

Universidad ORT Uruguay

Facultad de Ingeniería

**Obtención y caracterización de nueva línea celular
recombinante productora de TNF-alfa**

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

Tamara Salvador - 186317

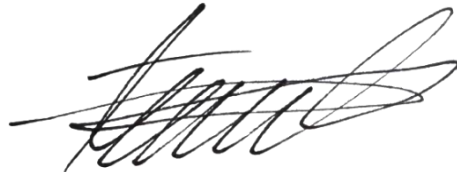
Tutoras: Ana Paula Mulet y Sofía Ibarburu

2024

Declaración de autoría

Yo, Tamara Salvador, 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 Ingeniería 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.



Tamara Salvador

5 de marzo 2024

Agradecimientos

Quería agradecerle, en primer lugar, a mis tutoras las Dras. Ana Paula Mulet y Sofia Ibarburu por su apoyo brindado y dedicación a lo largo de este proyecto. Desde el inicio, han sido excelentes guías, brindándome orientación en todo momento. Su contribución ha sido fundamental, estoy profundamente agradecida por su disposición en todo momento.

Además, quiero expresar mi profundo agradecimiento a la Facultad de Ingeniería de la Universidad ORT Uruguay por brindarme una formación de alta calidad. El laboratorio me proporcionó un espacio de trabajo donde pude desarrollarme académica y profesionalmente. Además, agradezco el acceso ininterrumpido a todos los recursos materiales y humanos necesarios en cada etapa de mi aprendizaje y crecimiento. A los docentes de la carrera por el conocimiento que adquirí en los últimos seis años.

Asimismo, quería agradecer a todos los integrantes del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay, quienes siempre estuvieron dispuestos a ayudarme en todo lo que necesitaba. En particular, quería agradecerle a Seba por disposición en todo momento, por facilitarme reactivos y por su asistencia con el dispositivo iBlot® Gel Transfer Device.

No puedo dejar de mencionar a mis amigos de la facultad, quienes compartieron conmigo cada día de los seis años de carrera, y en especial a los que estuvieron en el laboratorio el último año y medio que sin ellos no hubiese sido lo mismo, nos brindamos mutuamente un constante apoyo e hicieron que los días no tan buenos fueran mucho más llevaderos. Especialmente quería agradecer a Tomás por su constante disposición y ayuda a lo largo de la carrera.

Por último, pero no menos importante, quería expresar mi agradecimiento a mi familia y amigos por su apoyo incondicional durante toda nuestra carrera, y en especial el último año y medio, donde su aliento fue fundamental para sobrellevar momentos más críticos. A pesar de que quizás no comprenden completamente mi área de estudio, siempre estuvieron presentes para darme ánimo cuando más lo necesitaba. En especial quería agradecer a mis padres Silvia y Leonardo por las oportunidades que me dieron tanto en lo académico como en lo personal. A mi hermana Valentina por ser la mejor hermana del mundo y estar siempre que lo necesité. Gracias por su apoyo incondicional y por haber estado presente en cada paso de este largo camino, sin ustedes nada de esto hubiera sido posible.

Resumen

El factor de necrosis tumoral (TNF- α) es una proteína de la familia de las citoquinas producida por varios tipos de células, principalmente por macrófagos y fibroblastos. Ha sido identificado como un importante regulador de las respuestas inflamatorias y desempeña un papel primordial en la patogénesis de algunas enfermedades inflamatorias y autoinmunes como artritis reumatoide entre otras. Actualmente existen terapias para estas enfermedades que se basan en la producción y utilización de anticuerpos monoclonales anti-TNF- α . La síntesis de estos fármacos implica inmunizar a un animal con un antígeno específico, como TNF- α humano. Se necesita un método para producir esta proteína de forma sintética, manteniendo su estructura lo más similar posible a la humana. Además, la disponibilidad de esta proteína en forma recombinante nos permite continuar estudiando sus funciones en otras enfermedades.

En este proyecto se propuso obtener una línea celular recombinante estable productora de TNF- α . Se optó por la línea celular HEK-293 debido a su disponibilidad en el laboratorio y su eficacia en transfecciones estables.

Inicialmente, se amplificó la secuencia codificante de TNF- α a partir de ADNc de células HeLa y se intentó ligar con plásmidos pcDNA3.1 y pGEM®-T sin éxito. Posteriormente, se adquirió el plásmido pcDNA3.1(+) que incluye la secuencia codificante de TNF- α . Con este último plásmido se transformaron bacterias *Escherichia coli* y se seleccionaron mediante *colony* PCR con *primers* específicos. Para obtener la línea celular HEK-293 recombinante se transfectaron células HEK-293 con el plásmido pcDNA3.1(+)+TNF- α y durante dos semanas se seleccionaron con el antibiótico G418. Se establecieron, por un lado, una línea policlonal, y por otro, 4 líneas monoclonales mediante la técnica de dilución límite. Se caracterizó el crecimiento de la línea policlonal en comparación con las células sin transfectar. Se confirmó la presencia del CDS de TNF- α en todas las líneas obtenidas a través de PCR a partir del ADN genómico. Se realizó el estudio de la expresión de TNF- α mediante qPCR a partir del ADNc de los 4 clones estudiados se observó que expresan entre 110 y 480 veces más que la línea no transformada. El estudio de la expresión proteica mediante western blot permitió detectar esta citoquina en el sobrenadante de la línea policlonal crecida en ausencia de presión selectiva.

Este estudio proporciona una base sólida para futuras investigaciones sobre TNF- α y su aplicación en terapias contra enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

Palabras clave

HEK-293, TNF- α , transfección, policlonal, monoclonal, G418, cultivo celular, qPCR, western blot.

Abreviaciones

- %v/v- Porcentaje volumen sobre volumen, mililitro(s) por cada 100 mililitros
- °C: Grado(s) Celsius
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ADNasa- Desoxirribonucleasa
- ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia
- ADNg- Ácido desoxirribonucleico genómico
- ARN: Ácido ribonucleico
- ARNasa- Ribonucleasa
- ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
- c.s.p- Cantidad suficiente para
- CO₂: Dióxido de carbono
- CDS: Región codificante
- Ct- Ciclo umbral, del inglés Cycle threshold
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- dNTP: Nucleótidos trifosfato
- EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid
- Fw- Cebador delantero, del inglés forward
- g: Unidad de fuerza gravitatoria r
- hrs- Horas
- kb: Kilobase
- kDa: Kilo Dalton
- L: Litro
- LAB: Luria Bertani Agar
- LB: Luria Bertani
- LPS: Lipopolisacárido
- M: Molar
- mM: Milimolar
- mL: Mililitro
- NCBI- Centro Nacional para la Información Biotecnológica, del inglés National Center for Biotechnology Information
- ng: Nanogramo
- pb- Pares de bases
- PBS: Phosphate-buffered saline

- PCR: Polymerase chain reaction
- qPCR- Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, del inglés Real-time polymerase chain reaction
- PRR: Receptores de reconocimiento de patrones
- rpm- Revoluciones por minuto
- Rv- Cebador reverso, del inglés Reverse
- SFB: Suero fetal bovino
- TAE: Tris-Acetato-EDTA
- TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa, del inglés Tumor necrosis factor alpha
- X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
- xg- Unidad de fuerza centrífuga relativa a la de la gravedad de la tierra
- μ g: Microgramo
- μ L: Microlitro
- μ L/cm²- Microlitro(s) por centímetro cuadrado
- V: Volts

Índice

1. Introducción	11
1.1 Sistema inmune innato	11
1.2 Factor de necrosis tumoral- α	12
1.2.1 Generación de TNF α a nivel celular	12
1.2.2 Regulación de la síntesis de TNF- α	13
1.2.3 Acciones biológicas del TNF- α	14
1.2.4 Mecanismos efectores del TNF- α	16
1.2.5 Patogenia asociada al TNF- α	18
1.3 Línea celular HEK-293	19
1.4 Transfección estable	19
2. Objetivos	21
3. Metodología	22
3.1 Materiales	22
3.1.1 Material biológico	22
3.1.2 Reactivos generales	22
3.1.3 Soluciones	22
3.1.4 Buffers	23
3.1.5 Medios de cultivo	23
3.2 Procedimientos generales	23
3.2.1 Cultivo celular	23
3.2.2 Electroforesis de ADN/ARN	25
3.2.3 Evaluación de contaminación con micoplasma	25
3.2.4 Cuantificación de ADN	27
3.2.5 Producción de E. coli DH5 α electrocompetentes	27
3.2.6 Digestión enzimática	28
3.3 Obtención del ADN codificante de TNF- α a partir del ADNc	28
3.4 Digestión del ADN codificante de TNF- α con NheI y XhoI	30
3.5 Purificación del CDS de TNF- α digerido	30
3.6 Obtención del plásmido pcDNA3.1	30
3.7 Obtención pcDNA3.1+TNF- α	30
3.7.1 Ligación del plásmido pcDNA3.1 y el CDS de TNF- α	30
3.7.2 Transformación del plásmido pcDNA3.1+TNF- α en células competentes	31
3.7.3 Colony PCR de colonias positivas	31
3.7.4 Miniprep a partir de las colonias positivas y congelado de stock bacteriano	33
3.7.5 Ensayo de restricción del plásmido pcDNA3.1+TNF- α	33
3.8 Obtención pGEM ® -T+TNF- α	34
3.8.1 Ligación del plásmido pGEM ® -T y el CDS de TNF- α	34
3.8.2 Transformación del plásmido pGEM ® -T +TNF- α en células competentes	35
3.8.3 Colony PCR de colonias positivas	35
3.8.4 Miniprep a partir de las colonias positivas	36
3.8.5 Ensayo de restricción del plásmido pGEM ® -T +TNF- α	36

3.9 Obtención pcDNA3.1(+)+TNF- α	36
3.9.1 Transformación del plásmido pcDNA3.1(+)+TNF- α en células competentes	36
3.9.2 Ensayo de restricción del plásmido pcDNA3.1(+)+TNF- α	37
3.10 Transfección de células HEK-293 con el plásmido pcDNA3.1(+)+TNF- α	38
3.11 Clonado por dilución límite de células HEK-293_TNF- α .	38
3.12 Curva de crecimiento de HEK-293_TNF- α .	38
3.13 Confirmación de la correcta transfección	39
3.13.1 Extracción de ADN	39
3.13.2 Confirmación de la correcta transfección	39
3.14 Extracción de ARN	40
3.15 Confirmación de la eliminación de ADNg en las muestras de ARNm	41
3.16 Eliminación de ADN genómico	42
3.17 Retrotranscripción del ARNm a ADNc	42
3.18 Análisis de expresión génica	43
3.18.1 Diseño de primers	43
3.18.2 Curva de eficiencia de primers	44
3.18.3 Análisis de expresión genes	45
3.19 Análisis mediante western blot de TNF- α	45
3.19.1 Inducción de la expresión de TNF- α en línea celular HeLa con LPS	45
3.19.2 Lisis celular	46
3.19.3 Precipitación con ácido tricloroacético	46
3.19.4 Electroforesis de proteínas	46
3.19.5 Western blot	46
4. Resultados y discusión	48
4.1 Obtención de la secuencia codificante de TNF- α purificado y digerido	48
4.2 Obtención del plásmido pcDNA3.1+TNF- α .	50
4.3 Ensayo de restricción	51
4.4 Obtención del plásmido pGEM-T+TNF- α .	54
4.5 Obtención del plásmido pcDNA3.1(+)+TNF- α .	55
4.6 Cultivo celular	57
4.6.1 Detección de micoplasma	57
4.7 Obtención de la línea HEK_TNF- α estable	58
4.8 Caracterización de crecimiento celular	58
4.9 Obtención de línea monoclonal HEK_TNF- α estable	60
4.10 Confirmación de la correcta transfección	60
4.11 Obtención de ARNm de las líneas transfectadas	61
4.12 Curva de eficiencia de primers	64
4.13 Análisis de expresión de genes	65
4.14 Análisis mediante western blot de TNF- α en células transformadas	66
5. Conclusiones	70
6. Perspectivas a futuro	71
7. Referencias bibliográficas	72

8. Anexo	77
8.1 Anexo 1: Secuencia <i>primers</i> para la secuenciación	78
8.2 Anexo 2: Visualización plásmido pcDNA3.1(+)+TNF- α	79
8.3 Anexo 3: Secuencia de la proteína TNF- α	80
8.4 Anexo 4: Curvas de eficiencia de <i>primers</i>	81
8.5 Anexo 5: Curvas de expresión de genes	82

1. Introducción

El sistema inmune es un sistema de defensa cuya función principal es proteger al cuerpo humano de patógenos. Este sistema lo componen los tejidos, las células y las proteínas del cuerpo. Cuando un patógeno ingresa, se utilizan dos tipos de inmunidad para proteger al huésped de la infección: inmunidad innata e inmunidad adaptativa. El sistema inmunológico innato está programado genéticamente, detecta características invariantes de microorganismos patógenos. Las células inmunes innatas incluyen células dendríticas, macrófagos y neutrófilos. Por el contrario, el sistema inmunológico adaptativo, compuesto por linfocitos T y B, utiliza receptores de antígenos que no están codificados por las células germinales. Sin embargo, el linaje se genera recientemente en cada organismo. Por lo tanto, la respuesta inmune adaptativa es altamente específica (1).

1.1 Sistema inmune innato

El sistema inmunológico innato es la primera línea de defensa del cuerpo y proporciona un vínculo importante con el sistema inmunológico adaptativo. Los factores desencadenantes son principalmente microorganismos u otras influencias externas, pero también se deben considerar factores internos como daño tisular, traumatismo y la presencia de material genético microbiano (2,3). Para que se active esta respuesta innata, es esencial el reconocimiento de estos desencadenantes mediante sensores especiales comúnmente conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Estos receptores pueden reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o señales de peligro (DAMP), según el tipo de estímulo. Los PRR se expresan en las membranas de varios tipos de células, particularmente macrófagos y células dendríticas. La detección de PAMP por PRR conduce a la inducción de respuestas inflamatorias y defensas innatas del huésped (1). Varios tipos de PRR han sido identificados y caracterizados con cierto detalle. Estos incluyen receptores de tipo Toll o TLR, se consideran el principal sistema de alerta del sistema inmunológico y están presentes en una variedad de células de los sistemas inmunológicos innato y adaptativo (4).

La detección mediante estos sensores desencadena la fase efectora celular, incluida la activación de los linfocitos CD4+ y CD8+ y la liberación de mediadores inflamatorios. Estos mediadores son principalmente citoquinas y metabolitos del ácido araquidónico. Las citoquinas constituyen un conjunto diverso de mediadores con una amplia gama de funciones. Se caracterizan por ser secretadas de forma transitoria por múltiples tipos de células, actuar a través de receptores específicos y tener cierto grado de superposición en sus funciones, lo que resulta en efectos sinérgicos y antagónicos. Una sola citoquina puede afectar a múltiples tipos de células siempre que expresen los receptores correspondientes, este fenómeno se conoce como pleiotropía. Las citoquinas pueden activar células residentes como fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y mastocitos y promover la quimiotaxis y el reclutamiento de leucocitos (4, 5).

1.2 Factor de necrosis tumoral- α

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una proteína de la familia de las citoquinas producida por varios tipos de células, principalmente por macrófagos, células endoteliales activadas, y fibroblastos. Ha sido identificado como un importante regulador de las respuestas inflamatorias, sistema inmunitario adaptativo, la apoptosis, y la respuesta autoinmune. Además, desempeña un papel primordial en la patogénesis de algunas enfermedades inflamatorias y autoinmunes (7, 8).

Esta citoquina posee varias funciones como por ejemplo promueve la apoptosis mediada por caspasas. También desempeña un papel central en el proceso inflamatorio ya que estimula la liberación de otras citoquinas importantes como IL-6, IL-8 e IL-1 beta. Esto induce la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio, lo que resulta en una rápida migración de leucocitos desde el torrente sanguíneo al espacio extracelular. Este fenómeno contribuye a la activación, proliferación, diferenciación y migración de células inmunocompetentes. Asimismo, el TNF- α juega un papel importante en la regulación de las respuestas inflamatorias e inmunes, y sus acciones tienen una dualidad sorprendente. Por un lado, pueden provocar daño celular y, por otro, estimulan procesos de reparación y proliferación. Puede causar tanto la muerte celular como la resistencia a esa muerte celular, inicialmente promoviendo la inflamación, pero luego suprimiéndola (9).

1.2.1 Generación de TNF α a nivel celular

El TNF- α es una proteína de 185 aminoácidos glicosilada en las posiciones 73 y 172. Al principio, se sintetiza como un pro péptido en su forma transmembrana y luego se procesa mediante la enzima denominada TACE, lo que resulta en su forma soluble conocida como TNF- α (9). El TNF- α transmembrana actúa como precursor del TNF- α soluble. La proteína no procesada tiene 233 aminoácidos y un peso molecular de 26 kDa, mientras que el TNF- α soluble tiene 185 aminoácidos y un peso molecular de 17 kDa. Finalmente, la forma activa del TNF- α es un homotrímero de 52 kDa, unido no covalentemente (aunque algunas estimaciones varían entre 45 y 65 kDa), y esta es la forma que se une y se cruza con los receptores (10, 11).

En el cuerpo humano existen múltiples tipos celulares que tienen la capacidad de inducir la producción de TNF- α , como es el caso de los macrófagos que son reconocidos como los principales productores de esta citoquina. Además, otros ejemplos son las células endoteliales activadas, fibroblastos y condrocitos del cartílago articular. También se secreta en menor medida por queratinocitos y linfocitos T y B (9, 11).

La generación de TNF- α puede ser activada por una variedad de mediadores. El lipopolisacárido (LPS) es quizás el inductor más potente y ampliamente estudiado de TNF- α . y se utiliza frecuentemente como estímulo en estudios de la regulación de la biosíntesis de TNF- α . 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 se logra gracias a su capacidad para estabilizar, propagar y traducir el ARNm existente en proteína. Sin embargo, tan pronto como la señal extracelular desaparece, la represión traduccional comienza nuevamente, reduciendo rápidamente la tasa de síntesis de TNF- α intracelular (12, 13).

