

Se realizaron 24 reacciones de PCR (una por cada colonia analizada) con un volumen final de 25 μ L y cada tubo fue inoculado con la colonia correspondiente como se mencionó anteriormente. También se realizó un control negativo al cual se le adicionó 1 μ L de agua y un control positivo al que se le adicionó el amplicón obtenido en el paso 3.7.

El ciclado utilizado para la amplificación fue el siguiente:

Desnaturalización inicial: 95°C por 1 minuto.

5 ciclos: 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 68°C por 1 minuto.

35 ciclos: 95°C por 30 segundos, 59°C por 30 segundos y 68°C por 1 minuto.

Extensión final: 68°C por 10 minutos.

Todas las reacciones de PCR se corrieron en un gel de agarosa 1%. A partir de las estrías correspondientes a clones positivos para el PCR se realizaron cultivos líquidos en 5 mL de medio LB + 100 μ g/mL de ampicilina y se incubaron en agitación durante 16 h a 37°C.

3.16 Miniprep a partir de las colonias positivas y congelado de stock bacteriano.

A partir de cultivos líquidos obtenidos del paso anterior se tomó un 1 mL y se lo colocó en un criovial, se le agregaron 400 μ L de glicerol puro. Los crioviales fueron almacenados a -80°C.

El cultivo sobrante fue utilizado para realizar minipreps utilizando kit *ZR Plasmid Miniprep* según se detalla en el punto 3.10.

3.17 Ensayo de restricción del plásmido pcDNA3.1+TNF- α .

A partir de los plásmidos extraídos en el punto 3.16 se realizaron dos ensayos de restricción con la enzima SmoI (Thermo Fisher) y con las enzimas NdeI (Thermo Fisher) y XhoI (Thermo Fisher).

Para llevar a cabo la digestión con SmoI se realizó el siguiente procedimiento:

- 2 μ L Buffer Tango 10X
- 1 μ g del plásmido correspondiente
- 0,5 μ L de SmoI
- Agua libre de nucleasas c.s.p 20 μ L

Esta solución se incubó durante 1 hora a 55°C.

La digestión con NdeI y XhoI se realizó utilizando el siguiente procedimiento:

- 2 μ L Buffer O 10X
- 1 μ g del plásmido correspondiente
- 0,5 μ L de NdeI
- 1 μ L de XhoI
- Agua libre de nucleasas c.s.p 20 μ L

La solución fue incubada durante 1 hora a 37°C.

Finalizadas ambas reacciones de restricción, los resultados se corrieron en un gel de agarosa 1,5% a 70 V. El resultado del gel se visualizó en un transiluminador.

3.18 Curva de sensibilidad al antibiótico de selección G418 en células HEK-293.

Se sembró una placa de 96 pozos con 5000 células HEK-293 por pozo. Todos los pozos del borde fueron rellenados con 200 µL de PBS 1X. La placa fue incubada a 37°C durante 24hs.

Posteriormente, se adicionó medio de cultivo fresco con 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 µg/mL de G418 (Sigma). Las células fueron monitoreadas diariamente.

Transcurridos 7 días se midió viabilidad utilizando tinción con cristal violeta. La placa fue lavada con 200 µL de PBS 1X. Luego se les agregó 50 µL de cristal violeta 0,75% en metanol 40% a los pozos y se incubó a 37°C durante 20 minutos. Pasado el tiempo de incubación se descartó el cristal violeta por volcado en pileta y se lavó la placa sumergiéndola en un recipiente con agua. El agua residual se eliminó invirtiendo la placa en un papel absorbente para eliminarla en su totalidad. Se agregaron 250 µL de ácido acético 20% v/v a cada pozo y se homogeneizó suavemente hasta lograr una coloración uniforme. En un lector de placas se midió la absorbancia a 590 nm.

Todas las concentraciones fueron ensayadas por triplicado. Los datos fueron analizados utilizando el programa Prism 9 (GraphPad) y se realizó el *test log(inhibitor) vs. response -- Variable slope* como análisis estadístico. Dicho *test* sigue un modelo de acuerdo con la siguiente ecuación:
$$y = \frac{Bottom + (Top - Bottom)}{(1 + 10^{(LogIC_{50} - x) * HillSlope})}$$

3.19 Transfección de células HEK-293 con el plásmido pcDNA3.1+TNF-α.

Se transfectaron 3 botellas T75 con una confluencia del 70%. Para esto, se mezclaron 4,5 mL de DMEM con 45 µg de plásmido y en otro tubo 4,5 mL de DMEM con 135 µL de lipofectamina 2000 (Thermo Fisher). Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, luego se mezcló el contenido de ambos tubos e incubó esta mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación se agregaron 3 mL de la mezcla a cada botella de células HEK-293 y se colocaron en la estufa a 37°C por 20 horas.

Luego, se removió el medio de cultivo que contenía la lipofectamina y se le adicionó medio de cultivo fresco. Después de 24 horas se sustituyó el medio de cultivo por DMEM + 10% SFB con 800 µg/mL de G418. El medio de cultivo se sustituyó por medio fresco con 800 µg/mL de G418 cada 3 días durante dos semanas.

3.20 Congelado de células HEK-293 TNF- α .

Para el congelado de las células las mismas fueron despegadas de la placa con tripsina y se realizó recuento de las células totales utilizando cámara de Neubauer. Luego se centrifugó a 260 xg durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en medio de congelación (SFB + 10% DMSO) en un volumen suficiente para obtener alrededor de 3×10^6 células por mL. Esta solución fue alicuotada de a 1 mL en los crioviales y luego colocada a -80°C en el Mr. Frosty (Thermo Fisher) durante al menos 6 horas. Posteriormente los crioviales fueron colocados en nitrógeno líquido para su conservación.

3.21 Curva de crecimiento y análisis de proteínas en el sobrenadante.

Se sembró una placa de 24 pozos con 8×10^4 células por pozo en medio DMEM + 10% SFB + 800 µg/mL G418. Cada 24 horas se recogió el sobrenadante de dos pozos, se centrifugó a 260 xg durante 5 minutos y se colocó el sobrenadante en un tubo eppendorf de 1,5 mL para el posterior almacenamiento a -20°C . Mientras transcurría la centrifugación se levantaron las células presentes en los dos pozos de los que se tomó el sobrenadante con 100 µL de tripsina y se inactivó con 400 µL de DMEM + 10% SFB. El pellet resultante de la centrifugación se resuspendió con la solución de células que se obtuvo del proceso de tripsinización y realizó un recuento en cámara de Neubauer.

3.22 Clonado por dilución límite de células HEK-293 TNF- α .

Las células fueron tripzinizadas y se diluyeron a una concentración de 10 células/mL utilizando una dilución 1:1 de medio fresco y medio condicionado (sobrenadante de células HEK-293 confluentes con un mínimo de 72 h). Se realizaron 3 placas de 96 pozos, para ello se sembraron

100 μ L de esta solución en cada pozo de la placa (evitando los pozos del borde, los cuales fueron rellenos con 200 μ L de PBS 1X).

La placa fue observada diariamente, en busca de pozos con crecimiento a partir de una única célula. El medio de cultivo se cambió de acuerdo con las necesidades de cada clon. Cuando los pozos alcanzaron una confluencia cercana al 100% fueron transferidos a una placa de 24 pozos.

3.23 Ensayo de expresión.

A partir de los cultivos monoclonales obtenidos como resultado del paso 3.23 se realizó una placa de 24 pozos. Cuando los pozos alcanzaron una confluencia cercana al 100% se levantó la monocapa y se colocó todo el volumen en un tubo eppendorf. La extracción de ARN se llevó a cabo utilizando el kit *Quick-RNA Miniprep Kit* (Zymoresearch). Brevemente, se centrifugó la solución de células a 400 xg durante 5 minutos y se resuspendió el pellet de células en 300 μ L de *RNA Lysis Buffer*. Luego de homogeneizar la muestra se colocó todo el volumen en una columna *Spin-Away™ Filter* y se centrifugó a 12000 xg durante 30 segundos. Al eluido se le agregó 0,5 volúmenes de etanol 95% y se colocó toda la solución en una columna *Zymo-Spin™ IIICG Column*, se centrifugó nuevamente a 12000 xg durante 30 segundos y se descartó el eluido. La matriz de la columna se trató con DNasa durante 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se le agregó 400 μ L de *RNA Prep Buffer*. Se realizaron dos pasos de lavado con *RNA Wash Buffer* y por último se realizó la elución la muestra en 50 μ L de agua libre de nucleasas.

La concentración de ARN total se cuantificó según lo detallado en el paso 3.2.2.

Se llevó a cabo la retrotranscripción del ARNm siguiendo el protocolo detallado en el paso 3.6. Se utilizaron 200 ng de ARN total de cada muestra como molde.

El ensayo de PCR se realizó según lo detallado en el paso 3.15 utilizando como molde 1 μ L de una dilución 1/20 del ADNc obtenido previamente, los cebadores hC5AR1_FxmaI y hC5AR1_RxmaI (Tabla A1, Anexo) y una temperatura de hibridación de 61°C. Para cada muestra se largaron 3 reacciones de PCR expuestas a 15, 25 y 35 ciclos de reacción.

Los resultados de la PCR se visualizaron en un gel de agarosa 1%.

3.24 Citometría de flujo.

A partir de un cultivo de células HEK-293 y células HEK-293_hC5aR1 policlonal en botella T25 se tripzinizaron las células como se describe en el punto 3.2.3. Una vez que las células se encontraban en solución se realizó recuento en cámara de Neubauer y se colocaron un millón de células de cada muestra en tubos eppendorf. Se centrifugó a 400 xg durante 5 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante, el *pellet* se resuspendió en 100 µL de PBS 1X. Posteriormente se realizó el marcaje de ambas líneas celulares utilizando el anticuerpo *Anti-mC5aR1 PE* (*Biolegend*, #135806) en una concentración final de 1/500. Se incubó durante 1 hora en hielo, pasado el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados con 1 mL PBS 1X frío, el *pellet* resultante del último lavado se resuspendió en 100 µL de PBS 1X.

Para el análisis por citometría de flujo de las muestras se utilizó el equipo *BD Accuri™ C6 Flow Cytometer* (*BD Biosciences*).

4. Resultados y discusión

4.1 Obtención de la secuencia codificante de TNF- α .

Para obtener la secuencia codificante de TNF- α se realizó una búsqueda bibliográfica para identificar líneas celulares que expresen esta proteína. Se seleccionaron para este propósito las células HeLa debido a que se observó en la bibliografía que las mismas expresan la proteína cuando son expuestas a una concentración final de 100 ng/mL de LPS durante 20 horas, además se contaba con esta línea celular en el laboratorio. (34)

Las células fueron tratadas con una concentración final de 100 ng/mL de LPS y posteriormente se extrajo el ARN total obteniéndose 20 μ g totales a una concentración de 1188 ng/ μ L.

Para evaluar la integridad del ARN obtenido, se corrieron 3 μ g del ARN total en un gel de agarosa (Figura 4). En el gel obtenido se pudieron observar 3 bandas de aproximadamente 100, 1500 y más de 10000 pb.

La banda de mayor peso molecular probablemente corresponde al ADN genómico de la muestra, este resultado era esperable debido a que la técnica utilizada para la extracción del ARN (extracción con TRIzol) suele tener contaminación con ADN (35) y no se realizó un tratamiento con DNasa de las muestras obtenidas. En algunos casos, la presencia de contaminación de ADN podría ser un inconveniente, sin embargo, en nuestro caso, si se amplificara el gen de TNF- α (Figura 5A) en lugar del CDS (Figura 5B), la diferencia de tamaño (3970 pb vs 840 pb) permitiría separarlos con facilidad. Por este motivo no se consideró relevante realizar un tratamiento con DNasa previo a la retrotranscripción.

La banda de peso molecular intermedio correspondería al ARN ribosomal 18S. Normalmente al separar el ARN total en un gel de agarosa se deberían poder observar tres bandas correspondientes al 28S, 18S y 5S. (36) Sin embargo, el gel de agarosa utilizado en este caso

no era desnaturalizante y las estructuras secundarias del ARN pueden determinar que se observen bandas de tamaños inesperados o que no se observe alguna banda en particular. La banda de menor peso molecular correspondería a la subunidad ribosomal 5S o podría corresponder a ARN degradado.

En función de estos resultados se pudo definir que al menos gran parte del ARN obtenido se encontraba íntegro, por lo tanto, se decidió proseguir con la retrotranscripción del ARN.

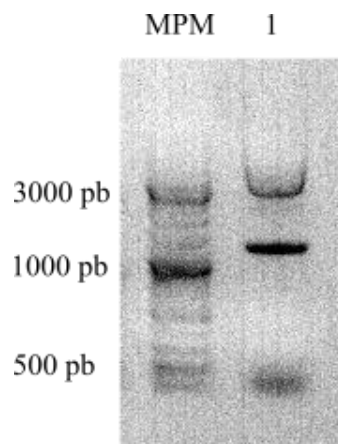


Figura 4. Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa 1% de extracción de ARN de células HeLa inducido con LPS durante 20 h. MPM: corresponde al marcador de peso molecular *GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo #SM0331)*. Carril 1: Extracción de ARN.

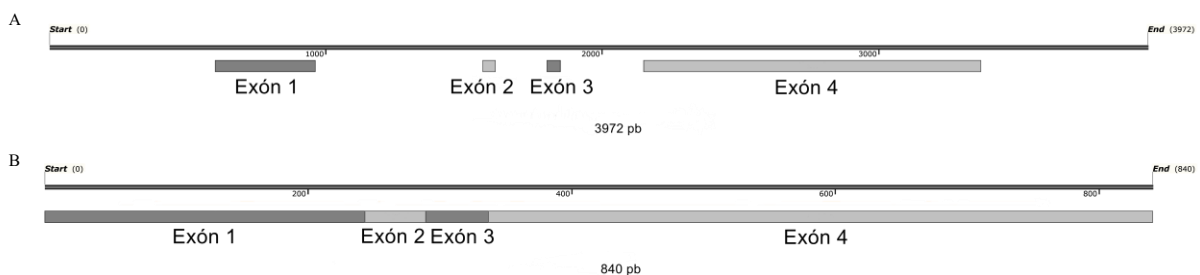


Figura 5. Comparación del gen TNF- α de 3970 pb (A) contra el CDS de TNF- α de 840 pb (B).

4.2 Amplificación del CDS de TNF- α .

A partir del ARN extraído de las células HeLa inducidas con LPS se obtuvo el ADNc a partir del ARNm utilizando la retrotranscriptasa M-MLV y oligos (dt).

Se diseñaron dos cebadores para amplificar la secuencia codificante y agregar en simultáneo los sitios de restricción para las enzimas NheI y XhoI. Estos sitios de restricción permitirán la clonación direccional del amplicón en el vector pcDNA3.1 (Tabla 1, Figura 6).

Tabla 1. Secuencia de los cebadores sentido (TNF_NheI_Fw) y antisentido (TNF_XhoI_Rv) y sus respectivos sitios de corte (subrayado).

Cebador	Secuencia
TNF_NheI_Fw	5' - CACGGCGCTAGCCTCTCTCCCCTGGAAAGGAC
TNF_XhoI_Rv	5' - TAACTCGAGAGAGGTTGAGGGTGTCTGAAGGA

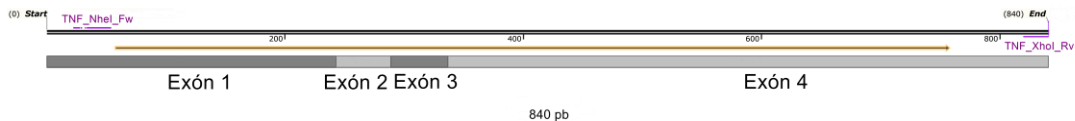


Figura 6. Sitios de unión del cebador (TNF_NheI_Fw) y el cebador (TNF_XhoI_Rv) en el CDS de TNF- α . La flecha amarilla corresponde al marco abierto de lectura.

Para obtener el CDS de TNF- α se llevaron a cabo dos reacciones de PCR con un volumen final de 50 μ L con cebadores específicos para amplificar este CDS, el objetivo de realizar dos reacciones con ese volumen final fue el de obtener grandes cantidades de amplicón para contrarrestar la posible pérdida que se genera en el paso de purificación.

Las reacciones de PCR fueron separadas mediante electroforesis y se observó una banda de entre 800 y 900 pb (Figura 7, carriles 1 y 2). El tamaño del amplicón esperado tiene un peso molecular de 830 pb, por lo que es probable que esta banda corresponda a la secuencia codificante de TNF- α . Además de la banda de interés se amplificaron 3 bandas de menor peso molecular y menor intensidad, debido a que estas bandas también están presentes en el carril 3 (control negativo) es probable que se trate de una contaminación. Para eliminar las

amplificaciones inespecíficas se realizaron ensayos modificando ciertas condiciones de la reacción, sobre todo la temperatura de la etapa de hibridación, la cual se aumentó gradualmente a la T_m de los cebadores utilizados (37). Estas modificaciones resultaron en una nula amplificación (Figura 8).

Como no se pudo remediar la amplificación inespecífica a través de modificaciones en la temperatura se decidió purificar la banda de interés a partir del gel. Una vez purificada la banda, se cuantificó y digirió con las enzimas *NheI* y *XhoI* para el clonado posterior del amplicón en el plásmido pcDNA3.1. Se obtuvieron de este proceso 650 ng de ADN a una concentración de 21,7 ng/ μ l.

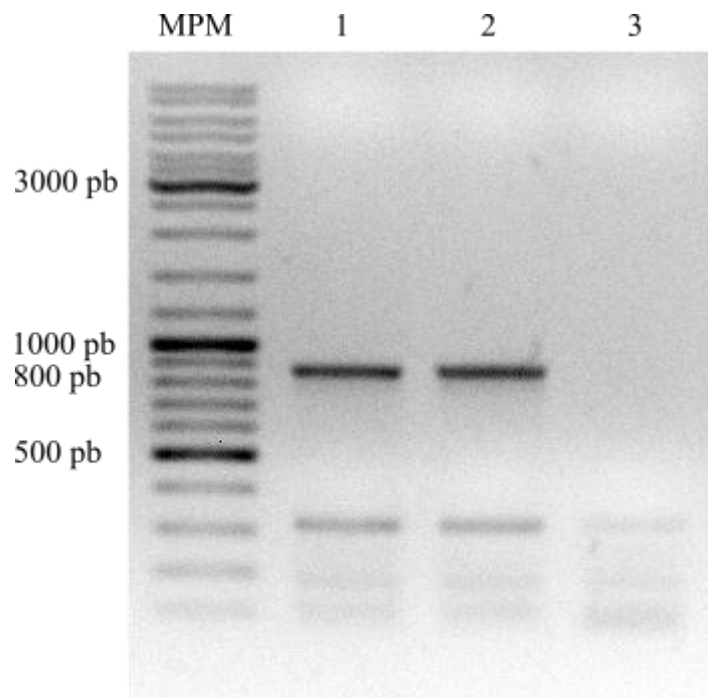


Figura 7. Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa 1% de productos de PCR amplificados con los cebadores TNF_*NheI*_Fw y TNF_*XhoI*_Rv. MPM: Marcador de peso molecular. Carril 1 y 2: Amplificación del CDS de TNF- α a partir de ADNc. Carril 3: Control negativo de la reacción de PCR.

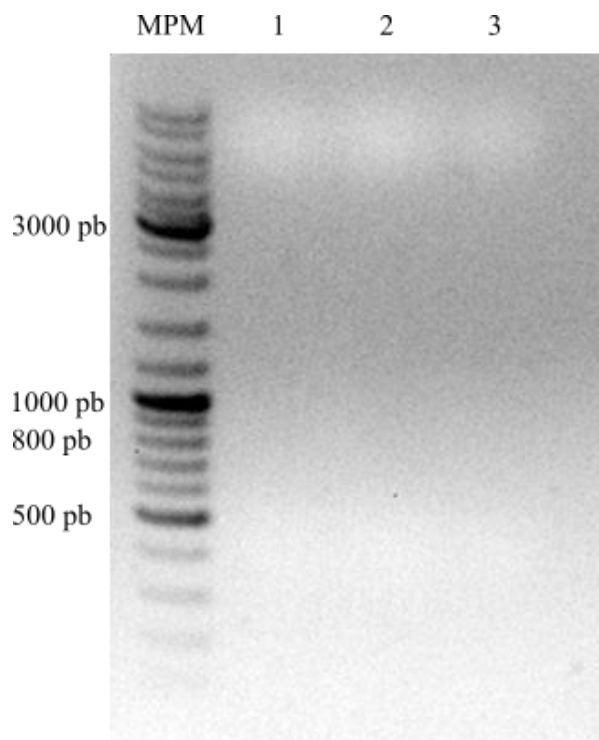


Figura 8. Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa 1% de productos de PCR con modificaciones en la temperatura de hibridación. MPM: Marcadore de peso molecular. Carril 1: Amplificación del CDS con los cebadores TNF_NheI_Fw y TNF_XhoI_Rv con etapa de hibridación a 64°C. Carril 2: Amplificación del CDS con los cebadores TNF_NheI_Fw y TNF_XhoI_Rv con etapa de hibridación a 66°C. Carril 3: Control negativo de la reacción de PCR.

4.3 Obtención del plásmido pcDNA3.1_hC5aR1.

En el laboratorio no se contaba con el plásmido pcDNA3.1 vacío por lo que se trabajó con el vector pcDNA3.1_hC5aR1, gentilmente provisto por Nanogrow. Este plásmido contenía la secuencia del CDS de hC5aR1 bajo la dirección del promotor constitutivo CMV y el terminador BGH-PolyA característicos del vector pcDNA3.1. Por lo tanto, se procedió a remplazar la secuencia codificante de hC5aR1 por la de TNF- α .

Se creció un cultivo de bacterias DH5 α transformadas con el plásmido pcDNA3.1_hC5aR1 y se realizó una extracción ADN plasmídico a partir del mismo utilizando un kit comercial para maximizar eficiencia de la extracción y la pureza del plásmido extraído ya que esto puede afectar procedimientos subsecuentes. Se obtuvieron 10,5 μ g de plásmido en una concentración de 350 ng/ μ L.

El ADN plasmídico fue visualizado en un gel de agarosa (Figura 9). Se pudo confirmar con esta electroforesis la integridad del ADN obtenido, y la ausencia de contaminación de ADN genómico y/u otros ácidos nucleicos. En cuanto al tamaño, el peso molecular esperado para el plásmido pcDNA3.1_hC5aR1 es de 6500 pb (Figura A1, Anexo). En la figura 9 se puede ver que la distancia entre las bandas correspondientes a 6000 y 8000 pb es mínima, debido a esto es muy complejo poder determinar una diferencia de 500 pb cuando analizamos ácidos nucleicos con pesos moleculares cercanos a estos valores. Las bandas obtenidas en los carriles 1 y 2 presentan un peso molecular de aproximadamente 6000 pb, este valor es muy cercano al esperado. Por estas razones se concluyó que las bandas presentes en los carriles 1 y 2 correspondan al plásmido pcDNA3.1_hC5aR1.