Existen otras citoquinas que son capaces de inducir la producción de TNF- α como por ejemplo la IL-1. Además, otros estímulos como ciertos virus (por ejemplo, la influenza A), parásitos, entre otros, también inducen su expresión (14).

1.2.2 Regulación de la síntesis de TNF- α

Se destaca la regulación postranscripcional como el principal regulador en la síntesis de esta citoquina. En la regulación del gen del TNF- α , el control de la traducción juega un papel crucial, más que la transcripción. Este proceso implica la gestión de la cantidad y estabilidad del ARNm antes de su conversión en proteína en los ribosomas (15).

La regulación postranscripcional es un mecanismo regulador importante del sistema inmunológico que es común en muchas citoquinas. Este sistema se basa en secuencias ricas en adenosina uridina (AU) y elementos reguladores presentes en la región 3' no traducida (3' UTR) del ARNm. La región 3'UTR juega un papel importante en el control tanto de la degradación como de la traducción del ARNm en el citoplasma. En particular, está compuesto por repeticiones de la secuencia AUUUA y su función es promover la rápida degradación del ARNm en el citoplasma. Este proceso tiene como objetivo limitar la producción de TNF- α y garantizar que esta citoquina solo se produzca cuando el sistema inmunológico la necesite. Este proceso se inicia cuando se detecta una señal celular en la región AURE del ARNm. El mecanismo de control tiene la capacidad de determinar si el ARNm se degrada antes de llegar al ribosoma o si se traduce a proteína después de llegar al ribosoma. Este proceso se basa en proteínas específicas que reconocen y se unen a la región AURE en el extremo 3'UTR del ARNm (15).

1.2.3 Acciones biológicas del TNF- α

El estudio de esta citoquina ha cobrado gran importancia en los últimos años debido a sus diversos efectos biológicos. Estos efectos incluyen su actividad proinflamatoria, actuando como mediador clave del shock séptico. Las citoquinas TNF- α e IL-1 se consideran las mediadoras endógenas más importantes de la sepsis. Estas citoquinas comparten múltiples actividades que se superponen y son sinérgicas, tienen la capacidad de inducir un estado similar a un shock séptico después de la administración intravenosa (17). El shock séptico es característico de una respuesta sistémica a la infección que resulta en una alta mortalidad. Muchos de los síntomas asociados con el shock séptico pueden atribuirse a niveles elevados de TNF- α . Estos síntomas incluyen fiebre, hipotensión, trombosis intravascular, edema pulmonar, necrosis tisular y hemorragia. La inhibición de cualquiera de estas citoquinas puede

reducir la gravedad de la enfermedad y protegerse de las consecuencias mortales del ataque bacteriano (8, 16). Además, TNF alfa tiene actividad antitumoral se pueden atribuir a su capacidad citotóxica, ya que se ha demostrado su capacidad para inducir apoptosis (16).

El TNF- α es la primera citoquina que aparece en la circulación durante la sepsis experimental, su presencia sistémica se detecta aproximadamente a los 45 minutos y alcanza su punto máximo a los 90 minutos después de la inyección de LPS, coincidiendo con el desarrollo de los síntomas clínicos de la sepsis. Además, el efecto letal de la endotoxina administrada por vía intravenosa en ratones puede ser bloqueado por el pretratamiento con anticuerpos policlonales anti-TNF- α . Se ha demostrado que la neutralización del TNF- α tiene un efecto atenuante en la síntesis de IL-1 e IL-6, lo que sugiere que el TNF- α actúa como intermediario en la producción de estas otras citoquinas mediadoras de la sepsis. Algunos estudios han mostrado la eficacia de los tratamientos con anticuerpos anti-TNF- α en ciertos modelos de sepsis (18). Es probable que IL-1 interactúe con TNF- α para inducir el síndrome séptico, ya que ambas citoquinas actúan sinérgicamente en la producción de toxicidad sistémica (16).

El TNF- α es un potente desencadenante de respuestas inflamatorias, ya sea directamente o mediante la mediación de IL-1 y otras citoquinas proinflamatorias. Esta citoquina también estimula la producción de muchas otras citocinas como IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-18, IFN- γ y factores de crecimiento y transformación beta (TGF- β), entre otros. Además, el TNF- α tiene la capacidad de estimular la producción de diversas hormonas como cortisol, adrenalina, glucagón e insulina (19, 20).

En respuesta a una infección, la presentación del antígeno y la activación de los linfocitos se llevan a cabo en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). El TNF- α induce la expresión de MHC clase I, al actuar sobre las células endoteliales y los fibroblastos dérmicos, al menos en parte, a nivel transcripcional y es bloqueada por inhibidores de la síntesis de proteínas. Y esta citoquina induce la expresión de MHC clase II en los macrófagos y las células B del páncreas (16, 21). Asimismo, esta citoquina tiene un efecto directo sobre las células del sistema inmunitario, provocando diversos efectos. En las células T activadas, el TNF- α induce la expresión de receptores para la IL-2 y la producción de interferón γ (IFN- γ), lo cual aumenta la respuesta de las células T a IL-2. Además, el TNF- α es un factor de crecimiento para las células B humanas y, además de su función mitogénica, estimula la secreción de inmunoglobulina M (IgM) en presencia de la IL-2. También, el TNF- α actúa directamente sobre los macrófagos induciendo la síntesis de la IL-1 y, de manera indirecta, al estimular la unión de los macrófagos a las células endoteliales, favorece la presentación de antígeno y la activación de las células T y B (16, 23).

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) juega un papel importante como mediador en la respuesta inflamatoria y la defensa contra la lesión o invasión de tejidos por microorganismos. Esta citoquina tiene la capacidad de actuar en una amplia variedad de tejidos, como el endotelio vascular, el sistema nervioso central, el hígado, los pulmones, el tejido muscular, el sistema

cardiovascular, los adipocitos, y también puede afectar al sistema endocrino y hematopoyético, además de tener efectos tumorocidas (15).

En el endotelio vascular, el TNF- α tiene una actividad procoagulante al estimular la expresión de factores tisulares y suprimir cofactores importantes para la actividad anticoagulante de la proteína C. También activa las células endoteliales para que produzcan IL-1 y puede inducir la expresión de moléculas de histocompatibilidad y antígenos que facilitan la adhesión de leucocitos y plaquetas al endotelio, lo que puede causar coagulación difusa, necrosis de órganos vitales y otros efectos adversos (15).

En el sistema nervioso central, aunque presente en pequeñas cantidades, el TNF- α puede atravesar la barrera hematoencefálica y desencadenar síntomas como fiebre y anorexia al actuar sobre la región hipotalámica (15).

En el hígado, el TNF- α aumenta la expresión de proteínas de fase aguda, lo que resulta en un aumento de su presencia en el suero y una disminución en la síntesis de albúmina. También induce la producción de células de Kupffer y otras citoquinas como IL-1 e IL-6, lo que contribuye a la respuesta de fase aguda. Además, estimula la síntesis de lípidos circulantes, promueve la lipogénesis y aumenta los niveles de triglicéridos (15).

El proceso de apoptosis también está influenciado por los efectos del TNF- α . Este fenómeno puede ocurrir con la producción tanto local como sistémica de TNF- α durante el crecimiento y desarrollo normales, pero bajo ciertas circunstancias puede conducir a respuestas celulares patológicas. Además, la apoptosis mediada por TNF- α juega un papel importante en la actividad tumoral de esta citoquina (15).

1.2.4 Mecanismos efectores del TNF- α

Ambas formas de TNF- α desempeñan diversas actividades biológicas al unirse a los receptores de TNF- α : TNFR1 y TNFR2, incluyendo la apoptosis y la proliferación celular. El TNF- α envía señales a través de dos receptores de membrana triméricos, TNFR1 y TNFR2. Estos receptores están presentes en casi todas las células humanas. TNFR1 se expresa en todos los tejidos humanos y desempeña un papel importante en la señalización de TNF- α , mientras que TNFR2 se expresa comúnmente del sistema inmunológico, células endoteliales y células nerviosas, lo que permite respuestas biológicas limitadas (11, 22).

Funcionalmente, TNFR2 se asocia principalmente con actividades homeostáticas como la regeneración de tejidos, la proliferación celular y la supervivencia, pero también puede desencadenar respuestas inflamatorias y de defensa contra patógenos. En general, TNFR1 es esencial para provocar respuestas de TNF- α citotóxicas y proinflamatorias, mientras que TNFR2 puede mediar en la activación, migración o proliferación celular (22).

Ambos receptores comparten algunas estructuras proteicas. TNFR1 contiene un dominio de muerte celular que media la apoptosis, a diferencia de TNFR2, TNFR2 carece de este dominio y, por lo tanto, no puede inducir directamente la apoptosis celular. TNFR1 induce la muerte celular programada a través de varias proteínas accesorias asociadas al dominio de la muerte, como TRADD, TRAF2 y FADD, que activan la vía apoptótica mediada por caspasa. Además, la unión de TNF- α y TNFR1 activa la señalización intracelular, que en última instancia conduce a la activación del factor de transcripción NF- κ B. NF- κ B se libera de inhibidores en el citoplasma mediante fosforilación mediada por quinasas y se transloca al núcleo, donde se asocia con la maduración de las respuestas inmunes innatas y adaptativas y la síntesis de proteínas involucradas en las respuestas inflamatorias y autoinmunes (11, 22).

La activación de TNFR1 puede conducir a la formación de diferentes complejos de señalización que conducen a diferentes respuestas celulares. Durante la formación del complejo I, el TNFR1 activado se une a TRADD, lo que lleva a la asociación e interacción de múltiples componentes, incluidos RIPK1, TRAF2, AP1 y LUBAC. Esta vía de señalización conduce a la activación del factor de transcripción NF- κ B y de la cascada de JNK/AP-1, que promueve la inflamación, la supervivencia y proliferación celular y la defensa inmune contra patógenos (12).

A diferencia del complejo I, que se forma en la membrana celular, los complejos IIa, IIb y IIc se forman en el citoplasma. El complejo IIa consta de TRADD, RIPK1, TRAF2, AP1, procaspasa-8 y FADD, y el complejo IIb tiene la misma composición, pero con la adición de RIPK3. La formación de los complejos IIa y IIb activa la caspasa-8, lo que lleva a la apoptosis. Por otro lado, el complejo IIc, también conocido como necrosoma, está formado por RIPK1 y RIPK3, y su activación conduce a la necroptosis e inflamación (12).

1.2.5 Patogenia asociada al TNF- α

Desde una perspectiva fisiológica, el TNF- α desempeña un papel importante en las respuestas inmunitarias normales. Este factor activa el sistema inmunológico y regula su función. Sin embargo, la producción inadecuada o excesiva de TNF- α puede ser perjudicial y provocar el desarrollo de enfermedades. La artritis reumatoide, la enfermedad inflamatoria intestinal, la artritis psoriásica, la psoriasis y la uveítis no infecciosa son ejemplos de enfermedades causadas por una secreción anormal de TNF- α .

Dada la implicación del TNF- α en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, inhibidores del TNF- α se han desarrollado y utilizado con éxito en el tratamiento clínico de enfermedades como la enfermedad de Crohn y la artritis reumatoide. Estos agentes terapéuticos actúan como antagonistas al bloquear la interacción del TNF- α con los receptores TNFR1/2 y, en algunos casos, actúan como agonistas al estimular la señalización inversa para producir TNF- α , lo que provoca la apoptosis de las células inmunitarias (22).

Los anticuerpos monoclonales que se dirigen al TNF- α son una estrategia terapéutica prometedora para tratar estas enfermedades, ofreciendo nuevas posibilidades de tratamiento. Existe una amplia evidencia que respalda el uso de inhibidores del TNF para controlar los brotes agudos de artritis reumatoide, así como para su efectividad a largo plazo en esta enfermedad (9).

Para tratar la artritis reumatoide, actualmente se están desarrollando diversos fármacos que contienen anticuerpos monoclonales contra el factor de necrosis tumoral alfa (anti-TNF- α) como principio activo. La síntesis de estos fármacos implica la inmunización de un animal con un antígeno específico, en este caso TNF- α humano. Para lograr este objetivo, es importante establecer un método que permita producir esta proteína de forma sintética manteniendo su estructura y similitud con las variantes humanas (24).

Es importante producir un tipo de esta proteína de forma recombinante para estudiar más a fondo su función y su impacto en otras enfermedades. Este enfoque permite comprender mejor cómo tratar o aliviar los síntomas asociados.

1.3 transfección estable

La transfección es un mecanismo por el cual se introduce material genético extraño, como ácidos nucleicos, en las células para modificarlas genéticamente. Este método es una poderosa herramienta analítica para estudiar la función de las proteínas, así como la función y regulación de los genes. El ácido nucleico introducido, ya sea ADN o ARN, puede permanecer de forma estable o temporal dentro de la célula dependiendo de su naturaleza (25). En la transfección estable, el material genético introducido, que generalmente incluye un marcador seleccionable, se integra en el genoma del huésped y su expresión se conserva incluso después de que las células del huésped se replican. Sin embargo, en la transfección transitoria, el gen introducido sólo se expresa durante un período de tiempo limitado y no se integra en el genoma celular. El material genético transfectado transitoriamente puede perderse debido a factores ambientales o durante la división celular. La elección entre transfección estable y transitoria depende de los objetivos específicos del experimento. La transfección se utiliza principalmente para estudiar la función de genes o productos genéticos mejorando o inhibiendo la expresión de genes específicos dentro de las células, o para producir proteínas recombinantes en células de mamíferos (26).

Todas las transfecciones estables comienzan como transfecciones transitorias, pero se utiliza un marcador seleccionable, por ejemplo, un gen de resistencia a los antibióticos, expresado en el plásmido para seleccionar las células que han integrado con éxito el plásmido en su genoma. El tratamiento a largo plazo de las células con un antibiótico selectivo da como resultado la proliferación de células que han incorporado de manera estable el plásmido y la muerte de las células que no portan genes de resistencia al antibiótico selectivo (27).

Como se mencionó en el apartado anterior, las proteínas recombinantes juegan un papel muy

importante en la industria farmacéutica como principios activos de muchos fármacos. Debido a que las estructuras de las proteínas producidas son tan complejas, puede ser necesario que la plataforma de expresión sea una línea celular de mamífero. A nivel de producción, es deseable que la producción de la proteína deseada tenga una alta uniformidad y un alto rendimiento. Esto se logra seleccionando los mejores clones y ejecutando la producción a partir de ellos. La selección clonal sólo puede realizarse a partir de líneas celulares transfectadas de forma estable (28).

1.4 Línea celular HEK-293

La línea celular HEK-293 es derivada del riñón de un embrión humano y tiene una morfología característica con células piramidales y filopodios en la membrana periférica. Esta cepa se ha utilizado ampliamente como herramienta de expresión de proteínas recombinantes durante más de 25 años desde su inicio para una multitud de aplicaciones de investigación (29).

Además de usarse para la expresión transitoria de proteínas recombinantes, las células HEK-293 también son conocidas por su capacidad de transformación estable. Junto con la línea CHO-K1 son las dos líneas celulares más comúnmente empleadas para transformaciones estables. La línea HEK-293 posee una maquinaria bioquímica que le permite llevar a cabo eficientemente el plegamiento y procesamiento postraduccional necesario para generar proteínas maduras y funcionales a partir de ADN exógeno, tanto de mamíferos como de otras especies. Además, posee propiedades deseables como la rápida replicación y mantenimiento, la sensibilidad a una variedad de métodos de transfección, la alta eficiencia de la producción de proteínas, lo que la han convertido en una opción popular para ensayos que involucran proteínas expresadas de forma recombinante en células de mamíferos (30, 31).

Para la producción eficiente de proteínas recombinantes, es esencial emplear una línea celular capaz de realizar las modificaciones postraduccionales y el ensamblaje de la estructura molecular similar a la proteína humana. Además, el plásmido utilizado debe cumplir criterios específicos como la presencia de un promotor eucariótico, usualmente de origen viral, un sitio de clonación para insertar el gen de interés, una secuencia de poliadenilación para asegurar la estabilidad del ARN mensajero, un origen bacteriano de replicación para la amplificación del plásmido en la bacteria hospedadora, y un marcador de selección que permita identificar y mantener sólo aquellas células que hayan incorporado el plásmido recombinante. Estos elementos son fundamentales para garantizar el éxito en la generación de una línea celular recombinante con la expresión deseada del gen de interés (32, 33).

1.5 Antecedentes

A través de una exhaustiva búsqueda bibliográfica, hemos identificado precedentes de producción de TNF- α en células HEK-293 (34). Sin embargo, con el propósito de poner este conocimiento a disposición del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT en Uruguay y para su aplicación en la investigación a nivel nacional, se procedió a realizar una nueva línea celular recombinante productora de TNF- α humano.

2. Objetivos

Objetivo General: Obtener una nueva línea celular recombinante capaz de producir TNF- α humano y caracterizarla.

Objetivos específicos:

- Obtener una construcción para la expresión de TNF- α humano en eucariotas.
- Obtener células HEK-293 transfectadas de forma estable con el plásmido obtenido en el punto anterior.
- Obtener líneas monoclonales transfectantes.
- Caracterizar las líneas recombinantes obtenidas.

3. Metodología

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico

La cepa de *Escherichia coli* DH5 α (referida en adelante como *E. coli* DH5 α) fue obtenida de New England Biolabs (Massachusetts, EE.UU). El plásmido pcDNA3.1 fue cedido por el laboratorio de biotecnología de la Universidad ORT. La línea celular HEK-293 fue adquirida de American Type Culture Collection (ATCC, Gaithersburg, Maryland, Estados Unidos, CRL-1573). La línea celular HeLa fue adquirida también de American Type Culture Collection (ATCC, Gaithersburg, Maryland, Estados Unidos, CCL-2). El plásmido pcDNA3.1(+)+TNF α fue obtenido de GenScript (NM_000594.4).

3.1.2 Reactivos generales

La peptona fue obtenida de PanReac AppliChem (Barcelona, España). El extracto de levadura y agar fueron obtenidos de Oxoid (Basingstoke, Reino Unido). Las enzimas de restricción XhoI, NheI, NmeAIII, SpeI, PstI, la fosfatasa Fast AP, la T4 ligasa, el *GeneRuler Ladder Mix* (#SM0331) fueron obtenidos de *Thermo Scientific*TM (Massachusetts, EEUU). La Taq polimerasa, la polimerasa *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase*, la enzima NcoI, NotI, BbsI y los dNTPs fueron obtenidos de *New England Biolabs* (Massachusetts, EEUU). El plásmido pGEM-T Easy fue adquirido de Promega (Wisconsin, EEUU).

Los reactivos de cultivo celular Tripsina-EDTA se obtuvieron de *Thermo Scientific*TM (Massachusetts, EEUU). El trabajo con la línea celular estable HEK-293 utilizó DMEM alta glucosa (4,5 g L⁻¹) con glutamina estable (DMEM-HPSTA) y suero fetal bovino avanzado de Capricorn Scientific GmbH (Ebsdorfergrund, Alemania).

3.1.3 Soluciones

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

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.

Mix de dNTPs 10 mM: 2,5 mM dATP; 2,5 mM dTTP; 2,5 mM dGTP; 2,5 mM dCTP.

X-gal 20 mg/mL: 0,1 g de X-gal en 5 mL de dimetilsulfóxido, filtrado utilizando un filtro de 0,22 μ m.

IPTG 1 M: 2,38 g de IPTG en 10 mL de agua ultrapura, filtrado utilizando un filtro de 0,22 μ m.

Solución de bloqueo: PBS 1X 99 mL, 5% leche descremada, 0,1% TWEEN.

Colorante Ponceau: 5% ácido acético, 0,1% ponceau.

3.1.4 Buffers

Tris Acetato EDTA (TAE) 50X: Tris Base-HCl 2M, Ácido acético glacial 1 M y EDTA 50 mM pH 8.0

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

Buffer de carga reductor SDS-PAGE 6X: Tris base – HCl 300 mM pH 6,8; SDS 12%; glicerol 30%; azul de bromofenol 0,6%; 2-mercaptoetanol 600 mM.

Buffer Fosfato de Sodio (PBS) 10X: Fosfato monopotásico 18 mM; Fosfato disódico 100 mM; Cloruro de sodio 1,37 M; Cloruro de potasio 27 mM; pH 7,4.

Buffer de lisis para ADN: 10m Tris pH 8; 100 mM NaCl; 10mM EDTA pH 8; 0,5% SDS; Proteinasa K 500 µg/ml.

Buffer de transferencia: Tris base 25 mM pH 8,8, Glicina 190 mM, Metanol 20%.

Buffer de lisis para proteínas: NaCl 150 mM, Triton X-100 1 %, Desoxicolato de sodio 0,5 %, SDS 0,1 %, Tris-HCl pH 8,0, 50 mM.

3.1.5 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.

Para preparar los medios de cultivo se pesan los componentes en balanzas de precisión, se disuelven en el volumen correspondiente de agua destilada y se esterilizan en el autoclave durante 20 minutos a 121°C.

3.2 Procedimientos generales

3.2.1 Cultivo celular

3.2.1.1 Línea celular

Para los ensayos realizados en este trabajo se utilizó la línea celular HEK-293 aisladas del riñón de un embrión humano y fue adquirida de American Type Culture Collection (ATCC, Gaithersburg, Maryland, Estados Unidos, CRL-1573). También se utilizó la línea celular HeLa aisladas de un carcinoma del cuello uterino humano y fue adquirida de American Type Culture Collection (ATCC, Gaithersburg, Maryland, Estados Unidos, CCL-2).

Tanto las células HEK-293 como las células HeLa crecen en adherencia, estas células fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM High Glucose (4,5 g/L) (Capricorn Scientific) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB). Se incubaron en estufa a 37°C con atmósfera controlada de 5% de Dióxido de Carbono (CO_2) y humedad saturada (*Thermo Scientific™ Forma® Series II Water Jacketes CO_2 Incubator*).

3.2.1.2 Descongelado de células

Las células fueron criopreservadas en tanque de nitrógeno líquido (Taylor Wharton CRYO REFRIGERATOR HC20, Fisher Scientific). Para el descongelado de las mismas, se retiró el criovial de interés del tanque de nitrógeno, se colocó en hielo y luego se colocó el criovial dentro de un baño de agua previamente termostatizada a 37°C hasta que el contenido del criovial se encontrara en estado líquido. Se mezcló con 9 mL de medio de cultivo termostatizado anteriormente y se centrifugó a 200 xg por 5 minutos. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de medio completo. Se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer (Marienfeld 0,100mm 35 mm/0,0025 mm²) utilizando el colorante azul de tripán para verificar así cantidad y viabilidad celular. Luego se transfirieron una determinada cantidad de células a una botella y se incubaron en la estufa a 37° C en una atmósfera con 5% de CO₂.

3.2.1.3 Subcultivo de células adherentes

Una vez que las botellas llegaron a una confluencia aproximada de 80% se realizaron pasajes de estas para asegurar que las células se mantuvieran constantemente en fase exponencial y con un suministro adecuado de nutrientes. Se descartó el medio de cultivo, se realizó un lavado con PBS 1X estéril y se agregaron 20 µl/cm² de tripsina-EDTA (Sigma, #T3924). Luego se incubó el cultivo a 37°C en la estufa durante 5 a 10 minutos hasta que las células se observaron despegadas correctamente en el microscopio óptico. Transcurrido el tiempo de incubación, se adiciono el medio de cultivo completo (el doble del volumen de tripsina) para neutralizar la tripsina. Se tomó una alícuota para realizar el recuento de las células en una cámara de Neubauer. Según el recuento, se procedió a realizar un repique o siembra de las células. A partir del recuento se realizó repique o siembra según correspondiese incubando el cultivo a 37°C en estufa con una atmósfera de 5% CO₂.

3.2.1.4 Criopreservación de células

Para poder realizar la criopreservación de las células, se partió de un subcultivo celular con una confluencia del 80-90% aproximadamente. Como primer paso, se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS 1X y se agregó 20 µl/cm² de tripsina-EDTA. Luego se incubaron las células cultivadas en la estufa 37°C durante 5 a 10 minutos hasta que se observó en el microscopio que las células estuvieran desprendidas del sustrato. Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionó medio de cultivo completo -(el doble del volumen de tripsina) para inactivar la tripsina. Se tomó una alícuota para realizar el recuento de las células totales utilizando la cámara de Neubauer. Mientras tanto, se centrifugaron a 260 xg durante 5 minutos el resto de las células, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en medio de criopreservación (90% SFB + 10% DMSO) en un volumen suficiente para poder obtener entre 2 x 10⁶ a 3 x 10⁶ células/mL aproximadamente. Se alicuotó 1mL de medio en los crioviales y luego se colocó en el Mr. Frosty Freezing Container (*Thermo Scientific*[™], #5100-0001) a -

80°C durante 24 horas. Los crioviales se colocaron en el tanque de nitrógeno líquido para su conservación.

3.2.2 Electroforesis de ADN/ARN

Para poder analizar las muestras, se prepararon geles de agarosa en buffer TAE 0,5X con el porcentaje de agarosa adecuado para obtener una óptima separación y visualización según el tamaño que presenta el ADN. Los geles fueron suplementados con el agente intercalante *GoodView™* (SBS Genetech Co. Ltd., #HGV-2) en una concentración de 3% (v/v) para su posterior visualización. Las muestras de ADN fueron sembradas en el gel con buffer de carga. Se utilizó el marcador de peso molecular *GeneRuler DNA LadderMix™* (Thermo Scientific™, #SM0331). Las muestras se corrieron en la cuba electroforética MicroPulser (Bio-Rad, #652100) utilizando buffer TAE 0,5X como buffer de corrida. La duración y el voltaje de la corrida electroforética se determinó de acuerdo con el tamaño de las muestras. La visualización del gel se realizó utilizando el transiluminador *E-Gel Imager™ System with UV light Base* (Invitrogen) y se obtuvieron las imágenes a través del software *GelCapture™*.

3.2.3 Evaluación de contaminación con micoplasma

Se realizó este ensayo para descartar contaminación por micoplasma en la línea celular HEK-293 que se utilizó para realizar la transformación.

Se cultivaron células HEK-293 en medio DMEM y 10 % FBS sin antibiótico y se tomó medio que haya estado al menos 72 en contacto con las células. Posteriormente, se centrifugó a 19000 xg durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1ml de PBS 1X. Nuevamente se centrifugó a 19000 xg durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se realizó un segundo lavado con 200 µL de PBS 1X. A continuación, se centrifugó con las mismas condiciones y se eliminó el sobrenadante. El pellet se suspendió en 100 µL de PBS 1X empleando vortex y se incubó por 15 minutos a 95°C. Finalizada la incubación, se centrifugó brevemente y se homogeneizó la muestra utilizando vortex para resuspender. Se conservó a -20°C hasta su uso.

Para la detección de micoplasma, se realizó una amplificación mediante PCR donde se utilizó el protocolo descrito en el trabajo de Uphoff et al. (2012) (35) con algunas modificaciones. Se utilizó un mix de *primers* 5' y 3' con el fin de abarcar la mayor parte de la diversidad de micoplasma que podrían encontrarse en la muestra. Los *primers* que se utilizaron fueron obtenidos del stock de *primers* del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay adquiridos en MacroGen Inc, las secuencias de estos se detallan en la tabla 1 y su diseño fue basado en Uphoff et al. (2012) (35).

Tabla 1: Secuencia de *primers* forward y reverse para la detección de micoplasma:

<i>Primer</i>	Secuencia
---------------	-----------

5' Primers (Myco-5')	5' CGC CTG AGT AGT ACG TWC GC 3'
	5' TGC CTG RGT AGT ACA TTC GC 3'
	5' CGC CTG AGT AGT ATG CTC GC 3'
	5' CGC CTG GGT AGT ACA TTC GC 3'
3' Primers (Myco-3')	5' GCG GTG TGT ACA ARA CCC GA 3'
	5' GCG GTG TGT ACA AAC CCC GA 3'

Se realizó la amplificación de la muestra a analizar, una reacción solo con la muestra y otra reacción paralela que también contenga la muestra con el control interno. En el caso del control interno se utilizó un plásmido otorgado por la Universidad ORT con un inserto que produce un producto de PCR de 986 pb que el de micoplasma. Además, se emplearon controles, como control positivo se utilizó una muestra cedida por el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT y como control blanco se utilizó agua ultrapura. En la Tabla 2 se detallan los reactivos utilizados para la amplificación:

Tabla 2: Mix de reacción de PCR en volumen final de 25 µL, para detección de micoplasma.

Para 25 µL de reacción	Volumen
<i>Taq II DNA polymerase</i> *	0,2 µL
Buffer de reacción Taq 10X **	2,5 µL
MgCl ₂ 50mM ***	1 µL
Myco-' (5mM c/u)	0,5 µL
Myco-3' (5mM c/u)	0,5 µL
dNTP's mix (5µM c/u)	1 µL
Molde	1 µL
Control interno	1 µL (cuando aplique)
Agua libre de nucleasas	c.s.p 25 µL

* NZY Taq II DNA polymerase (Nzytech, #ZN101)

** 10X Standard Taq Reaction Buffer Pack (BioLabs®, #B9014S)

*** MgCl₂ Solution, (Nzytech, #ZN051)

El control interno fue diluido 1/1000 para realizar la PCR. Luego de preparar todas las reacciones con sus componentes, se colocaron los tubos en el termociclador *SimpliAmp™ Thermal Cycler* (Thermo Scientific™, #A24811) y se utilizó el siguiente protocolo de ciclado:

Tabla 3: Condiciones de reacción de PCR para la detección de micoplasma

	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Inicial	1	95°C	3 min
Desnaturalización	40	95°C	30 s
<i>Annealing</i>		58°C	30 s
Extensión		72°C	90 s
Extensión final	1	72°C	10 min

Luego de finalizada la amplificación se realizó una electroforesis con los productos finales de la reacción en un gel de agarosa 1,3 % como se describe en el punto 3.2.2.

3.2.4 Cuantificación de ADN

La determinación de la concentración de ADN presente en las muestras se realizó mediante absorbancia a 260 nm. El grado de pureza se estimó mediante el cociente abs₂₆₀/abs₂₈₀. 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).

3.2.5 Producción de *E. coli* DH5α electrocompetentes

En todas las etapas de este protocolo se trabajó bajo condiciones de esterilidad. A partir del stock de *E. coli* DH5α del Laboratorio de Biotecnología de Universidad ORT preservadas a -80 °C se realizó un repique de la cepa de interés en una placa con medio LBA y posterior se incubó durante 16-24 horas a 37°C. A continuación, se realizaron seis pre-cultivos en tubo cónico de 15 mL conteniendo 5 mL de LB inoculado con una colonia aislada obtenida del repique. Dicho cultivo creció overnight a 37°C y 220 rpm.

Posteriormente, se inoculó con 7 mL de precultivo crecido, tres matraces de 1 L conteniendo 300 mL de medio LB cada uno y se incubó a 37°C y 220 rpm. Luego de la primera hora se midió OD₆₀₀ del cultivo utilizando el espectrofotómetro *UV-1800* (Shimadzu), y luego cada 30 minutos hasta alcanzar una absorbancia de 0,4-0,6.

Luego, se fraccionó el volumen en botellas de centrifuga de 250 mL previamente lavadas, enjuagadas con agua ultrapura, esterilizadas por luz UV y colocadas en hielo. A partir de este paso se trabajó estrictamente en hielo. Las bacterias se centrifugaron 1000 xg por 25 minutos a 4 °C en la centrifuga Sorvall ST 16 (*Thermo Scientific™*), se descartaron los sobrenadantes y se resuspendió cada *pellet* en 250 mL de glicerol 10% estéril a 4 °C. Posteriormente se centrifugó a 1000 xg por 25 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió cada *pellet* en 10 mL de glicerol 10% estéril a 4 °C. Se juntó el volumen de dos Falcon® (volumen final: 50 mL) y se centrifugó a 1000 xg por 15 minutos a 4 °C. Tras descartar los sobrenadantes se resuspendió cada *pellet* en 10 mL de glicerol 10 % y se juntó la totalidad del volumen en un tubo de centrifuga de 50 mL. Luego se centrifugaron las células a 1000 xg durante 10 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 1mL de glicerol 10 % estéril a 4 °C.

Finalmente, se dispusieron muestras de 55 µL células electrocompetentes en tubos de microcentrifuga de 0,5 mL. Estos tubos fueron rápidamente congelados utilizando nitrógeno líquido y luego almacenados a una temperatura de -80 °C hasta su empleo posterior.

Para evaluar la eficacia de las células electrocompetentes, se sometieron a electroporación células extraídas de dicho lote, utilizando 10 pg de plásmido pUC19 cerrado (*New England Biolabs, #N3041*). Posteriormente, se realizaron diluciones de las bacterias electroporadas y se sembraron en placas de LB con ampicilina. Se seleccionó una placa que contenía entre 25 y 250 colonias y se calculó la eficacia utilizando la siguiente fórmula.

$$Eficacia = ufc \times \frac{v \text{ de bacterias electroporada}}{v \text{ sembrado en la placa}} \times \frac{10^{-6} g \text{ ADN}}{2,5 \times 10^{-12} g \text{ pUC19}}$$

3.2.6 Digestión enzimática

Para llevar a cabo las reacciones de digestión enzimática, se optó por emplear la combinación de reactivos recomendada por el fabricante de la enzima respectiva.

En situaciones donde se requería la acción de más de una enzima simultáneamente, se recurrió al uso del software *Double Digest (Thermo Scientific™)*, con el fin de determinar la composición óptima de la mezcla reactiva. Los detalles específicos de cada digestión, incluyendo la composición de la mezcla reactiva y las condiciones de incubación, fueron detallados en cada sección.

3.3 Obtención del ADN codificante de TNF-α a partir del ADNc

Para la obtención de la secuencia codificante de TNF-α se utilizó ADNc preparado por Valle (37). Este ADNc fue obtenido a partir de ARNm de células HeLa tratadas con una concentración final de 100 ng/mL de LPS que de acuerdo con una búsqueda bibliográfica expresan esta proteína (38).

Se amplificó la secuencia codificante de TNF- α , realizando el mix de PCR según el protocolo del fabricante de la enzima *Taq DNA polimerasa* utilizada (*Thermo Scientific™, #EP0402*).

Tabla 4: Mix de reacción de PCR en volumen final de 25 μ L, para la amplificación de la secuencia codificante de TNF- α

Para 50 μ L de reacción	Volumen
ADN molde (dilución 1/20 del ADNc)	2 μ L
<i>Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)</i>	0,2 μ L
<i>Phusion HF Buffer 5X</i>	10 μ L
Cebador sentido	2 μ L
Cebador antisentido	2 μ L
<i>dNTP's Mix 10mM</i>	1 μ L
Agua libre de nucleasas	c.s.p 50 μ L

Tabla 5: Condiciones de reacción de PCR para la amplificación de la secuencia codificante de TNF- α

	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Inicial	1	95°C	1 min
Desnaturalización	5	95°C	30 s
<i>Annealing</i>		60°C	30 s
Extensión		68°C	1 min
Desnaturalización	35	95°C	30 s
<i>Annealing</i>		64°C	30 s
Extensión		68°C	1 min
Extensión final	1	68°C	10 min

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa 0,8%. El resultado del gel se visualizó en un transiluminador como describe el punto 3.2.2. Se recortó la banda de interés y se purificó mediante el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean up system* (Promega, #A9281).

Se procedió de la siguiente manera: Inicialmente, al tubo que contiene el fragmento del gel se añadieron 10 μL de Membrane Binding Solution por cada 10 mg de gel a disolver, seguido de una incubación a 60°C hasta la completa disolución del gel. Posteriormente, se transfirió todo el contenido a una columna SV Minicolumn y se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto. Luego, se sometió a una centrifugación a 16000 xg durante 1 minuto y se eliminó el eluido. A continuación, se aplicaron 700 μL de Membrane Wash Solution, se centrifugó nuevamente a 16000 xg durante 1 minuto y se eliminó el eluido. Se repitió este proceso con 400 μL de Membrane Wash Solution, pero esta vez se centrifugó durante 5 minutos. Para eliminar cualquier residuo líquido de los lavados, se colocó la columna en un nuevo tubo de elución y se centrifugó a 16000 xg durante 1 minuto. Finalmente, se situó la columna en un tubo eppendorf de 1,5 mL, se agregaron 30 μL de agua libre de nucleasas sobre la matriz y se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto. Posteriormente, se centrifugó a 16000 xg durante 1 minuto para eluir el ADN.