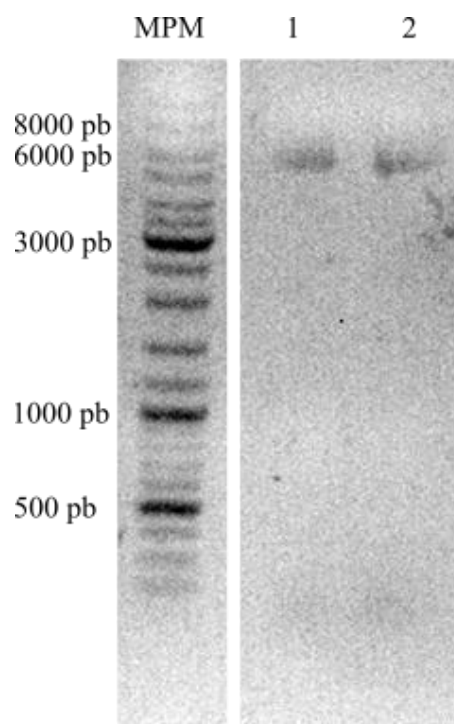


Figura 9. Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa 1% del plásmido pcDNA3.1_hC5aR1. MPM: Marcador de peso molecular. Carril 1 y 2: plásmido pcDNA3.1_hC5aR1.

4.4 Obtención del plásmido digerido.

Para poder realizar la clonación del CDS de TNF- α en el plásmido se llevó a cabo la digestión del plásmido pcDNA3.1_hC5aR1 con NheI y XhoI. Para continuar con la ligación es importante que el plásmido digerido sea separado del fragmento liberado para evitar que dicho fragmento vuelva a ligarse con el plásmido, para ello se corrió el producto de digestión en un gel de agarosa y se purificó la banda correspondiente al plásmido digerido.

Al separar el ADN digerido en un gel de agarosa se observó una banda de gran intensidad con un peso molecular cercano a los 6000 pb y otra banda muy tenue con un peso molecular aproximado de 1100 pb (Figura 10). La banda tenue correspondería al fragmento liberado como resultado de la digestión del plásmido con las enzimas NheI y XhoI correspondiente a la secuencia codificante del gen hC5aR1.

A partir de la purificación se obtuvieron 430 ng de ADN a una concentración de 14,4 ng/μl.

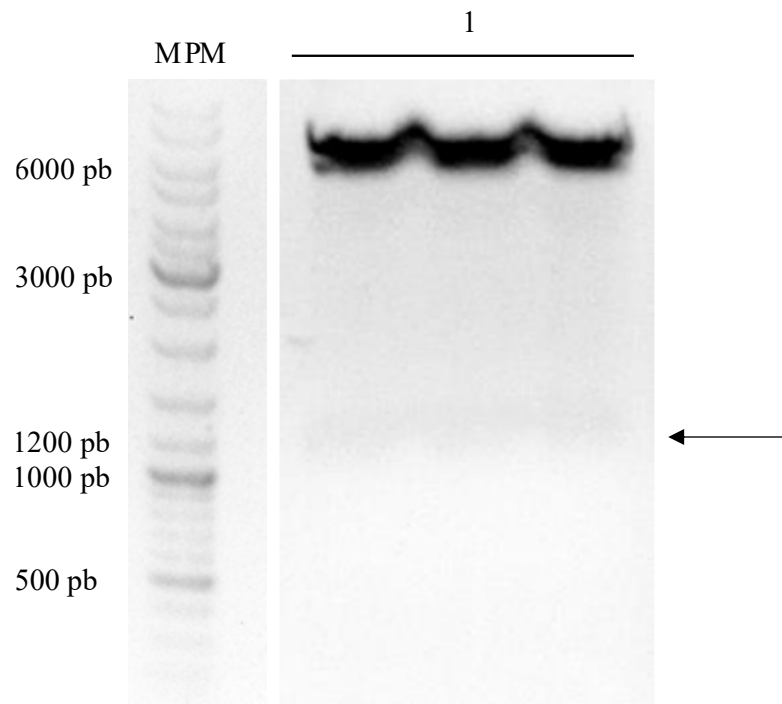


Figura 10. Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa 1% del plásmido pcDNA3.1_hC5aR1 digerido con las enzimas NheI y XhoI. MPM: Marcador de peso molecular. Carril 1: Banda de 6000 pb correspondiente al plásmido digerido y banda de 1200 pb (indicada con una flecha) correspondiente al fragmento liberado (hC5aR1).

4.5 Obtención del plásmido pcDNA3.1+TNF- α .

Con el plásmido y el CDS de TNF- α ya digeridos se procedió a realizar la ligación y la transformación por electroporación de células DH5 α competentes. Además de la ligación de interés se realizó un control de ligación en el cual se colocaron todos los reactivos excepto el inserto, este control permite evaluar la religación del vector. Las transformaciones realizadas de ambas ligaciones fueron sembradas en placas de medio LAB con ampicilina e incubadas durante 24 hs. Si bien se observaron colonias en ambas placas, el número de colonias crecidas en la placa control fueron ampliamente inferior que en la placa de pcDNA3.1+TNF- α . Esto indicaría que, si bien hubo religación del vector, se podrían encontrar colonias con el inserto de interés. En vista de este resultado se decidió seguir adelante analizando un número alto de colonias para maximizar las probabilidad de encontrar la construcción de búsqueda.

Para determinar cuáles colonias llevaban la construcción de interés, se seleccionaron 24 colonias al azar de la placa y se les realizó una PCR a partir de colonias con el objetivo de amplificar el CDS de TNF- α y de esta manera confirmar la presencia del plásmido con el inserto. De las 24 colonias analizadas 3 presentaron una amplificación del CDS capaz de ser visualizado en el gel de agarosa (Figura 11). Este resultado era esperable teniendo en cuenta la elevada cantidad de colonias observadas en la placa de control de religación, probablemente las colonias negativas correspondieran a transformaciones con el plásmido religado.

Las colonias 12, 13 y 22 fueron amplificadas en cultivos líquidos y criopreservadas. Además, se realizaron extracciones de ADN plasmídico para los siguientes usos.

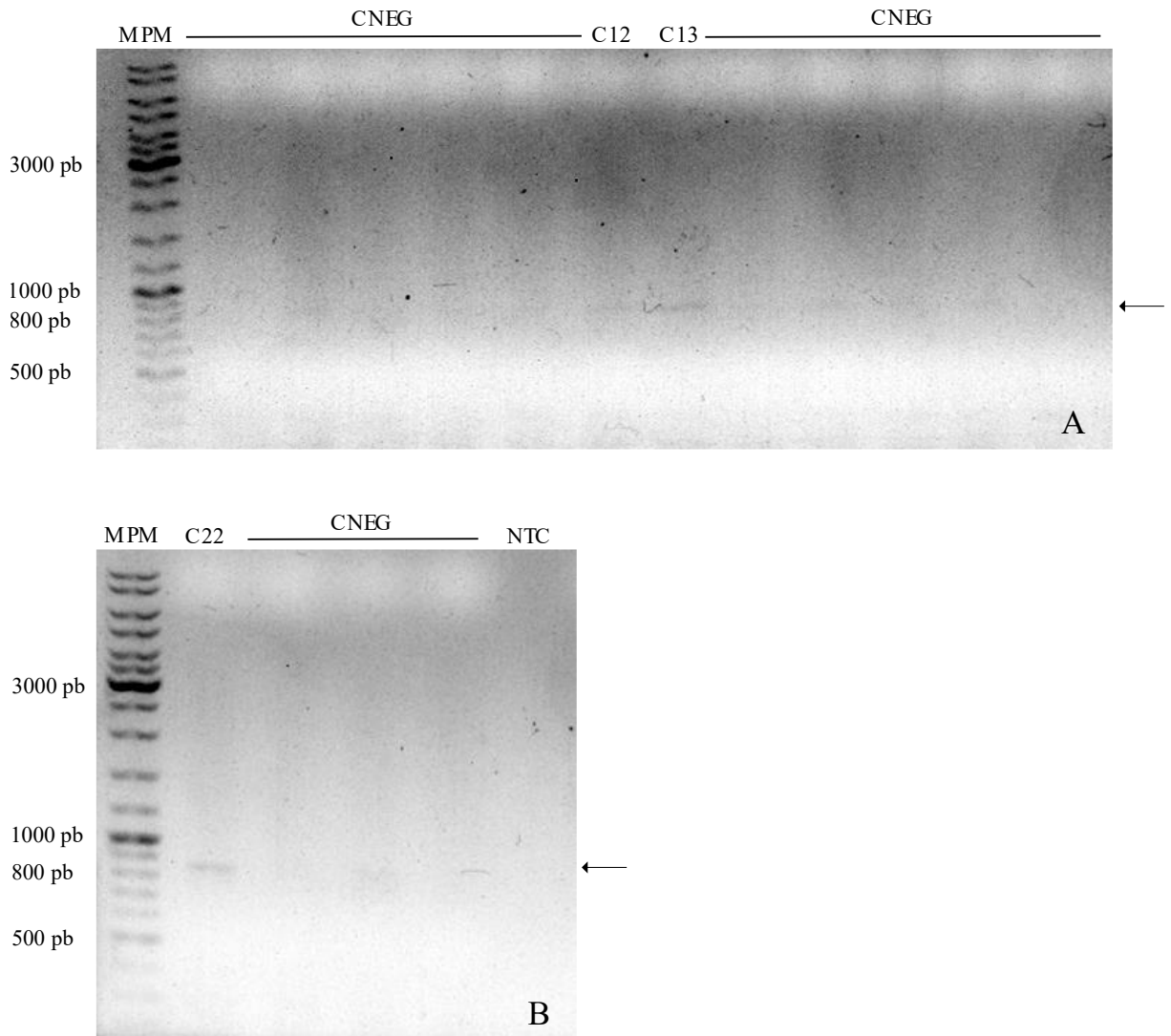


Figura 11. Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa 1% de productos de PCR amplificados con los cebadores TNF_NheI_Fw y TNF_XhoI_Rv a partir de colonias transformadas con la ligación plásmido con inserto. MPM: Marcador de peso molecular. CNEG: Corresponde a colonias que no presentaron amplificación del CDS de TNF- α . C12: Corresponde a la colonia 12, la misma presentó amplificación del fragmento de aproximadamente 800 pb (marcado con una flecha) correspondiente al CDS de TNF- α . C13: Corresponde a la colonia 13, la misma presentó amplificación del fragmento de aproximadamente 800 pb correspondiente al CDS de TNF- α . C22: Corresponde a la colonia 22, la misma presentó amplificación del fragmento de aproximadamente 800 pb correspondiente al CDS de TNF- α . NTC: Control negativo de la reacción de PCR.

4.6 Curva de sensibilidad al antibiótico de selección G418 en células HEK-293.

Previo a la transfección de las células HEK-293 se llevó a cabo una curva de muerte con el antibiótico G418 en estas células. La intención de este ensayo fue conocer la concentración

mínima de antibiótico capaz de matar en su totalidad a las células HEK-293 en un periodo de una semana. Para ello se sembró una placa de 96 pozos con la misma cantidad de células y se les agregó medio suplementado con concentraciones crecientes de G418, que van desde 0 hasta 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La muerte se determinó realizando una tinción con cristal violeta a los 7 días de incubación.

La curva obtenida a partir del análisis estadístico de los datos se corresponde con una sigmoide simétrica, curva característica de ensayos log(dosis) vs respuesta (Figura 12). Se pudo observar que a concentraciones de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del antibiótico la viabilidad fue cercana al 100% comenzando a descender a partir de una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El valor de IC50 es 306 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se observó que a partir de la concentración de 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la viabilidad fue 0. El parámetro R^2 obtenido fue de 0,97.

Para confirmar que la concentración obtenida en la curva de muerte para la línea HEK-293 era coherente se realizó una búsqueda bibliográfica. En dicha búsqueda, se encontraron reportes de curvas de muerte para el antibiótico G418 realizadas en la línea celular HEK-293 con el objetivo de transfectar en forma estable esta línea. En estos trabajos se establecieron como concentraciones de selección 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (38) y 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (39). Dichas concentraciones de antibiótico son muy similares a las obtenidas en la curva de muerte realizada en este trabajo.