El ADN se cuantificó siguiendo el procedimiento descrito en el paso 3.2.4 y se almacenó a -20°C.

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

Para la digestión de la secuencia codificante de TNF- α se utilizaron las enzimas de restricción NheI (*Thermo Scientific*TM, #ER0971) y XhoI (*Thermo Scientific*TM, #ER0692), se digirió 1 μg del ADN en un volumen final de 40 μL .

Tabla 6: Mix de reacción para la digestión en volumen final de 40 μL

Para 40 μL de reacción	Volumen
ADN	1 μg
Enzima NheI	0,5 μL
Enzima XhoI	1,5 μL
Buffer Tango 10X	4 μL
Agua libre de nucleasas	c.s.p 40 μL

Dicha mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora. Se almacenó a -20°C hasta su uso.

3.5 Purificación del CDS de TNF- α digerido

El ADN digerido en el paso anterior se purificó utilizando el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean up system* (Promega, #A9281) siguiendo el protocolo detallado en el paso 3.4.

3.6 Obtención del plásmido pcDNA3.1

Se cuantificó la concentración de ADN y el cociente 260/280 mediante espectrofotometría a partir de una miniprep cedida del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay que contenía el plásmido pcDNA3.1 digerido con enzimas NheI y XhoI y purificado. El plásmido se almacenó a -20°C hasta su uso.

3.7 Obtención pcDNA3.1+TNF- α

3.7.1 Ligación del plásmido pcDNA3.1 y el CDS de TNF- α

Se realizó una ligación utilizando una relación 3:1 vector:plásmido empleando T4 DNA Ligase (*Thermo Scientific*TM #EL0011) en un volumen final de 10 μ L. Se agregaron 50 ng de plásmido y se calculó la cantidad de inserto necesaria usando la siguiente fórmula:

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

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

Tabla 7: Mix de reacción para la ligación en volumen final de 10 μ L:

Para 10 μ L de reacción	Volumen
pcDNA3.1 digerido	50 ng
Inserto digerido	21 ng
T4 Ligasa (<i>Thermo Scientific</i> TM)	0,5 μ L
Buffer ligasa 5X	2 μ L
Agua libre de nucleasas	c.s.p 10 μ L

Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y luego durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se almacenaron a -20°C

3.7.2 Transformación del plásmido pcDNA3.1+TNF- α en células competentes

A continuación, se realizó la transformación mediante electroporación de bacterias *E. coli* DH5 α electrocompetentes. Se mezclaron 50 μ L de células DH5 α con 5 μ L de la ligación en hielo y entre mecheros Bunsen. Además, se realizó un control de religación para el cual se mezclaron 50 μ L de competentes con 1,8 μ L de control y como control positivo se mezcló 50 μ L de células DH5 α con 5 μ L de plásmido pUC19. También se procedió a electroporar células DH5 α sin ADN como control negativo. Cada mezcla se transfirió a una celda de electroporación de ancho 0,1 cm (Bio-Rad, #1652083) previamente lavada, enjuagada varias veces con agua ultrapura, esterilizada por luz UV y fría.

Las celdas se colocaron en el electroporador MicroPulser (Bio-Rad, #652100) y se efectuó el pulso eléctrico de 1,8 kV del programa EC1 del electroporador. Inmediatamente se agregó 1 mL de medio SOC, se colectaron las células electroporadas y se recuperaron a 37 °C durante 1 hora con agitación a 210 rpm. Las bacterias transformadas se sembraron en placas de LAB suplementado con ampicilina 100 μ g/mL concentración final. El control negativo de transformación se sembró en placa de medio LAB sin antibiótico y medio LAB suplementado con antibiótico.

3.7.3 Colony PCR de colonias positivas

Se analizaron visualmente las placas y se estriaron 16 colonias en placas de medio LAB suplementado con 100 μ g/mL de ampicilina.

Con la misma ansa que se realizó el estriado se inoculó el tubo de PCR. Se ejecutó una *colony* PCR para evaluar la presencia de la secuencia codificante de TNF- α en colonias transformantes obtenidas a partir de la transformación con el producto de ligación. Se realizaron 16 reacciones de PCR con un volumen final de 25 μ L y cada tubo fue inoculado con la colonia correspondiente para ser analizada. Además, se realizó un control negativo con 1 μ L de agua y un control positivo el cual se utilizó el amplicón obtenido en el paso 3.4.

Tabla 8: Mix de reacción de PCR en volumen final de 25 μ L, para la amplificación de la secuencia codificante de TNF- α :

Para 25 μ L de reacción	Volumen
<i>Taq DNA Polymerase (NEB)</i>	0,125 μ L
<i>Standard Taq Buffer 10X</i>	2,5 μ L
Cebador sentido	0,5 μ L
Cebador antisentido	0,5 μ L

<i>dNTP's Mix 10mM</i>	0,5 µL
Agua libre de nucleasas	c.s.p 25 µL

Tabla 9: Condiciones de reacción de PCR para la amplificación de la secuencia codificante de TNF- α :

	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Inicial	1	95°C	1 min
Desnaturalización	5	95°C	30 s
<i>Annealing</i>		55°C	30 s
Extensión		68°C	1 min
Desnaturalización	35	95°C	30 s
<i>Annealing</i>		59°C	30 s
Extensión		68°C	1 min
Extensión final	1	68°C	10 min

Todos los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa 1%. A partir de las estrías correspondientes a clones positivos para la amplificación se realizaron cultivos líquidos en 5 mL de medio LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y se incubaron durante 16 h a 37°C en agitación.

3.7.4 Miniprep a partir de las colonias positivas y congelado de stock bacteriano

Se tomó un 1 mL a partir de los cultivos líquidos obtenidos, se colocó en un criovial y se agregaron 100 µL de glicerol. Estos crioviales fueron almacenados a -80°C.

Luego se realizó una Miniprep a partir del cultivo líquido restante utilizando el kit comercial *ZR Plasmid Miniprep (Zymoresearch)* siguiendo el protocolo. Se procedió de la siguiente manera: se realizó una centrifugación de las bacterias, seguida de la resuspensión del pellet bacteriano en 200 µL de Buffer P1. Posteriormente, se añadieron 200 µL de Buffer P2, se mezcló mediante inversión del tubo y se incubó durante 1 a 2 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, se incorporaron 400 µL de Buffer P3, se mezcló y se incubó nuevamente durante 1 a 2 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se sometieron a una centrifugación a 12000 xg durante 2 minutos y se transfirió el sobrenadante a una columna

Zymo-Spin IIN. La columna se centrifugó a 12000 xg durante 30 segundos, se desechó el eluido y se adicionaron 200 µL de Endo-Wash Buffer. Se realizó otra centrifugación, se desechó el eluido y se añadieron 400 µL de Plasmid Wash Buffer. Finalmente, se colocó la columna en un tubo eppendorf de 1,5 mL, se aplicaron 30 µL de agua libre de nucleasas sobre la matriz, se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto y se centrifugó a 12000 xg durante 30 segundos.

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

Se procedió a realizar tres ensayos de restricción de la construcción pcDNA3.1 + TNF-α con las enzimas NcoI (*New England Biolabs #R0193S*), NmeAIII (*New England Biolabs #R0711S*) y SpeI (*Thermo Scientific™ #ER1252*) a partir de la miniprep realizada en el paso anterior 3.7.4.

El mix de reacción para la digestión con la enzima NcoI se detalla en la siguiente tabla 10. Dicha mezcla fue incubada durante 1 hora a 37°C.

Tabla 10: Mix de reacción para la digestión con NcoI en volumen final de 50 µL:

Para 50 µL de reacción	Volumen
Plásmido pcDNA3.1 + TNF-α	1 µg
Enzima NcoI	1 µL
NEB Buffer 10X	5 µL
Agua libre de nucleasas	c.s.p 50 µL

El mix de reacción para la digestión con la enzima NmeAIII se detalla en la siguiente tabla 11. Dicha mezcla fue incubada durante 1 hora a 37°C.

Tabla 11: Mix de reacción para la digestión con NmeAIII en volumen final de 25 µL:

Para 25 µL de reacción	Volumen
Plásmido pcDNA3.1 + TNF-α	0,5 µg
Enzima NmeAIII	0,5 µL
rcutsmart Buffer 10X	2,5 µL
Agua libre de nucleasas	c.s.p 25 µL

El mix de reacción para la digestión con la enzima SpeI se detalla en la siguiente tabla 12. Dicha mezcla fue incubada durante 1 hora a 37°C.

Tabla 12: Mix de reacción para la digestión con SpeI en volumen final de 20 µL:

Para 20 µL de reacción	Volumen
Plásmido pcDNA3.1 + TNF-α	1 µg
Enzima SpeI	2 µL
Buffer tango 10X	2 µL
Agua libre de nucleasas	c.s.p 20 µL

Luego del tiempo de incubación, los tres ensayos de restricción se corrieron en gel de agarosa 1 %. El resultado del gel se visualizó en un transiluminador como describe el punto 3.2.2.

3.8 Obtención pGEM®-T+TNF-α

3.8.1 Ligación del plásmido pGEM®-T y el CDS de TNF-α

Se realizó una ligación utilizando una relación 3:1 vector:plásmido utilizando *T4 DNA Ligase* (*Promega #M180A*) en un volumen final de 10 µL. Se agregaron 50 ng de plásmido y se calculó la cantidad de inserto necesaria usando la siguiente fórmula:

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

Además, se realizó un control de positivo en donde no se agregó inserto a la mezcla de reacción, se le colocó un inserto de ADN control que venía con el kit *pGEM®-T Easy Vector System I* (*Promega #A1360*).

Tabla 13: Mix de reacción para la ligación en volumen final de 10 µL:

Para 10 µL de reacción	Reacción estándar	Control positivo
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5 µL	5 µL
<i>pGEM®-T</i> or <i>pGEM®-T Easy Vector</i> (50ng)	1 µL	1 µL
PCR product	3 µL	-

Control Insert DNA	-	2 μ L
T4 DNA Ligase (3 weiss units/ μ l)	1 μ L	1 μ L
Agua libre de nucleasas	c.s.p 10 μ L	c.s.p 10 μ L

Luego de realizar las mezclas, se incubaron las reacciones durante la noche a 4°C. Posteriormente se almacenó a -20°C

3.8.2 Transformación del plásmido pGEM®-T +TNF- α en células competentes

Para clonar el vector en *E. coli* DH5 α , se llevó a cabo la transformación mediante electroporación de las células competentes DH5 α con la ligación, siguiendo el procedimiento previamente establecido en el punto 3.7.2. Además, se realizó la transformación de un control positivo y un control sin plásmido. Tras la recuperación, las bacterias fueron sembradas en placas con medio LB complementado con ampicilina 100 μ g/mL concentración final, X-gal a una concentración de 80 μ g/ml, e IPTG a una concentración de 0,5mM. Las placas se incubaron a 37 °C y se procedió a la selección de las bacterias transformantes mediante el método de *screening* blanco-azul.

3.8.3 Colony PCR de colonias positivas

Se analizaron visualmente las placas y se restringió la única colonia blanca en placa de medio LAB suplementado con 100 μ g/mL de ampicilina, 0,5 mM IPTG y 80 μ g/mL X-Gal.

Con la misma ansa que se realizó el estriado se inoculó el tubo de PCR que contiene los reactivos para la amplificación de la secuencia codificante de TNF- α , de la misma forma que en el paso 3.7.3. Se realizó una reacción con un volumen final de 25 μ L, el tubo fue inoculado con la colonia correspondiente para ser analizada y además se realizó un control negativo con 1 μ L de agua y un control positivo el cual se utilizó el amplicón obtenido en el paso 3.5.

Todas las reacciones de PCR se corrieron en un gel de agarosa 1%. A partir de la estría correspondiente al clon positivo para la amplificación se realizaron cultivos líquidos en 5 mL de medio LB suplementado con 100 μ g/mL de ampicilina y se incubaron durante 16 h a 37°C en agitación.

3.8.4 Miniprep a partir de las colonias positivas

A partir de 5 mL cultivos líquidos *overnight* de las bacterias conteniendo los plasmidos de interés se realizó una miniprep utilizando el kit comercial *ZR Plasmid Miniprep (Zymoresearch)* siguiendo el protocolo detallado en el punto 3.7.4.

3.8.5 Ensayo de restricción del plásmido pGEM®-T +TNF- α

Para corroborar la presencia e identidad de la secuencia ligada al plásmido pGEM®-T Easy, se realizó un ensayo de restricción en la colonia blanca a partir de la placa conteniendo las bacterias electroporadas con la ligación. Se realizó ensayo de restricción de la construcción pGEM®-T+TNF- α con la enzima NotI a partir de la miniprep realizada en el paso anterior 3.8.4. El mix de reacción para la digestión del plásmido pGEM®-T+TNF- α con NotI se detalla en la siguiente tabla 14.

Tabla 14: Mix de reacción para la digestión con NotI en volumen final de 50 μ L:

Para 50 μ L de reacción	Volumen
Plásmido pcDNA3.1 + TNF- α	1 μ g
Enzima NotI	1 μ L
NEB Buffer 10X	5 μ L
Agua libre de nucleasas	c.s.p 50 μ L

Dicha mezcla fue incubada durante 1 hora a 37°C. Luego del tiempo de incubación, el ensayo de restricción se corrió en gel de agarosa 1%. El resultado del gel se visualizó en un transiluminador como describe el punto 3.2.2.

3.9 Obtención pcDNA3.1(+)+TNF- α

3.9.1 Transformación del plásmido pcDNA3.1(+)+TNF- α en células competentes

El plásmido pcDNA3.1+/C-(K)-DYK (NM_000594.3) que incluye la secuencia codificante de TNF- α (NM_000594.4) (Anexo 3) fue adquirido en Genscript (Anexo 2).

Se siguió el protocolo detallado en el punto 3.7.2 para la transformación del plásmido pcDNA3.1+/C-(K)-DYK+TNF- α en bacterias *E. coli* DH5 α electrocompetentes. Se mezclaron 50 μ L de células DH5 α con 5 μ L del plásmido y se electroporaron. También se procedió a electroporar células DH5 α sin ADN como control negativo. Se recolectaron las células electroporadas y se recuperaron a 37 °C durante 1 hora con agitación a 210 rpm. Las bacterias transformadas se sembraron en placas de LAB suplementado con ampicilina 100 μ g/mL concentración final. El control negativo de transformación se sembró en placa de medio LAB sin suplementado con antibiótico y medio LAB suplementado con antibiótico.

3.9.2 Ensayo de restricción del plásmido pcDNA3.1(+)+TNF- α

Se restringió una colonia de la placa con bacterias *E. coli* DH5 α transformadas con el plásmido pcDNA3.1(+)+TNF- α . Se realizaron cultivos líquidos en 5 mL de medio LB suplementado con 100 μ g/mL de ampicilina y se incubaron durante 16 h a 37°C en agitación. Luego se realizó una Miniprep a partir de los cultivos líquidos utilizando el kit comercial *ZR Plasmid Miniprep* (*Zymoresearch*) siguiendo el protocolo detallado en el punto 3.13.

Se realizaron dos ensayos de restricción de la construcción pcDNA3.1(+)+TNF- α con la enzima BbsI y NheI y PstI a partir de la miniprep realizada. El mix de reacción para la digestión del plásmido pcDNA3.1(+)+TNF- α con BbsI se detalla en la siguiente tabla 15. Dicha mezcla fue incubada durante 4 horas a 37°C.

Tabla 15: Mix de reacción para la digestión con BbsI en volumen final de 20 μ L:

Para 20 μ L de reacción	Volumen
Plásmido pcDNA3.1+/C-(K)-DYK + TNF- α	2 μ g
Enzima BbsI	2 μ L
Buffer G10X	2 μ L
Agua libre de nucleasas	c.s.p 20 μ L

El mix de reacción para la digestión del plásmido pcDNA3.1(+)+TNF- α con NheI y PstI se detalla en la siguiente tabla 16. Dicha mezcla fue incubada durante 4 horas a 37°C.

Tabla 16: Mix de reacción para la digestión en volumen final de 20 μ L:

Para 20 μ L de reacción	Volumen
Plásmido pcDNA3.1(+)+TNF- α	2 μ g
Enzima NheI	1 μ L
Enzima PstI	1 μ L
Buffer O 10X	2 μ L
Agua libre de nucleasas	c.s.p 20 μ L

Luego del tiempo de incubación, los ensayos de restricción se corrieron en gel de agarosa 1 %. El resultado del gel se visualizó en un transiluminador como describe el punto 3.2.2.

3.10 Transfección de células HEK-293 con el plásmido pcDNA3.1(+)+TNF- α

Siguiendo las instrucciones del fabricante se realizó la transfección con Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*, #11668019) con el plásmido pCDNA3.1(+)+TNF- α . Se transfectaron 3 botellas T75 conteniendo células HEK-293 con una confluencia del 70% y se realizó la transfección con una relación ADN:Lipofectamina 1:3. Primero se mezclaron por separado 4,5 mL de DMEM con 45 μ g de plásmido y 4,5 mL de DMEM con 135 μ L de Lipofectamina. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se mezclaron los dos contenidos en un mismo tubo y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron a cada botella 3 mL de la mezcla y se colocaron en la estufa a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. Transcurridas 20 horas de la transfección se realizó un cambio de medio de cultivo para eliminar el medio de cultivo que contenía la lipofectamina y se agregó medio de cultivo fresco. Pasando 24 horas se cambió el medio de cultivo por DMEM + 10% SFB con 800 μ g/mL de G418. Cada 3 días durante dos semanas se sustituyó el medio de cultivo por medio fresco con 800 μ g/mL de G418.

3.11 Clonado por dilución límite de células HEK-293_TNF- α .

Las células transfectadas fueron tripsinizadas y se realizó una dilución de 10 células/mL diluyendo con medio fresco y medio condicionado con una relación 1:1. El medio condicionado es el sobrenadante de células HEK-293 confluentes con un mínimo de 72 h. Se sembraron 3 placas de 96 pozos, en el cual se sembraron 100 μ L de esta dilución en cada pozo de la placa, quedando así una concentración de 1 células por pozo. En los pozos del borde de las placas se agregaron 200 μ L de PBS 1X.

La placa se examinó a diario con el propósito de identificar pozos que presentaran crecimiento a partir de una sola célula. Se cambió el medio de cultivo según las necesidades de cada clon. Cuando los pozos alcanzaron una confluencia cercana al 100% fueron transferidos a una placa de 24 pozos. Luego a una placa de 12 pozos, más tarde a una de 6 pozos, se siguió con una botella T25 y por último se transfirieron las células a una botella T75.

3.12 Curva de crecimiento de HEK-293_TNF- α .

A partir de la línea celular policlonal, se sembró una placa de 24 pozos con una concentración de 8×10^4 células transformadas por pozo en medio DMEM + 10% SFB + 800 μ g/mL G418. Se recogió el sobrenadante de dos pozos cada 24 horas, se centrifugó a 260 xg durante 5 minutos y se guardó el sobrenadante para el posterior almacenamiento a -20°C. Luego se levantaron las células de los dos pozos que se tomó el sobrenadante con 100 μ L de tripsina y se inactivó con 400 μ L 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.

Se realizó la misma metodología para las células HEK-293, se sembró la misma concentración de células 8×10^4 en medio DMEM + 10% SFB. Se levantaron las células de los dos pozos con 100 μ L de tripsina y se realizó un recuento en cámara de Neubauer.

3.13 Confirmación de la correcta transfección

3.13.1 Extracción de ADN

Se realizó una extracción de ADN a partir del cultivo policlonal, los cultivos monoclonales y el cultivo sin transformar. Primero, cuando la botella T25 llegó a una confluencia del 50%, se levantó la monocapa y se guardó el pellet a -80°C . Para extraer el ADN, primero se digirió el pellet en 500 μ l de buffer de lisis de ADN a 65°C durante 1 hora. Finalizado el tiempo, se agregaron 300 μ l de NaCl 5M y luego se realizó una incubación en hielo durante 10 minutos. Se centrifugó la muestra a 9500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se removió el sobrenadante a un tubo limpio. Se centrifugó nuevamente el sobrenadante y se transfirió 600 μ l del sobrenadante a un tubo limpio. Luego, se añadió a la muestra 800 μ l de EtOH 95% pre-enfriado a -20°C y se centrifugó a 14000 g durante 10 minutos. Posteriormente, se lavó el pellet dos veces con EtOH 70% pre-enfriado a -20°C durante 5 minutos cada vez. Se secó completamente el pellet a 55°C ya que los restos de etanol pueden inhibir las reacciones de PCR. Finalmente, se resuspendió el pellet en agua ultrapura estéril. Se realizó el mismo procedimiento con todas las muestras.

3.13.2 Confirmación de la correcta transfección

Se realizó una amplificación de la secuencia codificante de TNF para confirmar que se han transfectado correctamente las células con *primers* específicos (tabla 17). Este proceso se llevó a cabo siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante de la enzima *NZYTaq II DNA polymerase (nzytech)*.

Tabla 17: Secuencias de *primers forward* y *reverse* para TNF- α

Gen	Primers	Secuencia
TNF- α	Fw	5'-AAATGGGCGGTAGGCGTGT-3'
	Rv	5'-GGAGGTTGACCTTGGTCTGG-3'

Tabla 18: Mix de reacción de PCR en volumen final de 50 μ L, para la amplificación de la muestra a analizar:

Para 50 μ L de reacción	Volumen
<i>NZYTaq II DNA polymerase</i>	0,5 μ L
<i>Taq Buffer 10X</i>	5 μ L
MgCl ₂ 50mM	2,5 μ L
<i>Primer forward</i> 10mM (5'-AAATGGGCGGTAGGCGTGT-3')	0,5 μ L
<i>Primer reverse</i> 10mM (5'-GGAGGTTGACCTTGGTCTGG-3')	0,5 μ L
dNTP's Mix 10mM	1 μ L
ADN molde	200 ng
Agua libre de nucleasas	c.s.p 50 μ L

Tabla 19: Condiciones de reacción de PCR para la amplificación de la muestra a analizar:

	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Inicial	1	95°C	3 min
Desnaturalización	35	94°C	30 s
<i>Annealing</i>		57°C	30 s
Extensión		72°C	30 s
Extensión final	1	72°C	10 min
		4°C	-

Los resultados obtenidos fueron posteriormente analizados mediante electroforesis en gel de agarosa. Luego se tomaron 5 μ L de cada reacción de PCR y se corrió en un gel de agarosa 1% como se describe en el punto 3.2.2. El resultado obtenido se visualizó en el transiluminador *E-Gel Imager™ System with UV light Base (Invitrogen)* y se obtuvieron las imágenes a través del software *GelCapture™*.

3.14 Extracción de ARN

A partir de los cultivos monoclonales obtenidos en el paso 3.11 se realizó extracciones de ARN empleando el kit Quick-RNA Miniprep Kit (Zymoresearch #R1054) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó una botella T75 de cada clon obtenido. Se levantó la monocapa cuando las botellas alcanzaron una confluencia cercana a 100%, se colocó el volumen correspondiente a $2,5 \times 10^6$ en un tubo falcon y se guardó a -80°C . Se procedió de la siguiente manera, se centrifugaron las células a 400 xg durante 5 minutos y se resuspendió el pellet resultante en 300 μL de RNA Lysis Buffer. Posteriormente, se transfirió todo el lisado a una columna Spin-Away™ Filter y se centrifugó a 12000 xg durante 30 segundos. Luego, se mezcló el sobrenadante con 300 μL de etanol 96% (v/v) y se transfirió el eluido a una columna Zymo-Spin™ IIICG Column, donde se realizó una nueva centrifugación a 12000 xg durante 30 segundos, desechando el eluido. Se procedió a realizar un tratamiento de DNasa a la matriz de la columna para eliminar los restos de ADN que pudieran haber quedado. Para esto, se lavó la columna con 400 μL de RNA Wash Buffer y se centrifugó nuevamente a 12000 xg por 30 segundos. A continuación, se añadió a la columna una mezcla compuesta por 5 μL de DNasa I (1U/ μL) y 75 μL de DNA Digestion Buffer y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se adiciono 400 μL de RNA Prep Buffer a la columna y se centrifugó a 12000 xg durante 30 segundos. Se efectuaron dos lavados con RNA Wash Buffer, realizando una centrifugación a 12000 xg durante 1 minuto. Por último, se eluyó el ARN en 50 μL de agua libre de ARNasas. Los ARNs se almacenaron a -80°C .

La concentración de ARN presente en las muestras analizadas se determinó mediante absorbancia según lo detallado en el paso 3.2.4. Además, para confirmar la extracción de ARN y evaluar la integridad de este, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% a 100 V como se describe en el paso 3.2.2. Se realizó un paso previo de lavado con agua destilada de los materiales usados. El producto del gel se visualizó en un transiluminador y se obtuvieron las imágenes a través del software GelCapture™.

3.15 Confirmación de la eliminación de ADNg en las muestras de ARNm

Se verificó la eliminación del ADN genómico después de someterlo al tratamiento con DNasa I mediante la realización de PCR dirigida a la subunidad ribosomal 18S. Los resultados obtenidos fueron posteriormente analizados mediante electroforesis en gel de agarosa según lo detallado en el paso 3.2.2. Este proceso se llevó a cabo siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante de la enzima *Taq DNA polymerase* (Thermo Scientific™). Se preparó la siguiente mezcla de reacción:

Tabla 20: Mix de reacción de PCR en volumen final de 25 μL , para la amplificación de la muestra a analizar:

Para 25 μL de reacción	Volumen
-----------------------------------	---------

<i>Taq DNApol</i>	0,125 µL
<i>Taq Buffer 10X</i>	2,5 µL
MgCl ₂ 50mM	1 µL
<i>Primer forward</i> 10mM (5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3')	0,5 µL
<i>Primer reverse</i> 10mM (5'-TCTCAGGCTCCCTCTCCGGA-3')	0,5 µL
dNTP's Mix 10mM	0,5 µL
Molde	4 µL
Agua libre de nucleasas	c.s.p 25 µL

Tabla 21: Condiciones de reacción de PCR para la amplificación de la muestra a analizar:

	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Inicial	1	95°C	1 min
Desnaturalización	30	94°C	15 s
<i>Annealing</i>		60°C	15 s
Extensión		68°C	15 s
Extensión final	1	68°C	5 min
		4°C	-

Luego se tomaron 5 µL de cada reacción de PCR y se corrió en un gel de agarosa 1% como se describe en el punto 3.2.2. El resultado obtenido se visualizó en un transiluminador y se obtuvieron las imágenes a través del software GelCapture™.

3.16 Eliminación de ADN genómico

Para las muestras que no eliminan completamente el ADN genómico, se realizó un nuevo tratamiento de las muestras de ARN con ADNasa, se empleó la *DNAsa I* (Thermo Scientific™,

#EN0521), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Brevemente, en un tubo libre de nucleasas se colocó la siguiente cantidad de cada componente:

Tabla 22: Mix de reacción para tratamiento con DNAsa I

	Volumen
Buffer reacción 10X suplementado con MgCl ₂	1 µL
DNAsa I	1 µL
ARN	8 µL

Se incubó durante 1 hora a 37°C en termociclador *SimpliAmp Thermal Cycler* (Applied Biosystems). Luego, se le agregó a la reacción 1 µL de una solución EDTA 50 mM y se incubó a 65°C durante 10 minutos.

3.17 Retrotranscripción del ARNm a ADNc

Para llevar a cabo la retrotranscripción de las muestras de ARN extraídas, se utilizó la enzima *Revertaid Reverse Transcriptase* (Thermo Scientific™, #EP0441), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. En resumen, se añadieron los componentes en el orden especificado a un tubo libre de nucleasas:

Tabla 23: Mezcla 1 para la transcripción:

	Volumen
ARN molde	500 ng
Oligo (dT) 500 µg/mL	1 µL
Agua libre de nucleasas c.s.p	12,5 µL

Luego de realizar la mezcla y se incubó a 65°C por 5 minutos. Posteriormente se agregaron en el siguiente orden:

Tabla 24: Mezcla 2 para continuar con la transcripción:

	Volumen
Buffer de reacción 5x	4 µL

dNTPs 1 mM cada uno	2 µL
<i>RevertAid Reverse Transcriptase</i> (200 U)	1 µL
Agua libre de nucleasas	0,5 µL

Tras la mezcla, se incubó a 42°C durante 60 minutos, seguido de una segunda incubación a 70°C durante 10 minutos para inactivar la enzima. El ADNc resultante se almacenó a -80°C.

3.18 Análisis de expresión génica

3.18.1 Diseño de primers

Se llevaron a cabo el diseño de cebadores utilizando la herramienta de *Primer designing tool* del *NCBI (National Center for Biotechnology Information)* y se procedió a evaluar el comportamiento teórico previsto de estos *primers* utilizando el software *OligoAnalyzer™ Tool de IDT (Integrated DNA Technologies)*. A continuación, se presentan los detalles de los cebadores utilizados en este estudio:

Tabla 25: Secuencias de *primers forward* y *reverse* para TNF- α para qPCR:

Gen	Cebador	Secuencia
TNF- α	Fw2	5'-TCAGAGGGCCTGTACCTCAT-3'
	Rv	5'-GGAGGTTGACCTTGGTCTGG-3'

Se utilizaron los genes constitutivos Beta-actina y GADPH, cuyos *primers* fueron diseñados y proporcionados por el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay. Las secuencias de estos *primers* son las siguientes:

Tabla 26: Secuencias de *primers forward* y *reverse* para β -actina y GADPH:

Gen	Cebador	Secuencia
<i>Beta-actina</i>	Fw	5'-ACAGAGCCTCGCCTTTGCC-3'
	Rv	5'- GAGGATGCCTCTCTTGCTCTG-3'
<i>GADPH</i>	Fw	5'-GGTGACTAACCTGCGCTCC-3'
	Rv	5'-GCCTCGCTCCACCTGACTT-3'

3.18.2 Curva de eficiencia de *primers*

Se realizó una curva de eficiencia de *primers* para el gen seleccionado previo al análisis de expresión del gen. A la vez, se seleccionaron *Beta-actina* y *GADPH* como gen housekeeping.

Con el objetivo de determinar las concentraciones adecuadas de molde para la evaluación de la expresión del gen, se llevó a cabo una curva de eficiencia utilizando los *primers* diseñados para el gen seleccionado. A partir de los ADNc obtenidos de los distintos clones, se preparó un pool de ADNc y se realizaron diluciones en agua libre de nucleasas. La muestra y sus diluciones (1/10, 1/50, 1/250, 1/1250 y 1/6250) fueron evaluadas.

Se empleó SYBR Green Mix (*Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X)*, Thermo Scientific™, #K0251) como master mix para la realización de las PCR en tiempo real. Se incluyó un blanco utilizando 1 µL de agua libre de nucleasas en lugar de ADNc como molde. Para cada reacción se emplearon los siguientes componentes:

Tabla 27: Mix de reacción para la qPCR en un volumen final de 10 µL:

	Volumen
SYBR Green Mix	5 µL
Primer Fw	1 µL
Primer Rv	1 µL
Agua libre de nucleasa	2 µL
ADNc	1 µL

Se empleó la siguiente configuración de ciclado para las corridas:

Tabla 28: Condiciones de reacción de qPCR:

	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Pretratamiento UDG	1	50°C	2 min
Inicial	1	95°C	10 min
Desnaturalización	40	95°C	15 s
<i>Annealing</i>		60°C	1 min

Seguido de dicha configuración, se realizó una etapa de curva de *melting*:

Tabla 29: Condiciones de reacción de qPCR para la etapa de la curva de *melting*:

Temperatura	Tiempo
95°C	15 s
60°C	1 min
95°C	15 s (rampa de aumento a 0,1°C/segundo)

Para la realización de las corridas de PCR en tiempo real se empleó Rotor-Gene Q (Qiagen) y QuantStudio™, 5 Real-Time PCR System (*Thermo Scientific™*, #A28138) y para el análisis de la información se emplearon los softwares Rotor-Gene Q 2.1.0.9 (Qiagen) y QuantStudio™ Design & Analysis Software (*Thermo Scientific™*).

3.18.3 Análisis de expresión genes

Para el análisis de la expresión de los distintos genes mencionados en el punto 3.18.2, se realizó una dilución 1/10 en agua libre de nucleasas de las distintas muestras a analizar. Las condiciones de reacción y el programa de ciclado utilizado fueron aplicados de la misma manera como los utilizados para las curvas de eficiencia.

Para la realización de las corridas de PCR en tiempo real se utilizó el termociclador *Rotor-Gene Q (QIAGEN #R0514132)* y para el análisis de la información se empleó el software *Rotor-Gene Q Series*.

3.19 Análisis mediante western blot de TNF- α

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

Las células HeLa se cultivaron en una botella T75 hasta que alcanzaron una confluencia del 80%. En ese punto, se les trató con una concentración de 100 ng/mL de LPS durante un período de 20 horas. Después de esto, se levantó la monocapa, se transfirió todo el volumen a un tubo Eppendorf y se almacenó a -80°C para su posterior uso.

3.19.2 Lisis celular

Se cultivaron las células transformadas, tanto con antibiótico como sin él, así como las células no transformadas como control negativo y las células HeLa tratadas con LPS como control positivo, y se procedió a retirar y guardar el medio de cultivo de todas las botellas. Posteriormente, se recolectó el pellet de células de cada una de ellas. Al pellet se le adiciono

PBS 1X frío y se lavó las células centrifugando a 2000 xg durante 5 minutos a 4 °C. Luego se adiciono 1 mL de Buffer de Lisis y se agitó el contenido durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, se centrifugaron los tubos a 16000 xg durante 20 minutos a 4 °C y finalmente, el sobrenadante que contenía el lisado celular fue almacenado a -80 °C hasta su análisis.

3.19.3 Precipitación con ácido tricloroacético

Para precipitar proteínas con ácido tricloroacético (TCA), primero se colocó el TCA 20% respetando una relación 1:1 con el sobrenadante de las células y el ácido tricloroacético. Luego se incubaron las muestras en hielo durante 30 minutos y se centrifugó a 12.000 xg 15 minutos a 4°C. Se realizaron 3 lavados donde cuidadosamente se removió el sobrenadante, se agregaron 500 µL acetona fría y se centrifugó a 12.000 xg 5 minutos a 4°C. Luego se removió el sobrenadante y se dejó secar el pellet. Se resuspendió el pellet en 20 µL de *sample buffer* 1X y se hirvió por 5 min. Finalmente, se vortexearon las muestras vigorosamente por 1 minuto, spin por 30 seg y se enfriaron las muestras en hielo.

3.19.4 Electroforesis de proteínas

Para el análisis de la proteína expresada en este estudio, se empleó el método de electroforesis desnaturante con SDS en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). La preparación de los geles de poliacrilamida al 12% de 0,75 mm de espesor, según el protocolo de Bio-Rad (36).

Las muestras cargadas fueron sometidas previamente a un tratamiento con buffer de carga reductor 1X durante 10 minutos a 95 °C, con el propósito de desnaturar las proteínas y reducir los enlaces de disulfuro. Se utilizó el marcador de peso RGB Plus Prestained Protein Ladder, 8 a 245 kDa (MAESTROGEN, #02102-250), se colocó el gel en la cuba de electroforesis se utilizó la cuba *Vertical Electrophoresis Tank* (JUNYI, #JY-SCZ2+), la fuente *PowerPac™ Basic Power Supply* (BioRad) y el buffer de corrida Tris-glicina, y se ejecutó hasta que el colorante Azul de Bromofenol alcanzara casi el borde inferior del gel. La corriente eléctrica se mantuvo constante a un voltaje de 120 V.