A partir de los resultados obtenidos y el análisis comparativo de estos valores con los obtenidos por otros autores se decidió trabajar con una concentración de 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ya que es la concentración más baja de G418 capaz de matar en su totalidad a las células HEK-293.

Viabilidad celular vs Log [G418]

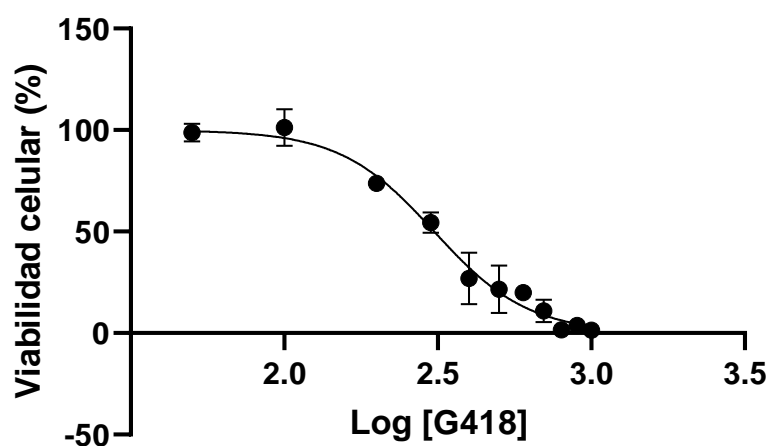


Figura 12. Curva de muerte causada por el antibiótico G418 en células HEK-293.

4.7 Obtención de la línea HEK-293_TNF+ α estable.

Para obtener la línea celular HEK-293 recombinante se transfectaron células HEK-293 con el plásmido pcDNA3.1+TNF- α (Figura A2, Anexo) obtenido a partir del clon 22 descrito en la sección 4.5. Se seleccionó para este fin del clon número 22 obtenido en el paso anterior. El cultivo de células se mantuvo en contacto con el reactivo transfectante durante 16 h. Posteriormente se removió el medio con lipofectamina y se le agregó medio fresco para que las células se recuperaran. Transcurridas 24 h se le adicionó al medio de cultivo G418 a una concentración de 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Las células transfectadas fueron expuestas durante 3 semanas al antibiótico de selección a una concentración de 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con el objetivo de seleccionar las células que habían sido transfectadas en forma estable. Esta selección se comprobó por ausencia de células muertas en el cultivo y un aumento en el número de células que formaban la monocapa. Una vez seleccionadas se procedió a realizar los ensayos correspondientes.

En simultáneo a la transfección de las células HEK-293 con el plásmido pcDNA3.1+TNF- α se envió a secuenciar dicho plásmido para confirmar su secuencia y, por lo tanto, la presencia del inserto y evaluar posible presencia de mutaciones.

4.8 Caracterización de plásmido pcDNA3.1+TNF- α .

Para secuenciar los plásmidos se seleccionó el clon 22. Se diseñaron cebadores que tenían como secuencia diana regiones del CDS de TNF- α (Figura A2, Tabla A2, Anexo). No fue posible obtener una secuencia legible con ninguno de los cebadores utilizados.

Una de las opciones por las que la secuenciación no se pudo llevar a cabo puede estar relacionado a que los cebadores a partir de los cuales se inicia la secuenciación no estén hibridando correctamente en el plásmido, se pensó que esto podría estar relacionado con diferencias entre las secuencias de TNF- α de las células HeLa y las disponibles en las bases de datos.

Para obtener algo más de información de la secuencia presente en la construcción se realizaron ensayos de restricción con diversas enzimas y se comparó el patrón de bandas obtenido en un gel de agarosa por dicho ensayo con el patrón teórico esperado para la construcción. Se seleccionó la enzima *SmoI* por su capacidad de cortar el plásmido en 7 regiones diferentes, uno de estos cortes está presente dentro del CDS de *TNF- α* . En paralelo se realizó una restricción con las enzimas *NdeI* y *XhoI* para escindir un fragmento que contenga el CDS de *TNF- α* y comparar el peso molecular del fragmento obtenido con el fragmento teórico (Figura 13).

La figura 13A representa el resultado obtenido en los ensayos de restricción para las colonias 12, 13 y 22, la figura 13B representa el resultado esperado en caso de que el CDS de *TNF- α* se haya insertado correctamente en el plásmido luego de la ligación. En lo que respecta al ensayo de restricción con *SmoI*, que corresponde a los carriles C12S, C13S y C22S (Figura 13A), se puede ver que el resultado obtenido difiere en algunas bandas respecto al esperado. La banda de 500 pb no aparece dentro del patrón de bandas del ensayo, uno de los extremos de esta banda estaba determinado por el sitio de corte de *SmoI* dentro del CDS de *TNF- α* . Además, en la figura 13A se puede ver una banda de 2400 pb (peso molecular superior al esperado) que podría corresponder a la banda de 1500 pb aproximadamente sumada a la de 500 pb que no se generó por ausencia del sitio de restricción. Aunque esto fuese así hay 400 pb adicionales de los cuales no se conoce el origen.

Respecto al ensayo de restricción con las enzimas *NdeI* y *XhoI*, podemos ver que el fragmento liberado presenta un peso molecular aproximado de 1500 pb, unos 300 pb más grande de lo esperado. Esta diferencia de tamaño se corresponde con lo observado en el ensayo con *SmoI*, con lo cual los 400 pb adicionales de los cuales no se conoce el origen se encuentran entre el sitio de restricción de la enzima *NdeI* y *XhoI*.

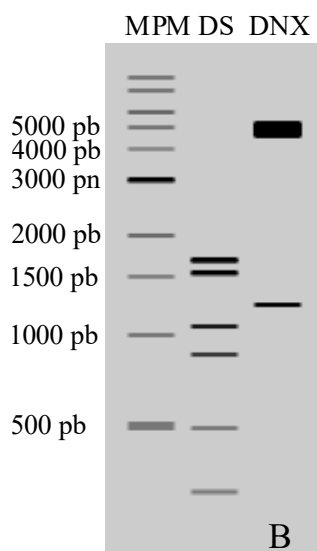
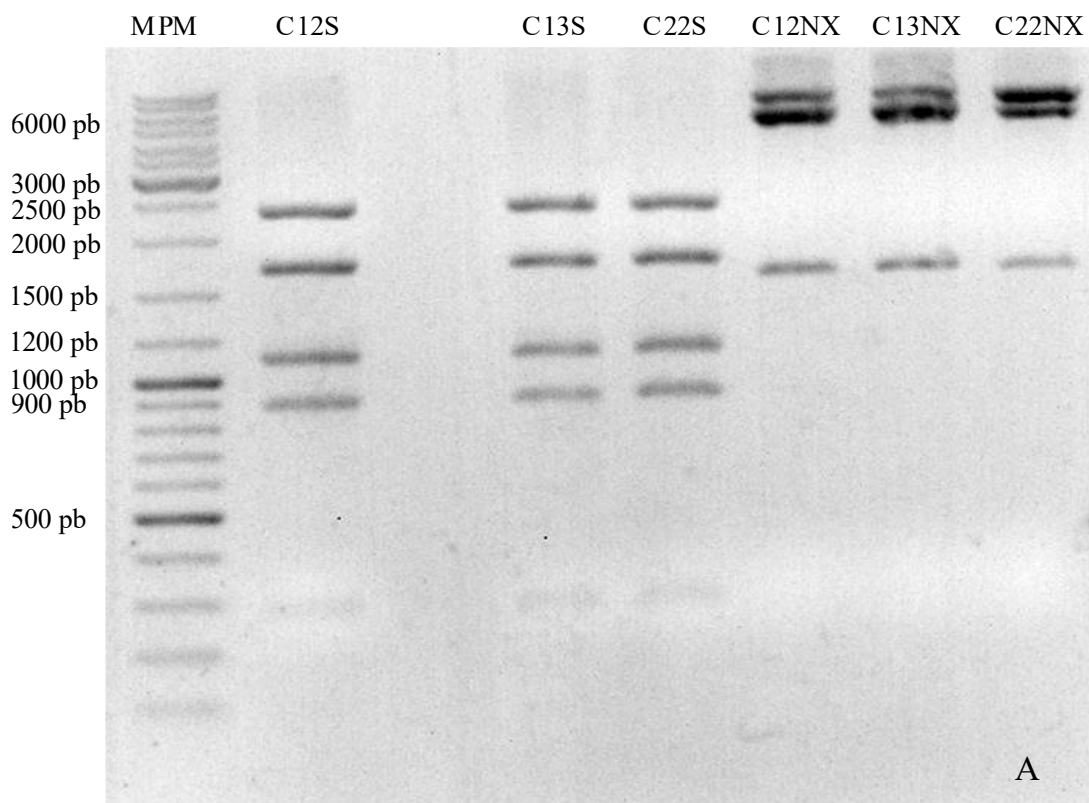


Figura 13. Ensayo de restricción realizado sobre el plásmido extraído de las colonias 12, 13 y 22 que resultaron positivas en el ensayo de *colony* PCR. (A) Resultado obtenido de los ensayos de restricción. MPM: Marcador de peso molecular. C12S: plásmido extraído de la colonia 12 digerido con enzima *SmoI*. C13S: plásmido extraído de la colonia 13 digerido con enzima *SmoI*. C22S: plásmido extraído de la colonia 22 digerido con la enzima *SmoI*. C12NX: plásmido extraído de la colonia 12 digerido con las enzimas *NdeI* y *XhoI*. C13NX: plásmido extraído de la colonia 13 digerido con las enzimas *NdeI* y *XhoI*. C22NX: plásmido extraído de la colonia 22 digerido con las enzimas *NdeI* y *XhoI*. (B) Resultados esperados en caso de que el plásmido extraído corresponda al plásmido pcDNA3.1+TNF- α . MPM: marcador de peso molecular. DS: digestión teórica del plásmido pcDNA3.1+TNF- α con enzima *SmoI*. DNX: digestión teórica del plásmido pcDNA3.1+TNF- α con las enzimas *NdeI* y *XhoI*.

Teniendo esto en cuenta se comenzaron a analizar los resultados obtenidos previo a la transfección para identificar posibles errores que no se hayan detectado en su respectivo análisis. Se comenzó analizando el procedimiento de purificación del plásmido pcDNA3.1_hC5AR1 digerido. En la figura 10 se puede observar que la banda de mayor peso molecular, en un principio correspondiente únicamente al plásmido digerido, está compuesta por dos bandas muy cercanas. Estas bandas presentan diferente peso molecular y entre ellas se interpone un delgado espacio de intensidad tenue. La banda inferior correspondería al plásmido digerido con ambas enzimas de restricción y, por lo tanto, se encuentra linealizado presentando extremos cohesivos en ambos extremos y no contiene el fragmento que se quería eliminar. La banda de mayor peso molecular posiblemente corresponda a una digestión parcial del plásmido, con lo cual aún mantiene el fragmento de 1100 pb correspondiente al CDS de hC5aR1 en su estructura. Esto pudo haber generado que a la hora de la purificación se incluyera la banda correspondiente al plásmido parcialmente digerido y, por lo tanto, que el extremo cohesivo único se religue y de esta manera el CDS de TNF- α no se encuentre presente en gran parte de los plásmidos utilizados para la transformación de bacterias DH5 α competentes.

En lo que respecta a la ligación, lo mencionado anteriormente podría explicar la presencia de colonias en la placa control. Aunque el número de colonias presentes en la placa control era considerablemente menor en comparación con la otra placa, este número era bastante elevado. Esto se debió a que gran parte del plásmido utilizado se encontraba parcialmente digerido y en el paso de ligación se religó, generando que aún en ausencia de inserto haya muchos plásmidos circularizados capaces de ser incorporados por las células DH5 α .