3.19.5 Western blot

Luego de la electroforesis de proteínas, se realizó la transferencia húmeda de las proteínas en el gel a una membrana de PVDF (Amersham™ Hybond® P Western blotting membranes, GE Healthcare). Se procedió con el armado del Western Blot sandwich, que consiste en colocar primero la esponja iBlot™ Disposable Sponage, el iBlot™ NC Anode Stack BOTTOM Regular que contiene la membrana, el gel de electroforesis, iBlot™ Filter Paper Regular, iBlot™ NC Cathode Stack TOP Regular, en ese orden se van colocando en el aparato iBlot® Gel Transfer Device. Se realizó la transferencia en el programa P3 durante 7 minutos. Luego de realizada la transferencia se desarmó el sistema, se retiró la membrana, se enjuagó con agua destilada y se tiñó con colorante rojo ponceu para visualizar las proteínas totales. Luego

se enjuaga con agua destilada y se colocó en solución de bloqueo a 4°C *overnight*. Posteriormente se enjuagó la membrana con PBS 1X 0,05%v/v TWEEN® 20 y se procedió a la incubación con el anticuerpo primario; un anticuerpo monoclonal de ratón específico para TNFalpha mouse Anti-TNF alpha antibody [52B83] (abcam, ab1793) durante 1,5 hr a 25°C y 120 rpm. Transcurrido el tiempo se realizan 3 lavados de 10 minutos con PBS 1X 0,1 %v/v TWEEN® 20 a 100 rpm durante 10 min. Se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a fosfatasa alcalina, Rabbit Anti-Mouse IgG (H+L) Alkaline Phosphatase Conjugated (Antibodies, No. ABIN101785), durante 1 hr a 25 °C y 100 rpm. A continuación, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X 0,05 %v/v TWEEN® 20 a 120 rpm. Todos los pasos se realizaron con los volúmenes necesarios para cubrir la membrana. Se realizó un último enjuague con agua destilada y se continuó con el revelado.

Para realizar el revelado, se cubrió la membrana con aproximadamente 1 ml de la solución premezclada de BCIP/NBT y se incubó a temperatura ambiente durante 1 a 5 minutos hasta que se desarrolló el color. Posteriormente se detuvo el desarrollo de color agregando agua para detener la reacción.

4. Resultados y discusión

4.1 Obtención de la secuencia codificante de TNF- α purificado y digerido

Esta tesis se enfocó en la obtención de una línea celular recombinante que exprese TNF- α humano. Este objetivo había sido abordado en trabajos anteriores, obteniendo algunos avances y reactivos que sirvieron de base para este trabajo (36).

Para la obtención de la secuencia codificante de TNF- α se utilizó ADNc preparado por Valle (37). Este ADNc fue obtenido a partir de ARNm de células HeLa tratadas con una concentración final de 100 ng/mL de LPS que de acuerdo con una búsqueda bibliográfica induce la expresión de esta proteína (38).

Los *primers* utilizados para la amplificación de la secuencia habían sido previamente diseñados (37). Los mismos cuentan con los sitios de restricción para las enzimas NheI y XhoI. El *primer forward* contiene un sitio de reconocimiento para la enzima NheI en el extremo 5' (GCTAGC) y el *primer reverse* contiene un sitio de reconocimiento para la enzima XhoI en el extremo 3' (CTCGAG). Las secuencias de los *primers* utilizados se exponen en la Tabla 29.

Tabla 29: Secuencia del *primer forward* (TNF_NheI_Fw) y *reverse* (TNF_XhoI_Rv) y sus respectivos sitios de corte (subrayado)

Primers	Secuencia 5' -3'
TNF_NheI_Fw	CACGGCG <u>GCTAGC</u> CTCTCTCCCCTGGAAAGGAC
TNF_XhoI_Rv	TAACTCGAGAGAGGTTGAGGGTGTCTGAAGGA

Para obtener la secuencia codificante de TNF- α se realizaron tres reacciones de PCR utilizando un volumen final de 50 μ L. Se llevaron a cabo tres amplificaciones con el fin de obtener cantidades significativas del amplicón, compensando así la pérdida inherente al proceso de purificación.

El análisis de los productos amplificados de PCR se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa 0,8% (Figura 1), donde se muestra una banda entre 800 y 900 pb. Es factible que esta banda se corresponda a la amplificación de la secuencia codificante, ya que el tamaño del amplicón esperado tiene un peso molecular de 830 pb. Además de la banda de interés, se detectaron dos bandas de menor intensidad y peso molecular. Una de estas bandas, presente en el carril 2 correspondiente al control negativo, sugiere una posible contaminación. Por esta razón, se optó por purificar la banda de interés directamente del gel. Posteriormente, se cuantificó y se sometió a una digestión con las enzimas NheI y XhoI para

la clonación del amplicón en el plásmido pcDNA3.1. Finalmente, se llevó a cabo una purificación adicional obteniéndose 0,49 μg a una concentración de 9,8 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (Figura 2).

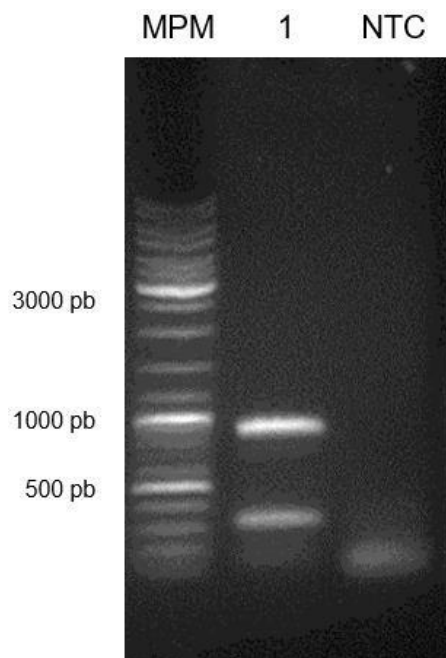


Figura 1: Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8 % de productos de PCR amplificados con los *primers* TNF_NheI_Fw y TNF_XhoI_Rv. **[MPM]** Marcador de peso molecular. **[1]** Amplificación del CDS de TNF- α a partir de ADNc. **[NTC]** Control negativo de la reacción de PCR.

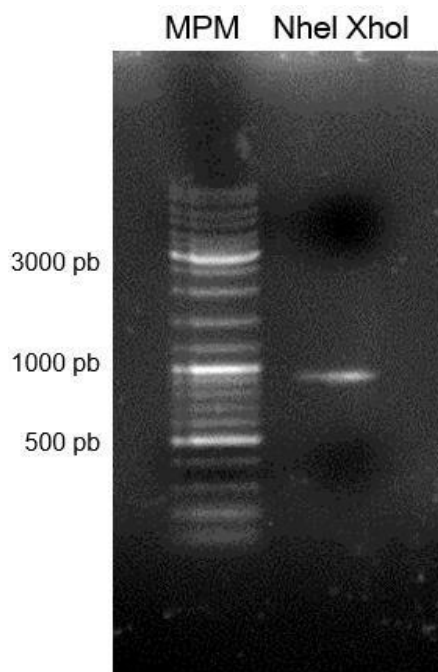


Figura 2: Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % de la secuencia codificante de TNF- α purificada y digerida. **[MPM]** Marcador de peso molecular. **[NheI XhoI]** Secuencia codificante de TNF- α purificada y digerida con las enzimas NheI y XhoI.

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

El plásmido pcDNA3.1 digerido con enzimas NheI y XhoI y purificado fue cedido del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay.

Una vez cuantificadas las muestras digeridas y purificadas se procedió con la ligación entre el plásmido pcDNA3.1 y la secuencia codificante de TNF- α . Además, se estableció un control de religación en el cual no se agregó inserto a la mezcla de reacción, permitiendo así evaluar la religación del plásmido. Luego se llevó a cabo la transformación de células DH5 α competentes por electroporación, seguida de la siembra en placas de medio LAB suplementado con ampicilina.

Se observaron colonias tanto en las placas de control como en aquellas conteniendo pcDNA3.1+TNF- α . La similitud en el número de colonias en ambas placas sugiere una posible religación del vector. No obstante, se mantiene la posibilidad de identificar colonias portadoras del inserto deseado. Además, se constató el éxito de la transformación, mediante la visualización de colonias en placas de LAB suplementado con ampicilina sembradas con células DH5 α transformadas con el plásmido pUC19. La ausencia de crecimiento en las placas de medio LAB con ampicilina sembradas con células DH5 α sin ADN, sirvió como control negativo, mientras que el crecimiento observado en las placas de medio LAB sembradas con células DH5 α sin someter a electroporación confirmó la viabilidad de las células.

Dado estos hallazgos, se optó por analizar 16 colonias de la placa buscando identificar alguna que portara la construcción deseada. Las colonias fueron analizadas mediante *colony* PCR con *primers* específicos para amplificar la secuencia codificante de TNF- α .

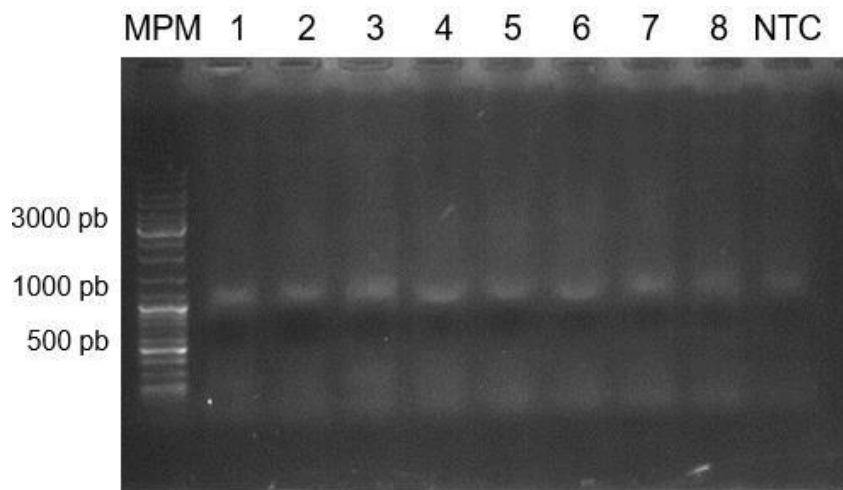


Figura 3: Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % de la *colony* PCR con primers específicos para amplificar la secuencia codificante de TNF- α . **[MPM]** Marcador de peso molecular. **[1-8]** Clones 1-8. **[NTC]** Control negativo de la reacción de PCR.

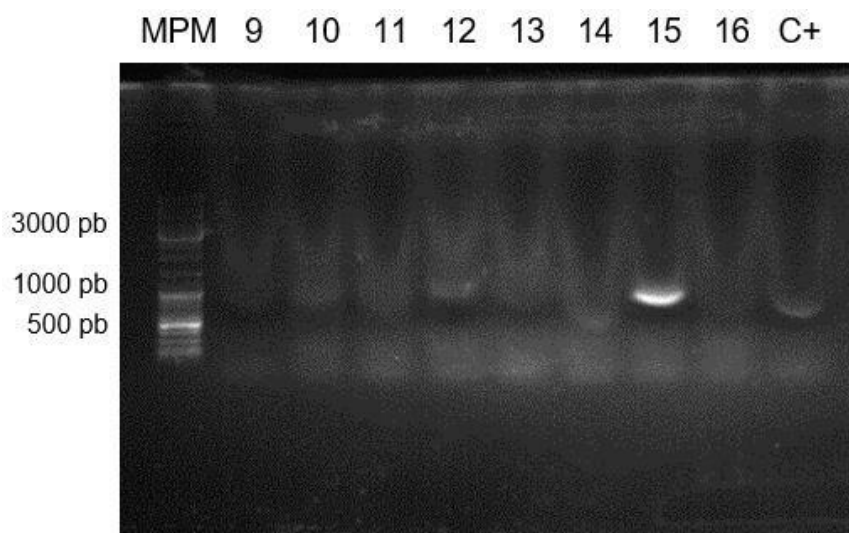


Figura 4: Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % de la *colony* PCR con primers específicos para amplificar la secuencia codificante de TNF- α . **[MPM]** Marcador de peso molecular. **[9-16]** Clones 9-16. **[C+]** Control positivo (amplicón).

Entre las 16 colonias analizadas, el clon 15 mostró una amplificación de la secuencia codificante que fue posible visualizar en el gel de agarosa (Figura 3 y 4). Este resultado era previsible teniendo en cuenta el elevado número de colonias observadas en la placa de control de religación. Por lo tanto, es probable que las colonias que no mostraron amplificación correspondan a transformaciones con el plásmido religado. Además, se optó por examinar 4 clones adicionales (clones 3, 4, 12, 14) que mostraron una banda tenue en el gel.

A partir de las estrías de las colonias positivas se realizaron cultivos líquidos de medio LB con ampicilina y se extrajo el ADN plasmídico mediante miniprep.

4.3 Ensayo de restricción

Se realizaron tres ensayos de restricción de las construcciones pcDNA3.1+TNF- α con las enzimas NcoI, NmeAIII y SpeI para confirmar la identidad del inserto en los clones positivos (clon 3, 4, 12, 14, 15). Se comparó el patrón de bandas obtenido en un gel de agarosa por dicho ensayo con el patrón teórico esperado para la construcción que representa el resultado esperado en caso de que el CDS de TNF- α se haya insertado correctamente en el plásmido luego de la ligación.

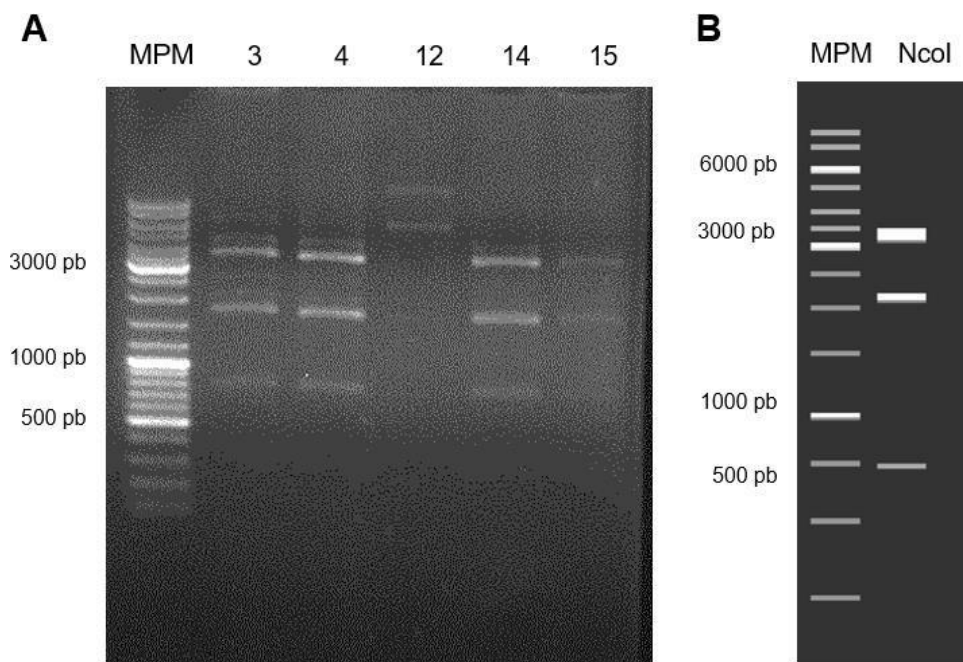


Figura 5: Ensayo de restricción sobre el plásmido pcDNA3.1+TNF- α de las colonias 3, 4, 12, 14 y 15 con enzima NcoI. **(A)** Resultado obtenido de la digestión del plásmido pcDNA3.1+TNF- α con la enzima NcoI **[MPM]** Marcador de peso molecular. **[3, 4, 12, 14, 15]** Plásmido extraído de la colonia correspondiente digerido con enzima NcoI. **(B)** Resultado teórico esperado de la digestión del plásmido pcDNA3.1+TNF- α con las enzimas NcoI. **[MPM]** Marcador de peso molecular. **[NcoI]** Patrón de bandas obtenido de digerir el plásmido con la enzima NcoI.

Se observa el plásmido digerido con la enzima NcoI para los clones 3, 4, 12, 14 y 15. Se comparó el patrón de bandas obtenido en un gel de agarosa por dicho ensayo con el patrón teórico esperado para la construcción que representa el resultado esperado en caso de que el CDS de TNF- α se haya insertado correctamente en el plásmido luego de la ligación.

Se seleccionó la enzima NcoI por su capacidad de cortar el plásmido generando 3 fragmentos de 3342 pb, 2138 pb y 735 pb. De esta manera se obtendrá un patrón de bandas particular específico para el vector. Como muestra en el análisis mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, de la comparación de las imágenes A y B de la figura 5 se destaca una gran

similitud entre el patrón de bandas obtenido (Figura 5A) y el patrón de bandas esperado (Figura 5B) para esta construcción en el clon 3, 4, 14 y 15. Con este resultado se seleccionaron el clon 3 y 4 para realizar dos ensayos de restricción más.

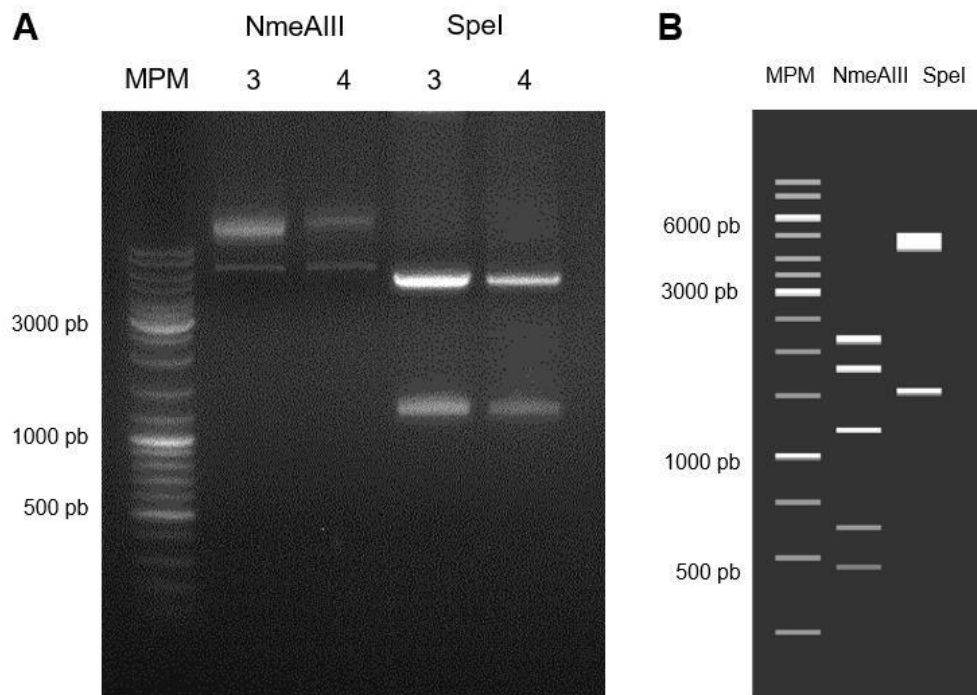


Figura 6: Ensayo de restricción sobre el plásmido pcDNA3.1+TNF- α de las colonias 3 y 4 las enzimas NmeAIII y luego SpeI. **(A)** Resultado obtenido de la digestión del plásmido pcDNA3.1+TNF- α con las enzimas NmeAIII y SpeI. **[MPM]** Marcador de peso molecular. **[3, 4]** Plásmido extraído de la colonia correspondiente digerido con enzima NmeAIII. **[3, 4]** Plásmido extraído de la colonia correspondiente digerido con enzima SpeI. **(B)** Resultado teórico esperado de la digestión del plásmido pcDNA3.1+TNF- α con las enzimas NmeAIII y SpeI. **[MPM]** Marcador de peso molecular. **[NmeAIII]** Patrón de bandas obtenido de digerir el plásmido con la enzima NmeAIII. **[SpeI]** Patrón de bandas obtenido de digerir el plásmido con la enzima SpeI.

Luego se utilizaron las enzimas NmeAIII y SpeI, en el caso de la enzima NmeAIII el patrón de bandas obtenido (Figura 6A) no coincide con el patrón de bandas esperado (Figura 6B) pero en el caso de la enzima SpeI el número de bandas obtenido (Figura 6A) coincidió con el esperado para esta construcción (Figura 6B), pero se visualizaba la banda más pequeña de menor peso molecular al patrón esperado dando a entender que el inserto de interés no se encuentra en el plásmido.

Finalmente, se envió a secuenciar el clon 3 del plásmido pcDNA3.1+TNF- α a la empresa MacroGen para confirmar la secuencia nucleotídica del CDS insertado. Se diseñaron *primers* que tenían como secuencia diana regiones del CDS de TNF- α (Anexo 1).

No fue posible obtener una secuencia legible con ninguno de los *primers* utilizados. Una posible razón por la cual la secuenciación no pudo realizarse podría estar vinculada a la falta de hibridación adecuada de los *primers* utilizados en el plásmido. Se ha considerado que esto

podría ser resultado de discrepancias entre las secuencias de TNF- α de las células HeLa y aquellas disponibles en las bases de datos. Otra posibilidad es que directamente no se encuentra la secuencia codificante de TNF- α dentro del plásmido pcDNA3.1.

Se procedió a examinar detenidamente los resultados obtenidos antes de realizar la transfección para detectar posibles fallos que pudieran haber pasado desapercibidos. Con relación a la ligación, la presencia de un gran número de colonias en la placa de control de religación podría atribuirse a lo mencionado anteriormente. Este fenómeno se atribuyó principalmente a la digestión parcial del plásmido utilizado, el cual se religó durante el proceso de ligación, generando una considerable cantidad de plásmidos circulares incluso en ausencia de insertos, los cuales aún eran susceptibles de ser incorporados por las células DH5 α .

Por otro lado, la interpretación de los resultados positivos en los PCRs de las colonias 3, 4, 12, 14 y 15 presenta un desafío. En el control sin ADN (NTC) se observa una leve amplificación que sugiere una contaminación durante la realización del mix de PCR. Por esta razón podría haber presencia de falsos positivos.

4.4 Obtención del plásmido pGEM®-T+TNF- α .

Debido al resultado anterior se procedió a realizar nuevamente el clonado de la secuencia codificante, pero con otro plásmido, se utilizó en este caso un plásmido pGEM®-T (Promega, #A1360). Los sistemas pGEM®-T Easy Vector son sistemas convenientes para la clonación de productos de PCR generados por polimerasas termoestables específicas. Estas enzimas a menudo incorporan una única desoxiadenosina, independientemente de la secuencia del molde, en los extremos 3' de los fragmentos amplificados. El vector pGEM®-T Easy, prelinealizado y listo para su uso, presenta salientes 3'-T en el sitio de inserción, lo que facilita la compatibilidad con los productos de PCR que se desea clonar (39).

Se optó por clonar la secuencia codificante utilizando este vector, debido a las posibles discrepancias entre las secuencias de TNF- α de las células HeLa y las registradas en las bases de datos. Esta elección facilitará la secuenciación del CDS, simplificando así los procedimientos subsiguientes.

Luego se llevó a cabo la transformación de *E. coli* DH5 α con el producto resultante de la ligación, y se procedió a sembrar en placas de LAB suplementado con ampicilina tal como se detalla en la metodología. En esta placa, se observó el crecimiento de una única colonia. Se detectó crecimiento de colonias blancas y azules donde las bacterias fueron electroporadas con el control. No se observaron colonias en el control negativo donde las bacterias electroporadas carecían de plásmido, sembrados en medio LB con ampicilina. Sin embargo, el control de viabilidad de las bacterias electroporadas sin plásmido, sembradas en LAB sin antibiótico, mostró el crecimiento esperado.

Se procedió con una reestría en medio LAB suplementado con ampicilina a partir de la colonia

obtenida, seguida de un precultivo de 5 mL con medio LB con ampicilina. A partir de este último, se criopreservó la cepa obtenida y se llevó a cabo una miniprep del plásmido. Se realizó una digestión con la enzima NotI para confirmar la identidad del plásmido presente en la colonia obtenida, utilizando el plásmido purificado y siguiendo el procedimiento detallado en la metodología.



Figura 7: Ensayo de restricción con enzima NotI sobre el plásmido + TNF- α . **[MPM]** Marcador de peso molecular. **[NotI]** Plásmido + TNF- α digerido. **[S/D]** Plásmido + TNF- α sin digerir.

En la Figura 7, en el carril correspondiente al plásmido digerido, se observa un patrón de bandas compuesto por una banda única de aproximadamente 3000 pb. Este resultado no coincide con el patrón esperado para pGEM-T+TNF- α . El plásmido pGEM-T+TNF- α posee dos sitios de corte de NotI que se encuentran a ambos lados de la secuencia de TNF- α . En caso haber obtenido una colonia exitosamente transformada con el plásmido pGEM-T+TNF- α se espera la liberación del fragmento de TNF- α , generando un patrón de bandas de 3056 pb y 871 pb. La enzima digirió el plásmido, ya que el mismo se encuentra linealizado, pero no se observa una banda de 800 pb correspondiente a la secuencia codificante de TNF- α por lo que podemos concluir que no hay inserto.

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

Tras los intentos fallidos de ligar la secuencia codificante de TNF- α con dos estrategias y plásmidos se tomó la decisión de adquirir el plásmido pcDNA3.1(+)+TNF- α (genscript #NM_000594.4), ya ligado con el inserto de interés (TNF- α)(#NP_000585.2) para poder seguir adelante con el proyecto. (Anexo 2). Este plásmido posee promotor de CMV (CMV promoter) y CMV enhancer para la expresión constitutiva en células de mamífero, MCS (del inglés:

“Multiple Cloning Site”), y confiere resistencia a Neomicina en eucariotas y resistencia a ampicilina en bacterias.

Tras recibir el plásmido liofilizado, se llevó a cabo la transformación de *E. coli* DH5 α seguido de la siembra en placas de LAB suplementado con ampicilina tal como se describe en la metodología. En esta placa, se observó el crecimiento de colonias, lo cual no sucedió en el control negativo, donde las bacterias fueron electroporadas sin plásmido y sembradas en medio LAB con ampicilina. Por otro lado, el control de viabilidad, consistente en bacterias electroporadas sin plásmido y cultivadas en LAB sin antibiótico creció acorde a lo esperado.

Se procedió con una reestría en medio LAB suplementado con ampicilina a partir de la colonia obtenida, seguida de un precultivo en medio LB con ampicilina. A partir de este último, se criopreservó la cepa obtenida y se realizó una miniprep del plásmido.

Luego, se llevó a cabo una digestión con la enzima BbsI y otra con las enzimas NdeI y PstI para confirmar la identidad del vector transformado. El plásmido pcDNA3.1(+)+TNF- α posee tres sitios de corte de BbsI que dos de estos se encuentran en la secuencia de TNF- α . En caso haber obtenido una colonia exitosamente transformada con el plásmido pcDNA3.1(+)+TNF- α se espera que se genere un patrón de bandas de 5218 pb, 524 pb y 350 pb. De esta manera se obtendrá un patrón de bandas particular específico para el vector. Por otro lado, la digestión con las enzimas NheI y PstI posee cada una un sitio de corte, generando un patrón teórico de bandas de 3598 pb y 2494 pb si obtuvimos una colonia correctamente transformada.

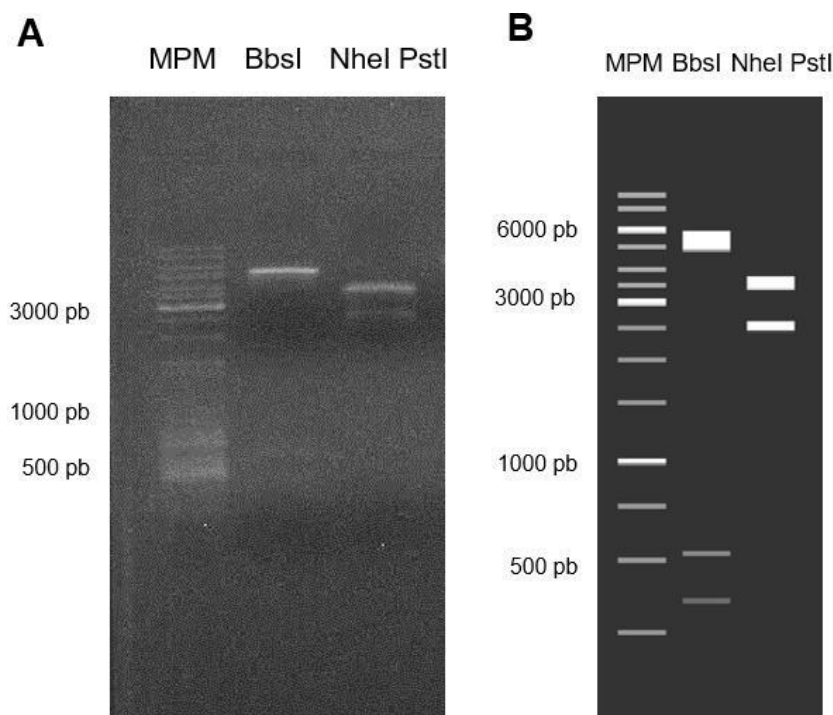


Figura 8: Ensayos de restricción con enzima BbsI y luego NheI y PstI sobre el plásmido pcDNA(+)+TNF- α . **(A)** Resultado obtenido de la digestión del plásmido pcDNA(+)+TNF- α con las enzimas BbsI y NheI

y PstI. **[MPM]** Marcador de peso molecular. **[BbsI]** Plásmido digerido con enzima BbsI. **[NheI PstI]** Plásmido digerido con enzima NheI y PstI. **(B)** Resultado teórico esperado de la digestión del plásmido pcDNA(+)+TNF- α con las enzimas BbsI y NheI y PstI **[MPM]** Marcador de peso molecular. **[BbsI]** Patrón de bandas obtenido de digerir el plásmido con la enzima BbsI. **[NheI PstI]** Patrón de bandas obtenido de digerir el plásmido con la enzima NheI y PstI.

En la Figura 8, en el carril correspondiente al plásmido digerido con la enzima BbsI, se observa un patrón de bandas compuesto por banda ubicada a la altura de 5218 pb, y dos bandas tenues ubicada entre los 600 y 300 pb. Este resultado coincide con el patrón esperado para pcDNA3.1(+)+TNF- α . Además, como se muestra en la figura 8, en el carril correspondiente a la digestión del plásmido digerido con la enzima NheI y PstI muestra el patrón de bandas esperado para este vector. En conclusión, podemos confirmar que las colonias se transformaron exitosamente el plásmido pcDNA3.1(+)+TNF- α .

4.6 Cultivo celular

4.6.1 Detección de micoplasma

Es de suma importancia garantizar la ausencia de contaminación en la línea celular empleada, dado que la contaminación es uno de los principales problemas en el cultivo celular y puede comprometer los resultados de los ensayos realizados (35). Una infección de este tipo podría alterar la expresión génica y el comportamiento celular, invalidando por completo los resultados de los ensayos (40). Por tanto, en esta investigación resultó crucial descartar cualquier posibilidad de contaminación para asegurar la calidad del material de partida ya que se establecerán nuevas líneas celulares.

Dada la variedad de especies de *Mycoplasma*, la detección mediante métodos convencionales resulta desafiante, por lo que es necesario recurrir a la biología molecular, especialmente a la PCR, utilizando una combinación de oligonucleótidos específicos para detectar la mayoría de las variedades presentes en los cultivos celulares (35).

Se extrajo una muestra de medio de cultivo de células HEK-293 sin antibiótico y se llevó a cabo la amplificación mediante PCR, seguido de un análisis en gel de agarosa según lo detallado en el punto 3.2.2. (Figura 9).

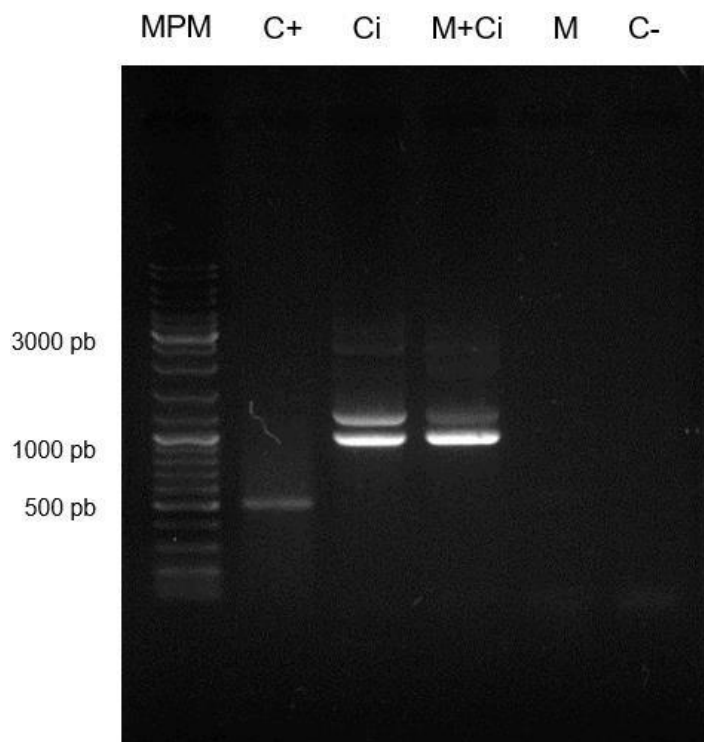


Figura 9: Evaluación de contaminación por micoplasma en las células HEK-293 mediante electroforesis en gel de agarosa 1,3% de los productos de PCR. **[MPM]** Marcador de peso molecular. **[C+]** Control positivo. **[Ci]** Control interno. **[M+Ci]** Muestra + control interno. **[M]** Muestra. **[C-]** Control negativo.

La presencia de micoplasma en la muestra se manifestará mediante la amplificación de un amplicón de 510 pb. Para el control positivo se utilizó una mezcla de 4 muestras que dieron positivo para micoplasma. Como se visualiza en la Figura 9, en el carril destinado al control positivo, se observa una banda de intensidad notable a la altura aproximada a los 500 pb, lo que sugiere la presencia de micoplasma. En los demás carriles no se detecta una banda de tamaño similar.

Para evitar falsos negativos, se implementó un control interno de amplificación. Este control debe ser detectado independientemente de la presencia del patógeno y se utiliza con el objetivo de controlar que la muestra no esté inhibiendo la reacción de amplificación, ya sea por la presencia de sales u otros componentes residuales de los pasos de lavado (41). En este control, se emplea como molde de ADN un plásmido con un inserto que produce un fragmento de 986 pb al amplificarse. Como se muestra en la Figura 9, en el carril correspondiente al control interno, se observa una banda en la posición esperada en términos de tamaño. Además, esta banda también está presente en el carril 3. La detección del control interno en este último carril confirma la ausencia de inhibición de la reacción por los componentes de la muestra, lo que permite corroborar la falta de contaminación por micoplasma en las células analizadas. De acuerdo con este resultado se procedió a trabajar con esta línea celular de células HEK-293 libre de contaminación de micoplasma.

4.7 Obtención de la línea HEK_TNF- α estable

Para generar la línea celular HEK-293 recombinante, se llevó a cabo la transfección de células HEK-293 con el plásmido pcDNA3.1(+)+TNF- α . Después de la transfección, las células fueron sometidas a un período de dos semanas de exposición al antibiótico G418 con concentración final de 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (37). Este paso tuvo como objetivo obtener células transfectadas de manera estable. Una vez completada la selección, se procedió con los ensayos correspondientes.

4.8 Caracterización de crecimiento celular

Para llevar a cabo la caracterización de esta línea celular, se procedió a cultivar células HEK_TNF- α policlonales en dos placas de 24 pozos con una cantidad uniforme de células por pozo. Las placas fueron sembradas con una separación de dos días para permitir un recuento total durante un período de 16 días consecutivos. Se realizó un recuento celular duplicado diariamente a lo largo de estos 16 días, registrando tanto el número total de células en cada pozo como la viabilidad celular en función del tiempo. Se realizó el mismo procedimiento, pero con células HEK-293 para poder comparar (Figura 10).