El resultado positivo para los PCRs de las colonias 12, 13 y 22 no resulta tan fácil de explicar. Dado que no se ve amplificación en el control sin templado se descarta la contaminación durante la PCR. Una posible explicación radica en la toma de la muestra para el PCR, las colonias que se usaron como molde provenían de la placa de la transformación original, al plaquear la transformación, también se plaquea el ADN no transformado correspondiente inserto. Al tocar la colonia con un ansa para luego hacer la PCR, se pudo haber tocado parte de la placa y levantado una pequeña cantidad del ADN correspondiente a TNF- α que se mantuvo en la superficie de esta.

En vista de lo observado la mejor explicación es que los plásmidos analizados en el ensayo de restricción corresponden al plásmido pcDNA3.1_hC5aR1 (plásmido del cual se partió). Esto cobró aún más sentido al comparar los resultados obtenidos por los ensayos de restricción presentes en la figura 13 con los resultados esperados de digerir el plásmido pcDNA3.1_hC5aR1 con las mismas enzimas de restricción (Figura 14).

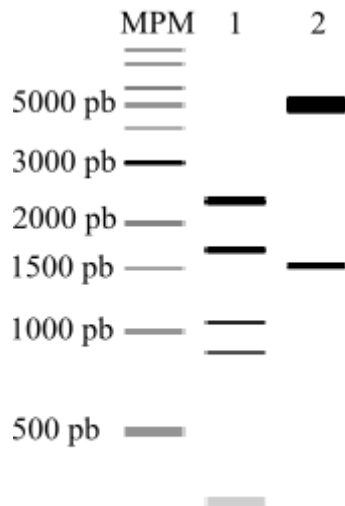


Figura 14. Resultado teórico esperado de la digestión del plásmido pcDNA3.1_hC5aR1 con las enzimas SmoI, NdeI y XhoI. MPM: marcador de peso molecular. Carril 1: digestión teórica del plásmido pcDNA3.1_hC5aR1 con la enzima SmoI. Carril 2: digestión teórica del plásmido pcDNA3.1_hC5aR1 con las enzimas NdeI y XhoI.

Para poder confirmar la presencia del CDS de hC5aR1 en el plásmido utilizado se diseñó un ensayo de restricción con la enzima EcoRV que se caracteriza por cortar dos veces al plásmido, una de ellas dentro del CDS de hC5aR1 (Figura 15). El patrón de bandas esperado para dicha restricción se presenta en la figura 15B. De la comparación de las imágenes A y B de la figura 15 se destaca una gran similitud entre el patrón de bandas obtenido (A) y el patrón de bandas esperado (B). Teniendo en cuenta la información previamente analizada y estos nuevos resultados se puede confirmar que el inserto presente en el plásmido utilizado en la transformación de las células HEK-293 es el CDS de hC5aR1.

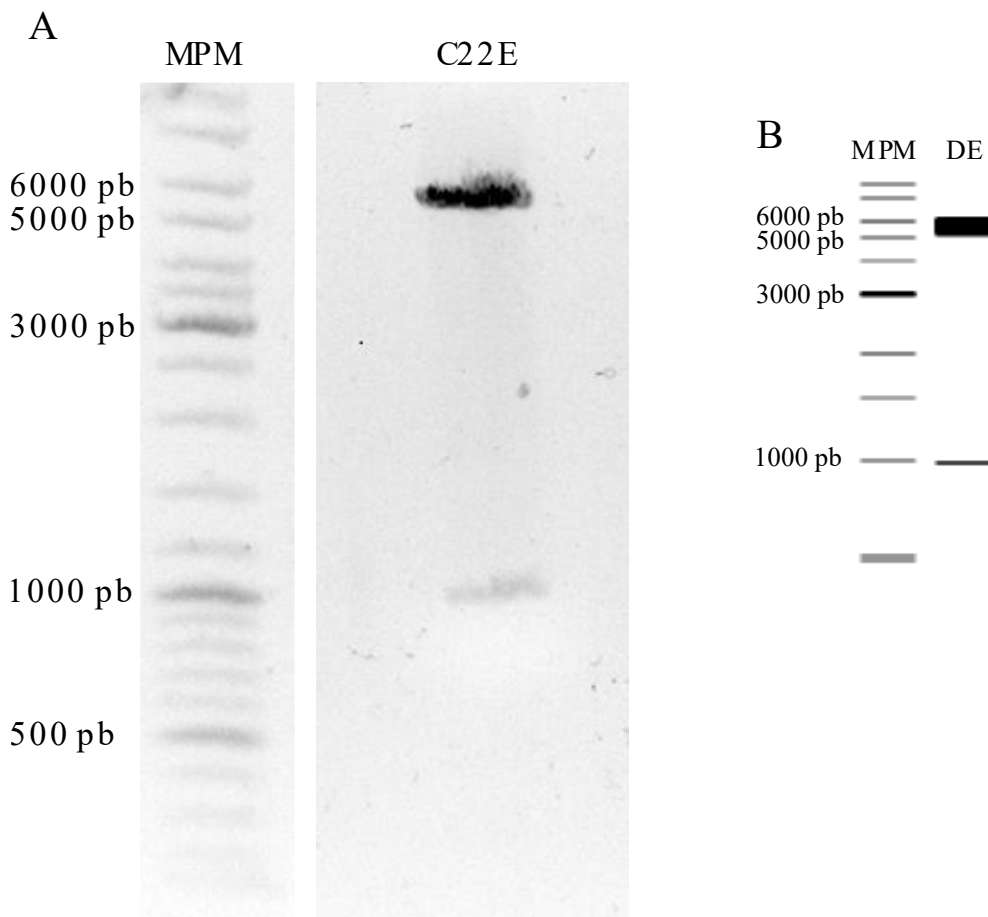


Figura 15. Ensayo de restricción realizado sobre el plásmido extraído de la colonia 22 (utilizado para transfectó HEK-293) con la enzima EcoRV. (A) Resultado obtenido de la digestión del plásmido con la enzima EcoRV. MPM: marcador de peso molecular. C22E: patrón de bandas obtenido de digerir el plásmido de la colonia 22 con la enzima EcoRV. (B) Resultado esperado en caso de que el plásmido digerido corresponda al plásmido pcDNA3.1_hC5aR1. MPM: marcador de peso molecular. DE: patrón de bandas obtenido de digerir el plásmido pcDNA3.1_hC5aR1 con la enzima EcoRV.

4.9 Caracterización de crecimiento de células HEK-293_hC5aR1.

A pesar de que la línea celular obtenida no se corresponde con lo que se buscaba en un principio se continuó trabajando con ella. El CDS con el cual se transfectó la línea HEK-293 codifica la proteína hC5aR1, la cual se expresa en la membrana de estas las células. Estas células pueden ser utilizadas por la empresa Nanogrow, incubada en el Centro Tecnológico de la Universidad, para la selección de nanoanticuerpos que reconocen la estructura tridimensional de la proteína hC5aR1, proceso conocido como *biopanning* al que es sometida la biblioteca de fagos en la técnica *Phage Display* para la selección de los fagos que expresan la proteína de interés en su

superficie. Además, esta línea celular también puede ser utilizada para llevar a cabo pruebas de actividad biológica de anticuerpos que reconocen en forma específica la proteína hC5aR1.

Para realizar la caracterización de esta línea celular se realizó un cultivo de células HEK-293_hC5aR1 policlonal en dos placas de 24 pozos con la misma cantidad de células por pozo, las placas se sembraron con una diferencia de dos días para obtener el recuento de 16 días corridos. Diariamente durante 16 días se realizó el recuento celular por duplicado, registrando los valores de células totales en el pozo y la viabilidad celular en función del tiempo (Figura 16).

El cultivo presentó una fase *lag* o de adaptación del cultivo celular de aproximadamente 1 día en el que el número de células totales se mantuvo prácticamente constante, a partir del día 2 comenzó la fase de crecimiento exponencial. Se ha reportado en bibliografía que el tiempo de duplicación de la línea HEK-293 es de 33 horas (40), en el caso de la línea recombinante HEK-293_hC5aR1 policlonal el tiempo de duplicación obtenido desde que comienza la fase de crecimiento exponencial hasta que se alcanza la fase estacionaria es de 18.9 horas. Esto implica que la línea celular recombinante presenta una tasa de crecimiento mayor respecto a la línea WT. La fase de crecimiento exponencial se extendió hasta el día 5, en el cual se inició la fase estacionaria. En esta fase se alcanzó el número máximo de células 1.1×10^6 cel/mL, debido a que la viabilidad celular se mantiene sin variaciones es probable que la cantidad de células se mantenga constante debido a la falta de superficie en el pozo, la densidad celular alcanzó su valor máximo limitando de esta manera el crecimiento, fenómeno que se conoce como inhibición por contacto (41). La fase estacionaria finalizó el día 10, dando comienzo de la fase de muerte celular, esta fase se caracteriza por presentar una tasa de muerte mucho mayor a la tasa de división celular. La fase de muerte fue la más extensa, presentó una duración aproximada de 6 días hasta que alcanzó una viabilidad celular cercana al 0%.

Curva de crecimiento de HEK-293 C5aR1

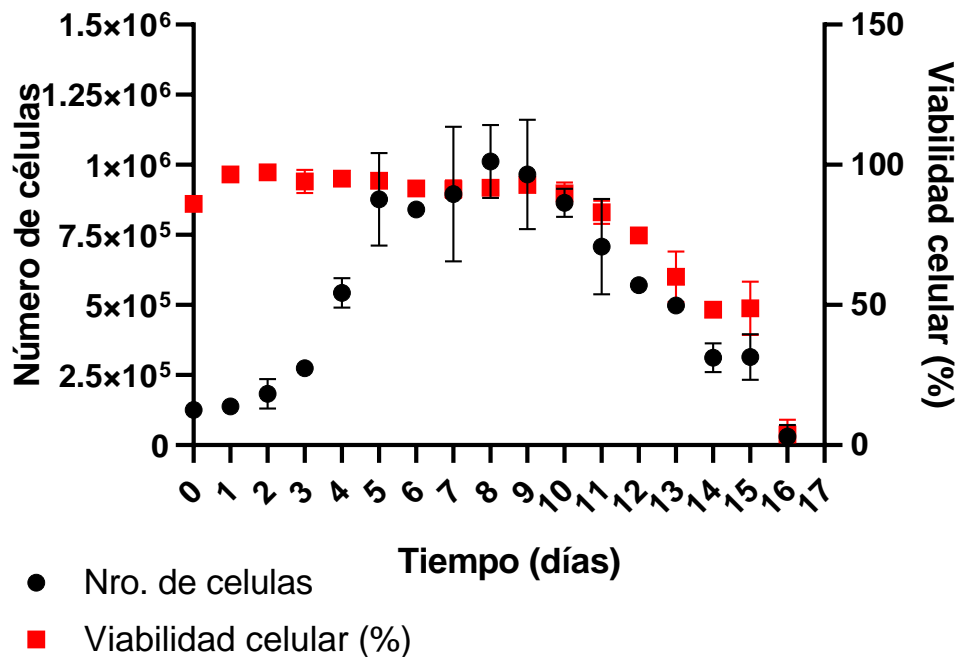


Figura 16. Curva de crecimiento de la línea celular HEK-293_hC5aR1.

4.10 Citometría de flujo

Con este ensayo se buscó determinar si es posible detectar células HEK-293 transfectadas con el plásmido pcDNA3.1_hC5aR1 (línea policlonal) con el anticuerpo *Anti-mC5aR1 PE*, que reconoce la proteína homóloga de ratón. Para ello se incubaron células HEK-293 WT y células transfectadas en presencia de dicho antibiótico y se analizaron las muestras con el citómetro de flujo *BD Accuri™ C6 Flow Cytometer* (Figura 17).

Los resultados obtenidos de la citometría de flujo para la línea WT (Figura 17A y Figura 17B) no presentan diferencias significativas respecto a los resultados obtenidos por la línea policlonal transfectadas con el plásmido pcDNA3.1_hC5aR1 (Figura 17C y Figura 17D). Este resultado puede significar que la línea celular policlonal no se encuentra produciendo la proteína hC5aR1 o, por el contrario, que la línea celular si produzca la proteína de interés y que el anticuerpo utilizado no sea capaz de reconocer dicha proteína por ser de origen humano. Teniendo en cuenta los resultados en el ensayo de expresión (Figura 18) es probable que el resultado de la citometría de flujo se deba a que el anticuerpo no es capaz de unirse a la proteína de humano y,

por lo tanto, no se detecte señal en el canal FL2-A. A partir de la secuencia proteica de hC5aR1 y mC5aR1 (Tabla A3, Anexo) se realizó un alineamiento a través de la herramienta *Blastp* de *National Center for Biotechnology Information* (Figura A3, Anexo), estas proteínas tienen entre ellas un 68% de identidad. La diferencia que presentan en su secuencia a nivel aminoacídico es considerable y, posiblemente, sea la razón por la cual el anticuerpo *Anti-mC5aR1 PE* no reconoce la proteína hC5aR1. Cabe destacar que ensayos preliminares realizados por otros investigadores con células HEK-293 transfectadas en forma transitoria con el mismo plásmido no presentó detección de la proteína hC5aR1 con el anticuerpo *Anti-mC5aR1 PE*.

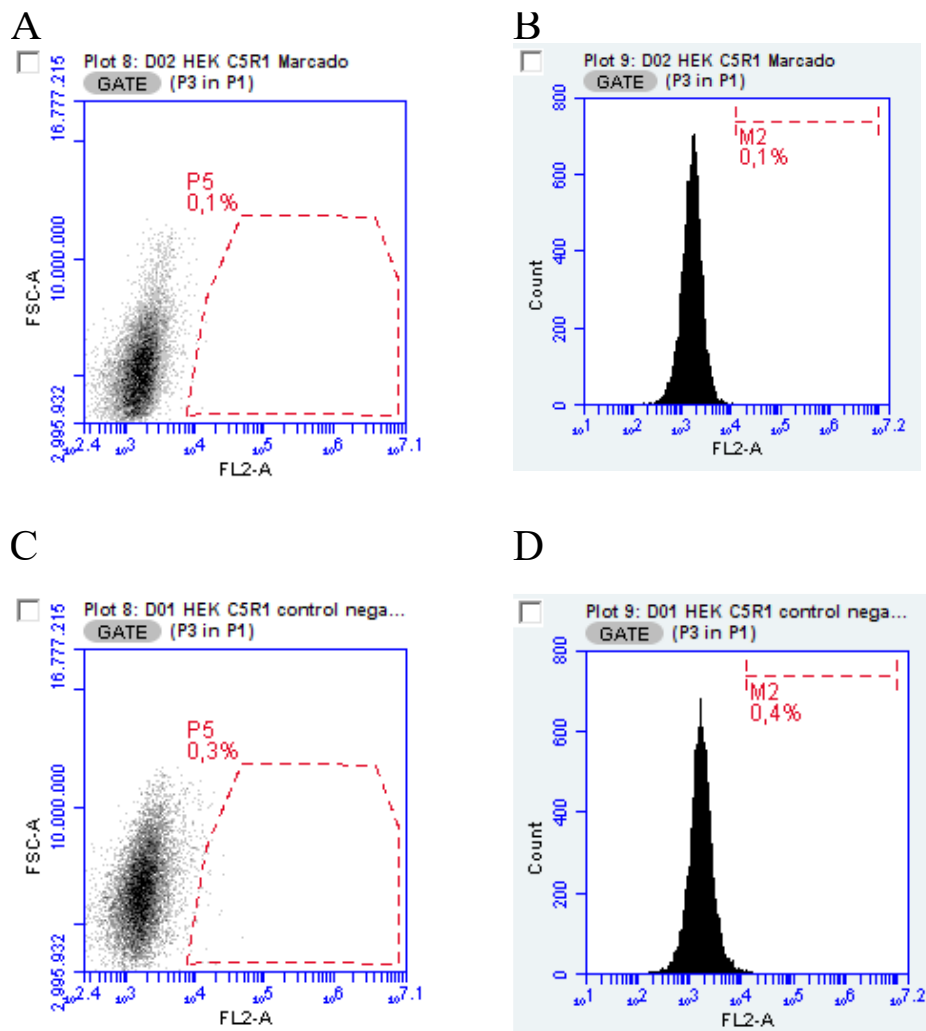


Figura 17. Análisis realizado mediante citometría de flujo de células transfectadas en forma estable. (A y B) Células HEK-293 sin transfectar marcadas con anticuerpo conjugado a *PE* analizadas en el canal FL2. (C y D) Células HEK-293 transfectadas en forma estable con el plásmido pcDNA3.1_hC5aR1 analizadas en el canal FL2.

4.11 Ensayo de expresión del CDS de hC5aR1.

Para obtener clones de la línea HEK-293_hC5aR1 se utilizó la técnica de dilución límite, basada en sembrar células a una concentración tal que permita colocar una sola célula por pozo en una placa de 96. Se realizó este ensayo con tres placas (un total de 180 pozos) y se obtuvieron 10 clones. Los mismos fueron amplificados y criopreservados.

Se realizó un ensayo para detectar la expresión de hC5aR1 en las líneas obtenidas. Para eso se eligieron 4 clones, fueron crecidos en simultaneo con la línea policlonal y con la línea HEK-293, se les extrajo de ARN total y posteriormente una retrotranscripción del ARNm utilizando oligos (dt) como cebadores. Utilizando el ADNc, se llevó a cabo un ensayo de expresión del CDS de hC5aR1 mediante una PCR tiempo final utilizando los cebadores hC5AR1_FxmaI y hC5AR1_RxmaI (Tabla A1, Anexo). La expresión del CDS de interés se evaluó comparando la intensidad de la banda del amplicón en un gel de agarosa (Figura 18). La intensidad obtenida puede llegar a compararse, puesto que se partió de la misma concentración de ARN total, si bien esta técnica no es tan confiable como un PCR en tiempo real, al realizar PCR con ciclos cortos, se puede llegar a tener una estimación de la expresión en la muestra original.

Durante el proceso de extracción de ARN es posible que se haya intercambiado el tubo correspondiente al clon 10 con el tubo control (células HEK-293). Los ensayos para determinar la expresión de hC5aR1 se continuaron llevando a cabo según lo planeado, pero teniendo en cuenta el posible error frente a resultados no esperados.

Como se muestra en la figura 18, las únicas muestras que presentaron amplificación del CDS de interés a partir del ADNc fueron la línea policlonal, el control positivo (plásmido pcDNA3.1_hC5aR1 utilizado para transfectar) y la línea HEK-293 sin transfectar. Al comparar la intensidad de las bandas obtenidas en el ciclo 35 de la reacción de amplificación se puede ver que la muestra correspondiente a la línea HEK-293 presentó una mayor intensidad de banda respecto a la línea policlonal, esto indicaría la línea HEK-293 sin transfectar presenta una mayor expresión del CDS de hC5aR1 que la línea policlonal. Definitivamente no era esperable visualizar amplificación en las células HEK-293 sin transfectar, menos aún que la expresión de dicha línea celular supere la expresión de la línea HEK-293_hC5aR1 policlonal. Además, el análisis realizado sobre las líneas celulares monoclonales no presentó amplificación del CDS

de hC5aR1, teniendo en cuenta que las células HEK-293 sin transfectar presentaron amplificación sería esperable que al menos un clon presentase expresión de este CDS, ya que es improbable que la inserción del plásmido en el genoma modifique en todos los casos la expresión normal del gen hC5aR1 en las células HEK-293. A raíz de la nula amplificación del CDS de hC5aR1 en la totalidad de los clones, la amplificación en la línea HEK-293 sin transfectar y sabiendo que en el proceso de extracción de ARN es probable que el clon 10 se haya intercambiado con la línea HEK-293 es sensato pensar que efectivamente se intercambiaron las muestras en dicho proceso.

Para confirmar si las muestras fueron intercambiadas se debería repetir este ensayo o amplificar el gen de resistencia a la neomicina utilizando como molde el ADNc del clon 10 y la línea celular HEK-293 sin transfectar. En caso de que la muestra rotulada como HEK-293 amplifique el gen de resistencia a la neomicina y el clon 10 no presente amplificación se confirmaría el intercambio de muestras.

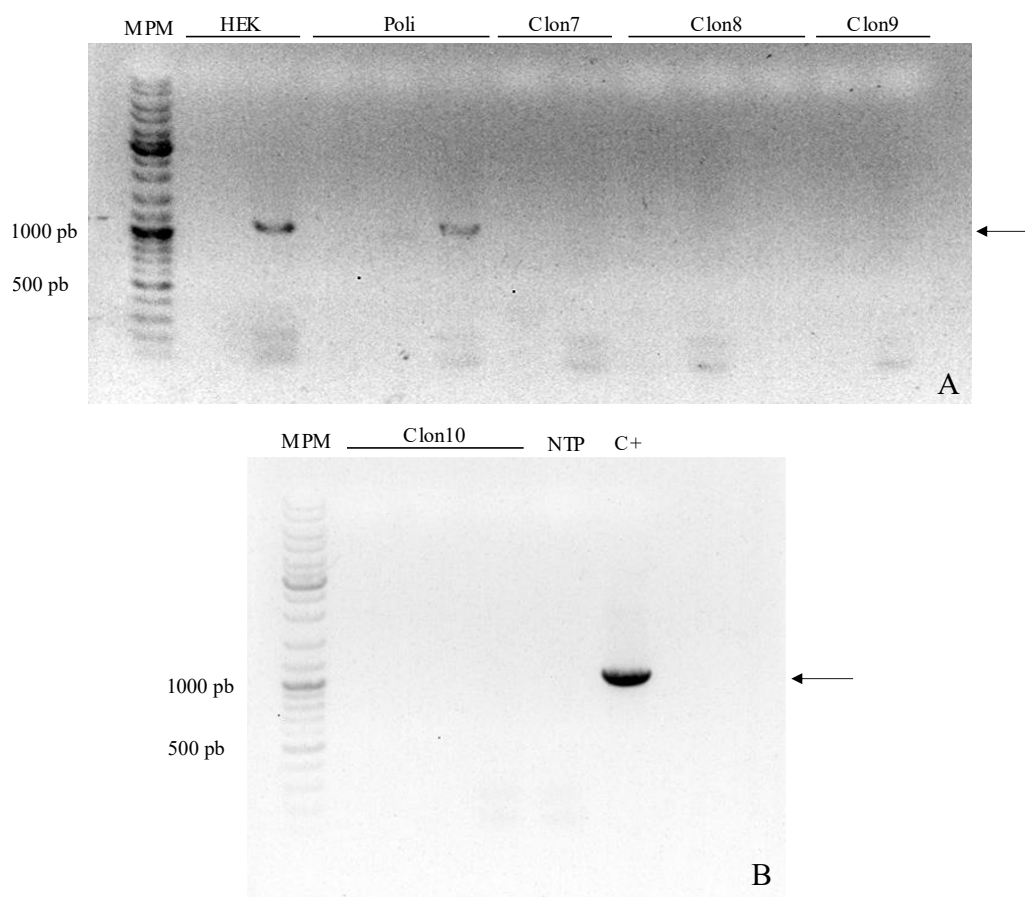


Figura 18. Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de PCR del ensayo de expresión. MPM: Marcador de peso molecular. HEK: Resultados de amplificación obtenidos para la línea HEK-293 WT en los ciclos 15 y 35 respectivamente. Poli: Resultados de amplificación obtenidos para la línea HEK-293_hC5aR1 policlonal en los ciclos 15, 25 y 35 respectivamente. Clon7: Resultados de amplificación obtenidos para el clon 7 en los ciclos 15 y 35 respectivamente. Clon8: Resultados de amplificación obtenidos para el clon 8 en los ciclos 15, 25 y 35 respectivamente. Clon9: Resultados de amplificación obtenidos para el clon 9 en los ciclos 15 y 35 respectivamente. Clon10: Resultados de amplificación obtenidos para el clon 10 en los ciclos 15, 25 y 35 respectivamente. NTC: Control negativo de la reacción de PCR. C+: Control positivo realizado con el plásmido pcDNA3.1_hC5aR1.

5 Conclusiones y perspectivas a futuro

5.1 Conclusiones

Se logró transformar en forma estable la línea celular HEK-293 con el plásmido pcDNA3.1_hC5aR1. Si bien no se logró obtener la línea celular que se estaba buscando (capaz de producir TNF- α) es importante destacar que la línea obtenida corresponde a la primera línea celular estable de mamífero generada en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay. Esto implica que en este trabajo se puso a punto el procedimiento a realizar para obtener líneas celulares estables de mamífero. La línea celular HEK-293_hC5aR1 fue caracterizada mediante una curva de crecimiento que abarcó 16 días y se comprobó que la tasa de crecimiento no se vio afectado respecto a lo reportado en la bibliografía, incluso tiene un tiempo de división menor al reportado por otros autores. A partir de la línea policlonal se lograron establecer diez líneas monoclonales, procedimiento que fue puesto a punto en este trabajo. Mediante el estudio de la expresión del CDS de hC5aR1 basado en PCR a partir del ADNc se pudo determinar que la línea policlonal presenta expresión del CDS de interés, la línea monoclonal correspondiente al clon 10 se deberá seguir estudiando para comprobar si es capaz de expresar el CDS analizado.

Por último, se determinó que el anticuerpo *Anti-mC5aR1 PE* no es capaz de marcar las células que expresan la proteína hC5aR1 y, por lo tanto, la citometría de flujo con este anticuerpo no es una opción viable para el análisis de la expresión de dicha proteína.

5.2 Perspectivas a futuro

Para confirmar que la expresión de hC5aR1 en el clon 10 de la línea recombinante se deberán repetir los ensayos de extracción de ARN y cuantificación. Queda pendiente además analizar la expresión en 6 clones.

Sería deseable el diseño de un ensayo de PCR en tiempo real para cuantificar la expresión de este gen en los clones de interés.

Debido a que no fue posible detectar la proteína hC5aR1 utilizando el anticuerpo *Anti-mC5aR1 PE* se deberá desarrollar y poner a punto un procedimiento para la detección de esta proteína en la membrana de las líneas celulares que presentaron expresión del CDS de hC5aR1. Por ejemplo, se podría analizar la expresión a nivel de proteína mediante Western blot, ELISA o inmunocitofluorescencia con anticuerpos específicos.

Por otro lado, se cuenta con el CDS de TNF- α humano y el plásmido pcDNA3.1 digerido. Con estos componentes se podría continuar con la construcción del *cassette* de expresión para transfectar en un futuro de forma estable la línea celular HEK-293 siguiendo el procedimiento desarrollado y puesto a punto en este trabajo.

6 Bibliografía

1. Reyes Martín E, Prieto Martín A, Díaz Martín D, Álvarez-Mon Soto M. Inmunidad innata e inmunidad adaptativa. *Medicine (Spain)*. 2013;11(28):1760–1767. doi:10.1016/S0304-5412(13)70553-5
2. Uthaisangsook S, Day NK, Bahna SL, Good RA, Haraguchi S. Innate immunity and its role against infections. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. 2002;88(3):253–265. doi:10.1016/s1081-1206(10)62005-4
3. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 2010;327(5963):291–295. doi:10.1126/science.1183021
4. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*. 2015;16(4):343–353. doi:10.1038/ni.3123
5. Kine A.; Lam T. “EVASIÓN PARASITARIA AL SISTEMA DEL COMPLEMENTO.” 2018.
6. Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell and Tissue Research*. 2011;343(1):227–235. doi:10.1007/s00441-010-1034-0
7. Li XX, Lee JD, Massey NL, Guan C, Robertson AAB, Clark RJ, Woodruff TM. Pharmacological characterisation of small molecule C5aR1 inhibitors in human cells reveals biased activities for signalling and function. *Biochemical Pharmacology*. 2020;180. doi:10.1016/j.bcp.2020.114156
8. Levine SJ. TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF- α).
9. González-Amaro R, Garcla-Monzón C, Garcla-Buey L, Moreno-Otero R, Alonso JL, Yag E, Pivel JP, Manuel Iapez-Cabrera ~, Fernández-Ruiz E, Sánchez-Madrid F. Induction of Tumor Necrosis Factor α Production by Human Hepatocytes in Chronic Viral Hepatitis. 1994. <http://rupress.org/jem/article-pdf/179/3/841/1104532/841.pdf>
10. Silvestre Salvador JF, Betlloch Mas I, Vergara Aguilera G. Fármacos anti-factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en dermatología: aplicaciones actuales y efectos adversos. *Piel*. 2004;19(3). doi:10.1016/s0213-9251(04)72824-5
11. Fragoso JM, Vargas Alarcón G, Morales SJ, Daniel O, Hernández R, Bello JR. El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en las enfermedades autoinmunes (EA): biología molecular y genética ARTÍCULO DE REVISIÓN Correspondencia. 2014.
12. Jang DI, Lee AH, Shin HY, Song HR, Park JH, Kang TB, Lee SR, Yang SH. The role of tumor necrosis factor alpha (Tnf- α) in autoimmune disease and current tnf- α

- inhibitors in therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(5):1–16. doi:10.3390/ijms22052719
13. Miettinen M, Vuopio-Varkila J, Varkila K. Production of Human Tumor Necrosis Factor Alpha, Interleukin-6, and Interleukin-10 Is Induced by Lactic Acid Bacteria. 1996. <https://journals.asm.org/journal/iai>
14. Anaya JM. Descripción Molecular del TNF- α . 2003.
15. Franco DL. Mecanismos moleculares de sensibilización y protección de la apoptosis inducida por TNF-a. 2003.
16. Hack CE, Aarden, LA, Thijsb LG. Role of Cytokines in Sepsis. 1997.
17. Israel A, le Bail O, Hatat D, Piette J, Kieran M, Logeat F, Wallach D, Fellous M, Kourilsky P. TNF stimulates expression of mouse MHC class I genes by inducing an NF κ B-like enhancer binding activity which displaces constitutive factors. *EMBO Journal*. 1989;8(12):3793–3800. doi:10.1002/j.1460-2075.1989.tb08556.x
18. Boussiotis VA, Nadler LM, Strominger JL, Goldfeldt AE. Tumor necrosis factor a is an autocrine growth factor for normal human B cells. 1994. <https://www.pnas.org>
19. Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK. Role of TNF α in pulmonary pathophysiology. *Respiratory Research*. 2006;7. doi:10.1186/1465-9921-7-125
20. Hsu H, Shu H-B, Pan M-G. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD Interactions Define Two Distinct TNF Receptor 1 Signal Transduction Pathways. 1996.
21. Reig L. Inmunidad, inflamación y Micro-Inmunoterapia. 2014.
22. Mora Arias TT, Andrade Ortega L, Bourlon Cuéllar RA. Medicamentos biológicos en artritis reumatoide. 2010. www.medigraphic.org.mx
23. Guerrero-Olazarán M, Cab-Barrera EL, Galán-Wong LJ, Viader-Salvadó JM, Cruz Suárez LE, Ricque Marie D, Nieto López MG, Villarreal D, Scholz U, González M. Biotecnología de Proteínas Recombinantes para la Aplicación en Acuicultura. 2004.
24. Assenberg R, Wan PT, Geisse S, Mayr LM. Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. *Current Opinion in Structural Biology*. 2013;23(3):393–402. doi:10.1016/j.sbi.2013.03.008
25. Andersen DC, Krummen L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 2002;13(2):117–123.
26. Takakura-Yamamoto R, Yamamoto S, Fukuda S, Kurimoto M. O-Glycosylated species of natural human tumor-necrosis factor. 1995.

27. Pérez-Aguilar MC, Goncalves L, Mogollón N, Bonfante-Cabarcas R. O-glicosilación incompleta en células cancerígenas y parásitos: Importancia biomédica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2006.
28. Goth CK, Halim A, Khetarpal SA, Rader DJ, Clausen H, Schjoldager KT. A systematic study of modulation of ADAM-mediated ectodomain shedding by site-specific O-glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(47):14623–14628. doi:10.1073/pnas.1511175112
29. Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2005;51(3 SPEC. ISS.):187–200. doi:10.1016/j.vascn.2004.08.014
30. Pulix M, Lukashchuk V, Smith DC, Dickson AJ. Molecular characterization of HEK293 cells as emerging versatile cell factories. *Current Opinion in Biotechnology*. 2021;71:18–24. doi:10.1016/j.copbio.2021.05.001
31. Mirna LF, Aguilar R. “DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA ESTABLE CHO-S pcDNA3/IFN- γ PARA LA PRODUCCIÓN DE IFN- γ HUMANO RECOMBINANTE” MAESTRA EN FARMACIA. 2019.
32. Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: The present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010;397(8):3173–3178. doi:10.1007/s00216-010-3821-6
33. Luthra A, Spanjaard RA, Cheema S, Veith N, Kober L, Wang Y, Jing T, Zhao Y, Hoeksema F, Yallop C, et al. STEP® vectors for rapid generation of stable transfected CHO cell pools and clones with high expression levels and product quality homogeneity of difficult-to-express proteins. *Protein Expression and Purification*. 2021;186. doi:10.1016/j.pep.2021.105920
34. Wang J, Lin D, Peng H, Shao J, Gu J. Cancer-derived immunoglobulin G promotes LPS-induced proinflammatory cytokine production via binding to TLR4 in cervical cancer cells. 2014. www.impactjournals.com/oncotarget/
35. Pinto FL, Thapper A, Sontheim W, Lindblad P. Analysis of current and alternative phenol based RNA extraction methodologies for cyanobacteria. *BMC Molecular Biology*. 2009;10. doi:10.1186/1471-2199-10-79
36. Gutiérrez Fidencio M. Establecimiento de un protocolo de extracción y purificación de RNA libre de RNA ribosomal (rRNA) de la microbioma ruminal para la generación de meta-transcriptoma por RNA-seq. 2018.

37. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*. 2012;(63).
doi:10.3791/3998
38. Balakrishnan KV, Mahdii BA, Mahdi SA, Abdullah BM, Hairunisa N, Huri HZ, Ibrahim AE, Yousif EA. Stable transfection study for cloning and expression of HIV-1 nef protein in HEK 293 cells. *Rasayan Journal of Chemistry*. 2017;10(1):176–189.
doi:10.7324/RJC.2017.1011568
39. Padmanabhan A, Liu S, Song Z. Bad plays a more significant role than Bid and Bim in mediating cell death signals in batch cultures of HEK 293 cells. *Biotechnology Letters*. 2008;30(5):819–827. doi:10.1007/s10529-007-9630-0
40. Abaandou L, Quan D, Shiloach J. Affecting hek293 cell growth and production performance by modifying the expression of specific genes. *Cells*. 2021;10(7).
doi:10.3390/cells10071667
41. Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, Xie J, Ikenoue T, Yu J, Li L, et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes and Development*. 2007;21(21):2747–2761. doi:10.1101/gad.1602907

7. Anexo

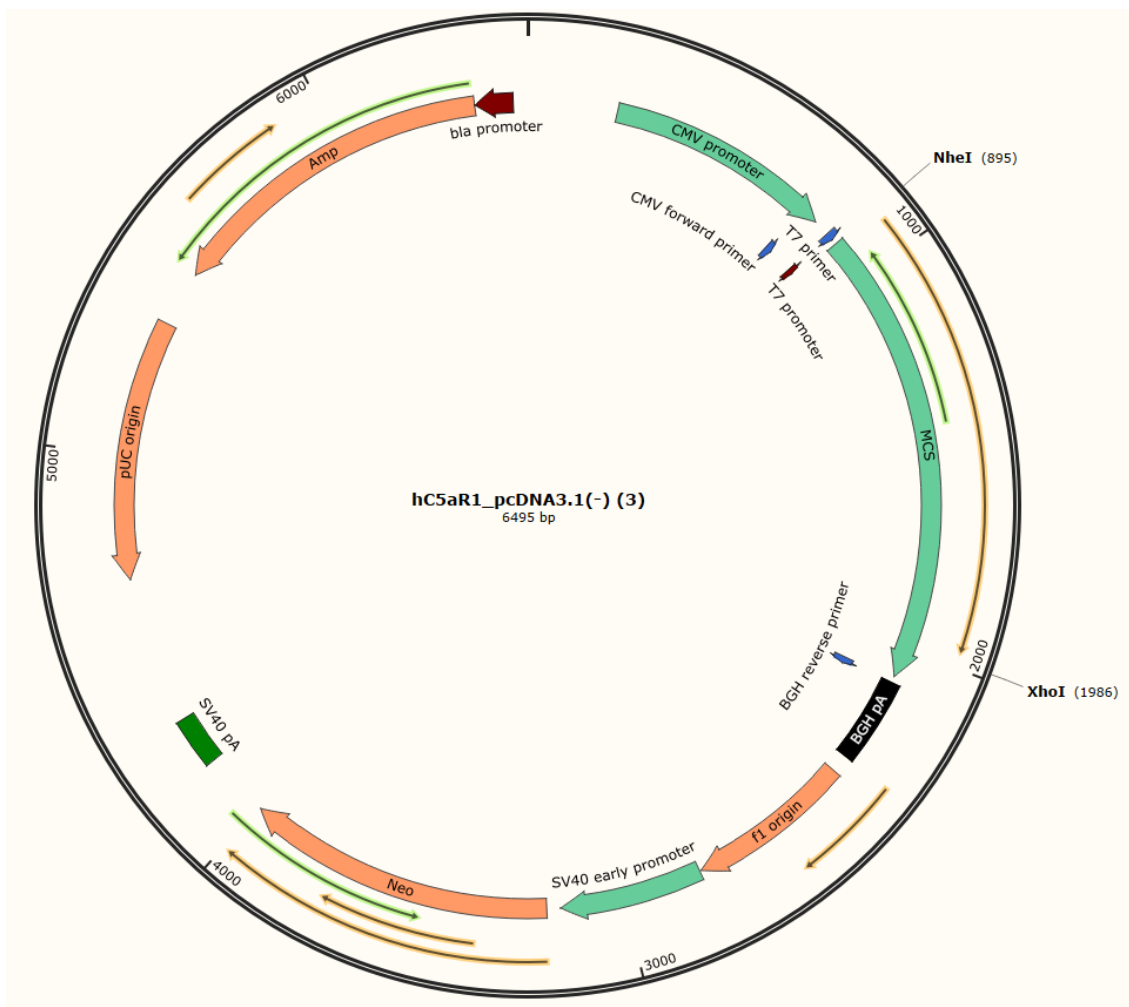


Figura A1. Mapa del plásmido pcDNA3.1_hC5aR1.

Tabla A1. Secuencia de los cebadores sentido (hC5AR1_FXmaI) y antisentido (hC5AR1_RXmaI) y sus respectivos sitios de corte para la enzima XmaI (subrayado).

Cebador	Secuencia
hC5AR1_FXmaI	5' - AATAAT <u>CCCGGG</u> GACAGCTTCAACTACACC
hC5AR1_RXmaI	5' - AATAAT <u>CCCGGG</u> ATCCTCACACGGCCTG

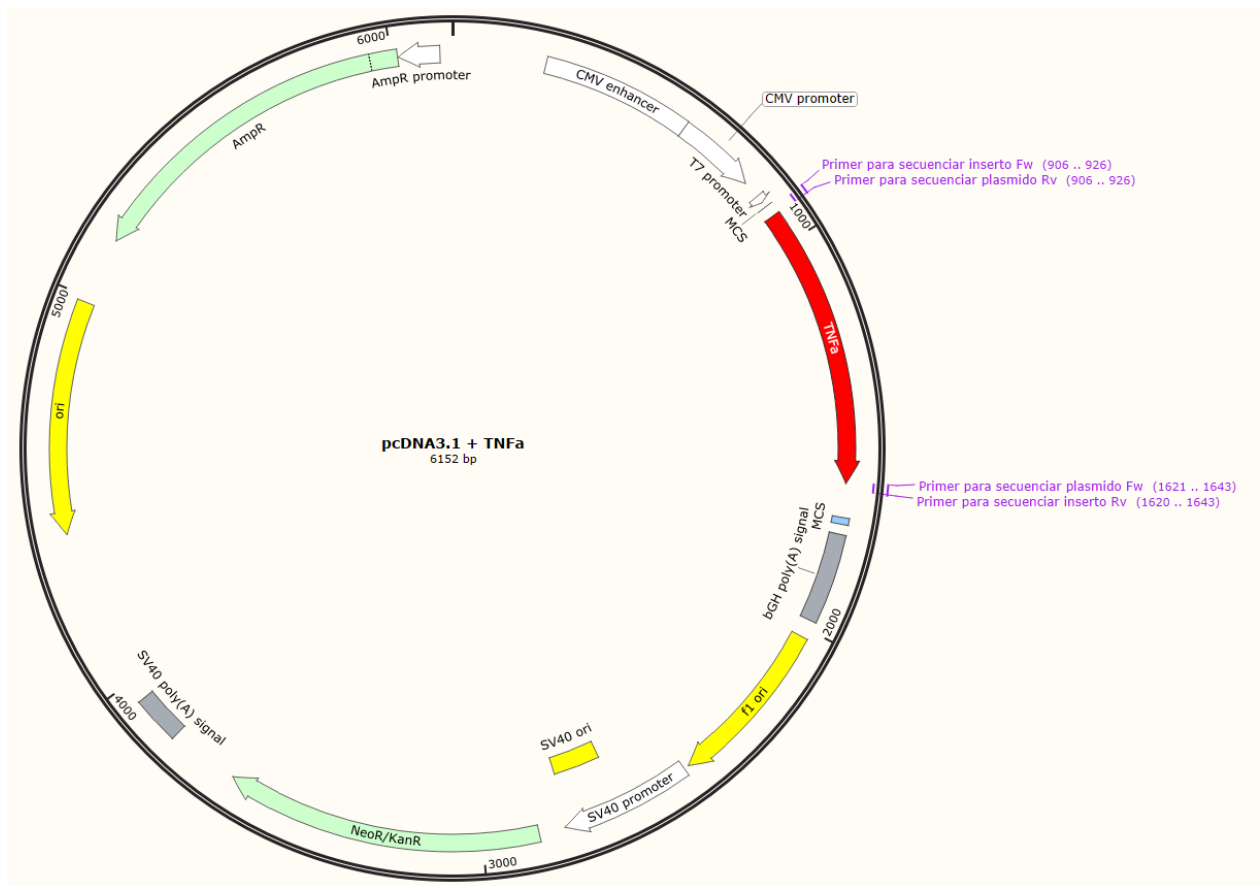


Figura A2. Plásmido pcDNA3.1+TNF- α y sitio de hibridación de los cebadores utilizados para la secuenciación.

Tabla A2. Secuencia de los cebadores utilizados para la secuenciación del plásmido pcDNA3.1+TNF- α .

Cebador	Secuencia
Cebador para secuenciar inserto Fw	5' - TCCCCTGGAAAGGACACCATG
Cebador para secuenciar inserto Rv	5' - GTTGGATGTTTCGTCCTCCTCACAG
Cebador para secuenciar plásmido Fw	5' - TGTGAGGAGGACGAACATCCAAC
Cebador para secuenciar plásmido Rv	5' - CATGGTGTCTTTCCAGGGGA

Tabla A3. Secuencia proteica de las proteínas hC5aR1 y mC5aR1.

Proteína	Secuencia
hC5aR1	MDSFNYYTPDYGHYDDKDTLDLNTVPDKTSNTRLRVPDILALVIFAVVFLVGVGNAL LVVWVTAFEAKRTINAIWFLNLAVADFLSCLALPILFTSIVQHHHWPFGGAACCSILPS LILLNMYASILLLATISADRFLLVFKPIWCQNFRGAGLAWIACAVAWGLALLLTIPSF LYRVVREEYFPPKVLCGVDYSHDKRRERAVAIVRLVGLFWPLLLTICYTFILLRTW SRRATRSTKTLKVVVAVVASFFIFWLPYQVTGIMMSFLEPSSPTFLLLKKLDSLCSVFS AYINCCINPIIYVAVAGQGFQGRLLRKSLSPLLRNVLTEESVVRRESKSFTRSTVDTMAQ KTQAV*
mC5aR1	MDPIDNSSFEINYDHYGTMDPNIPADGIHLPKRQPGDVAALIIYSVVFLVGVPGNAL VVWVTAFEARRAVNAIWFLNLAVADLLSCLALPVLFTTVLNHNHYWYFDATAACIVLP SLILLNMYASILLLATISADRFLLVFKPIWCQKVRGTGLAWMACGVAWVLALLLTIP SFVYREAYKDFYSEHTVCGINYGGSFPKEKAVAILRLMVGFLVPLLLTICYTFILL RTWSRKATRSTKTLKVVMAVICFFIFWLPYQVTGVMIAWLPPSSPTLKRVEKLNS LCVSLAYINCCVNPPIIYVMAGQGFHGRLLRSLPSIIRNALSSEDSVGRDSKTFTPSTTDT STRKSQAV*

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
471 bits(1213)	2e-172	Compositional matrix adjust.	231/341(68%)	282/341(82%)	2/341(0%)
Query 13	HYDDKDTLDLNTVPDKTSNTRLRVP-DILALVIFAVVFLVGVGNALVVWVTAFEAKRTIN				71
Sbjct 12	NYDHYGTMDPNIPADGIHLPKRQPGDVAALIIYSVVFLVGVPGNALVVWVTAFEARRAVN				71
Query 72	AIWFLNLAVADFLSCLALPILFTSIVQHHHWPFGGAACCSILPSLILLNMYASILLLATIS				131
Sbjct 72	AIWFLNLAVADLLSCLALPVLFTTVLNHNHYWYFDATAACIVLPSLILLNMYASILLLATIS				131
Query 132	ADRFLLVFKPIWCQNFRGAGLAWIACAVAWGLALLLTIPSFLYRVVREEYFPPKVLCGVD				191
Sbjct 132	ADRFLLVFKPIWCQKVRGTGLAWMACGVAWVLALLLTIPSFVYREAYKDFYSEHTVCGIN				191
Query 192	YSHDK -RRERAVAIVRLVGLFWPLLLTICYTFILLRTWSRRATRSTKTLKVVAVVAS				250
Sbjct 192	YGGGSFPKEKAVAILRLMVGFLVPLLLTICYTFILLRTWSRKATRSTKTLKVVMAVIC				251
Query 251	FFIFWLPYQVTGIMMSFLEPSSPTFLLLKKLDSLCSVFSAYINCCINPIIYVAVAGQGFQGR				310
Sbjct 252	FFIFWLPYQVTGVMIAWLPPSSPTLKRVEKLNSLCVSLAYINCCVNPPIIYVMAGQGFHGR				311
Query 311	LRKSLPSLLLRNVLTEESVVRRESKSFTRSTVDTMAQKTQAV*				351
Sbjct 312	LLRSLPSIIRNALSSEDSVGRDSKTFTPSTTDTSTRKSQAV*				352

Figura A3. Resultado del análisis *Blastp* entre la proteína hC5aR1 (*query*) y mC5aR1 (*sbjct*).