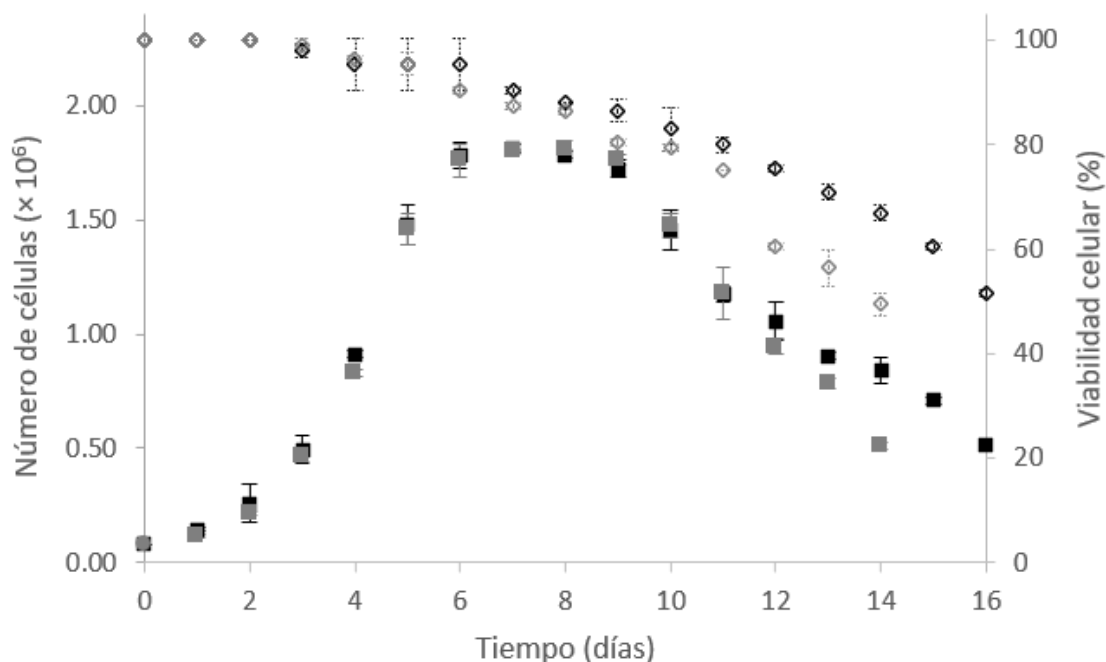


Figura 10: Curva de crecimiento de la línea celular HEK-293 y la línea celular HEK-293_TNF- α . El número de células vivas por pozo se observa en cuadrados grises para la línea HEK-293 y en cuadrados negros para la línea HEK-293_TNF- α . La viabilidad se observa en rombos grises para la línea HEK-293 y en rombos negros para la línea HEK-293_TNF- α .

Como muestra la figura 10, no se detectaron diferencias grandes en el patrón de crecimiento de la línea celular policlonal HEK-293_TNF- α y la línea celular HEK-293. En ambas líneas, el

cultivo experimentó una fase inicial de adaptación, conocida como fase lag, que duró aproximadamente un día, durante la cual el número total de células permaneció relativamente constante. A partir del segundo día, comenzó la fase de crecimiento exponencial. En la investigación llevada a cabo por Valle, donde se utilizaron las mismas condiciones en el mismo laboratorio, se logró obtener un tiempo de duplicación de 19 horas en la línea HEK-293 (37). Para ambas líneas, el tiempo de duplicación desde el inicio de la fase de crecimiento exponencial hasta que se alcanzó la fase estacionaria fue de 22 horas. Esto sugiere que la línea celular recombinante muestra una tasa de crecimiento más lenta en comparación con lo reportado en la literatura (37). La fase de crecimiento exponencial continuó hasta el sexto día, donde se alcanzó el máximo número de células, $1,8 \times 10^6$ células/mL, hasta que comenzó la fase estacionaria. Dado que la viabilidad celular se mantuvo constante, es probable que la densidad celular alcanzará su límite debido a la falta de espacio en el pozo, lo que resulta en un fenómeno conocido como inhibición por contacto (42, 43). Luego se detectó que la fase estacionaria concluyó en el noveno día aproximadamente, dando paso a la fase de muerte celular, caracterizada por una tasa de muerte celular significativamente mayor que la tasa de división celular. Esta fase de muerte celular fue la más prolongada pero la viabilidad celular no alcanzó el 0%, no se pudo observar el total de células muertas. En la línea celular HEK-293 disminuye más rápido la viabilidad celular. Dicho todo esto, se concluyó que esta modificación que se realizó no afectó el crecimiento de la línea celular.

4.9 Obtención de línea monoclonal HEK_TNF- α estable

Se empleó la técnica de dilución límite para obtener clones de la línea HEK_TNF- α . Esta línea policlonal se mantuvo en presión selectiva por 3 semanas teniendo las células tranfectadas en medio con G418, se realizaron las diluciones pertinentes y se ajustó la concentración celular de manera de sembrar tres placas de 96 pocillos. Se obtuvieron 4 clones, los cuales fueron posteriormente amplificados gradualmente y criopreservados para su conservación. Entre que se identificó la primera célula y se llegó a hacer la criopreservación duración del proceso fue 3 semanas. A continuación, en la figura 13 se visualiza una captura de una única célula en un pocillo.

De acuerdo con la información obtenida de fuentes bibliográficas, el número de clones generados en este estudio fue menor en comparación con investigaciones previas que aplicaron la misma técnica de dilución límite. Esta técnica consiste en distribuir las células en una concentración adecuada para lograr la colocación de una única célula por pozo en una placa de 96 pozos. Por citar un ejemplo, en la investigación llevada a cabo por Valle, donde se utilizaron tres placas equivalentes a un total de 180 pozos, se logró obtener más del doble de clones en comparación con los resultados de este estudio (37). Esta diferencia podría explicarse por una mayor dilución de las muestras de lo inicialmente previsto, lo que resultó en pozos sin células.

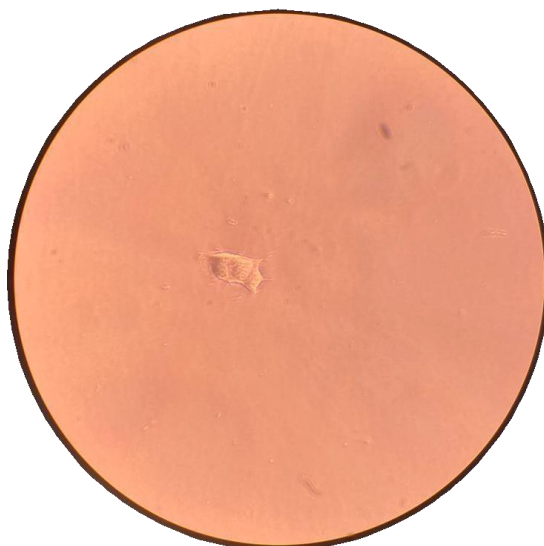


Figura 11: Visualización de las primeras células del clon 1 transformada HEK_TNF- α en microscopio invertido a 40X.

4.10 Confirmación de la correcta transfección

Para confirmar que las líneas celulares obtenidas mantuvieran al menos parte del casete de expresión de TNF- α se realizó un análisis por PCR del ADN genómico. Para esos se obtuvo un *pellet* celular de las líneas a analizar y se extrajo ADN genómico de las mismas. Se procedió a realizar una PCR con *primers* diseñados para amplificar la secuencia codificante de TNF- α . Como control positivo se empleó ADN de células HEK-293 no transfectadas, mezclado con el plásmido pcDNA3.1(+)+TNF- α en cantidades equimolares. Adicionalmente, se efectuó una PCR utilizando únicamente el plásmido. Para el control negativo, se utilizó ADN genómico de células HEK-293 sin transfectar, y se llevó a cabo un control sin molde, en el cual el ADN fue sustituido por agua.

El análisis de los productos amplificados de PCR se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa 1% (Figura 12). Como se visualiza en la figura 12, en los carriles correspondientes a la línea policlonal y las líneas monoclonales se muestra una banda a 700 pb aproximadamente. Esta banda se corresponde a la amplificación de la secuencia codificante de TNF- α , ya que el tamaño del amplicón esperado tiene un peso molecular de 702 pb. En el carril correspondiente al clon 1 se visualiza una banda de mayor peso molecular podría ser que se allá insertado la secuencia de ADN específica en tándem en una parte del genoma, esto resulta en múltiples copias de la misma secuencia de ADN alineadas en la misma dirección y una al lado de la otra. Este fenómeno puede ser que se allá introducido como un rearrreglo del plásmido, el plásmido es introducido en una célula y puede sufrir cambios estructurales como parte de los procesos de recombinación y reparación del ADN en la célula huésped. Estos cambios pueden incluir duplicaciones, deleciones o inversiones de secuencias de ADN, lo que podría llevar a la amplificación en tándem de una región específica del plásmido. O simplemente podría ser una amplificación inespecífica.

Estos resultados permiten confirmar que tanto la línea policlonal, como las cuatro líneas monoclonales obtenidas, contienen la secuencia codificante para TNF- α .

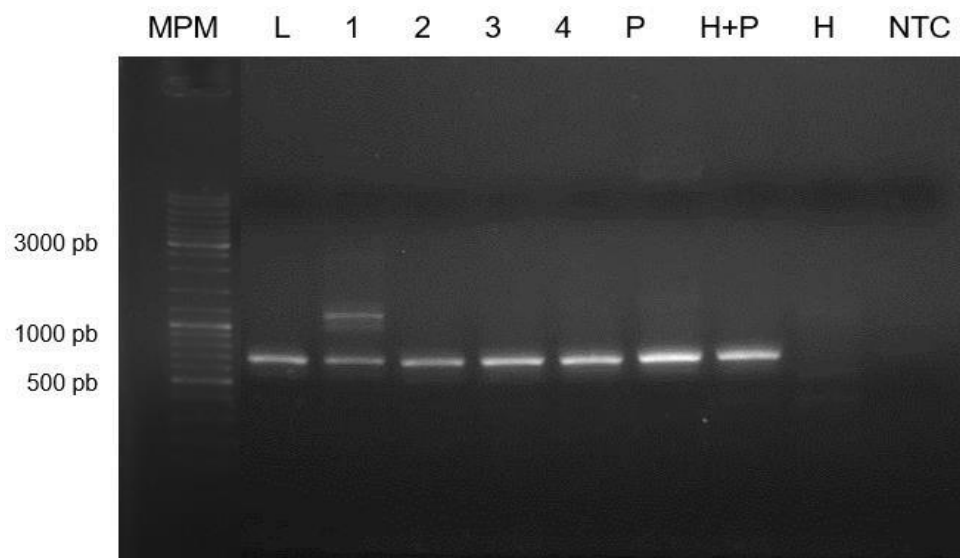


Figura 12: Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % de productos de PCR. **[MPM]** Marcador de peso molecular. **[L]** HEK_TNF- α (policlonal). **[1]** Clon 1. **[2]** Clon 2. **[3]** Clon 3. **[4]** Clon 4. **[P]** Plásmido. **[H+P]** HEK-293+plásmido. **[H]** HEK-293. **[NTC]** Control negativo de PCR.

4.11 Obtención de ARNm de las líneas transfectadas

Una vez confirmada la presencia del casete de expresión, el siguiente paso es examinar si el mismo se expresa en las líneas obtenidas. Para eso se realizó un análisis de expresión génica usando PCR en tiempo real para analizar los cuatro clones generados.

En primer lugar, se realizó la extracción de ARN a partir de los cultivos monoclonales obtenidos y las células HEK-293 según lo indicado en la metodología. Se espera que el cultivo llegara a un 80-90% de confluencia, se levantaron las células, se realizó un recuento y se separaron $2,5 \times 10^6$ células para extracción. Se realizó la extracción de ARN con el kit utilizado ya que por datos bibliográficos presenta una mejor calidad que el extraído con el método de TRIzol (44, 46). Se cuantificó el ARN total extraído obteniéndose 20 μg a una concentración de 400 ng/ μL aproximadamente de todos los clones y 28 μg a una concentración de 570 ng/ μL aproximadamente de las células HEK-293. A continuación, se procedió a evaluar las extracciones en un gel de agarosa 1% para verificar la integridad del ARN obtenido (Figura 13).

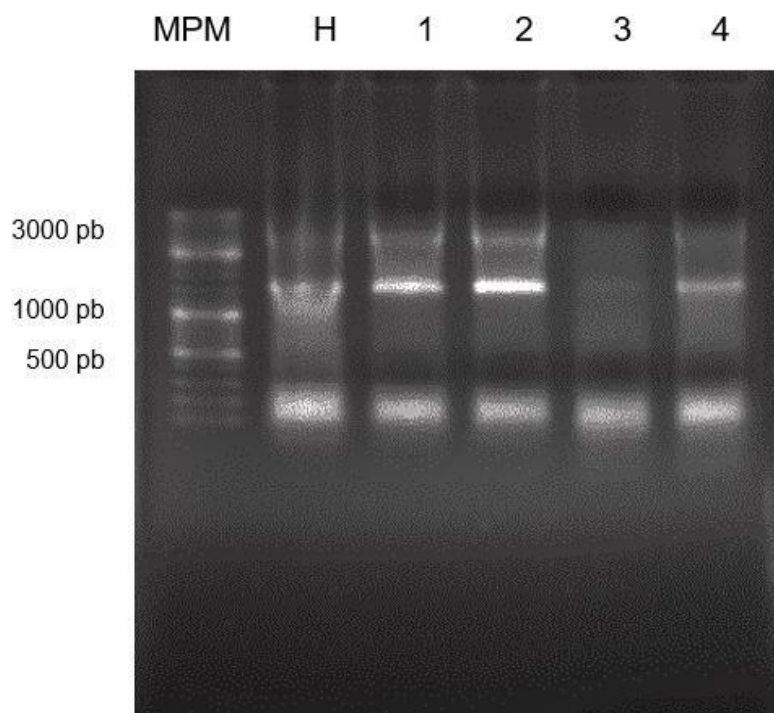


Figura 13: Evaluación de la integridad del ARN resultante de la extracción de células HEK_TNF- α . Gel de agarosa-TAE 1%. **[MPM]** Marcador de peso molecular. **[H]** HEK-293. **[1]** Clon 1. **[2]** Clon 2. **[3]** Clon 3. **[4]** Clon 4.

Para poder analizar la integridad del ARN extraído de las células se corrieron 200 ng de ARN total. Como muestra la figura 13, se pudieron observar 3 bandas de aproximadamente 100, 1500 y más de 4000 pb. Normalmente al separar el ARN total en un gel de agarosa se deberían poder observar tres bandas de diferente peso molecular correspondientes al 28S, 18S y 5S. Las bandas obtenidas corresponden al patrón esperado, en donde la de peso molecular superior ubicada en 4000 pb corresponde a la subunidad mayor 28s y la banda de peso molecular intermedio corresponde al ARN ribosomal 18S. La banda de menor peso molecular corresponde a la subunidad ribosomal 5S o podría corresponder a ARN degradado.

El kit de extracción de ARN utilizado incluye un paso de tratamiento con DNAsa I. Este paso es muy importante para la qPCR, dado que la presencia de ADN genómico en la muestra de ARN puede llevar a la amplificación de secuencias de ADN no deseadas, lo que resulta en datos erróneos o en la sobreestimación de la cantidad de ARNm. Por este motivo, tras evaluar la calidad e integridad del ARN, se procedió a descartar la presencia de ADN genómico mediante PCR para el gen humano 18S en las muestras. La interpretación de los resultados se llevó a cabo mediante la electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Como se observa en la figura 14, en los clones 1 y 2 no se detectó amplificación del gen 18S, indicando que el tratamiento con DNAsa I fue exitoso en estos casos. Sin embargo, en el carril que corresponde los clones 3 y 4 se observó amplificación indicando contaminación con ADN genómico. Estas muestras fueron sometidas nuevamente a un tratamiento con DNAsa I y se repitió el PCR para el gen 18S (Figura 15). Se visualiza en la figura 15 que no se observó

ampliación en esta segunda prueba, confirmando el éxito del tratamiento de DNAsa I para las dos muestras.

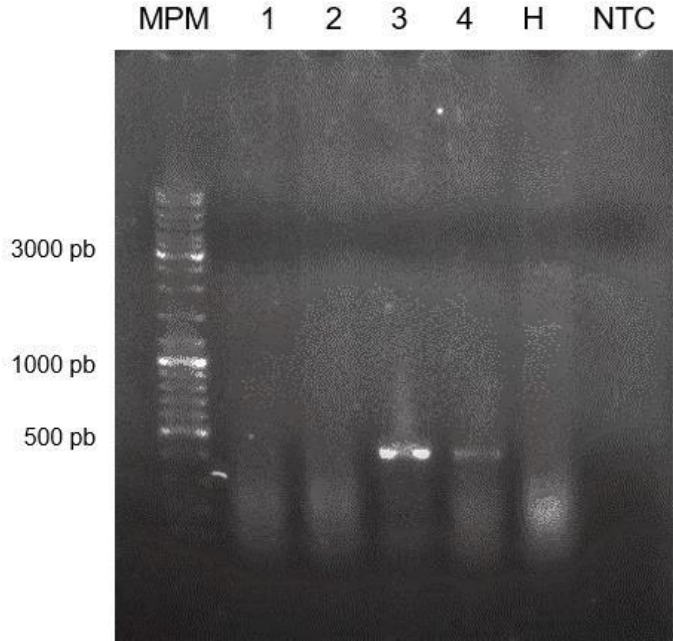


Figura 14: Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % para la detección de ADN genómico mediante PCR. **[MPM]** Marcador de peso molecular. **[1]** Clon 1. **[2]** Clon 2. **[3]** Clon 3. **[4]** Clon 4. **[H]** HEK-293. **[NTC]** Control negativo de PCR.

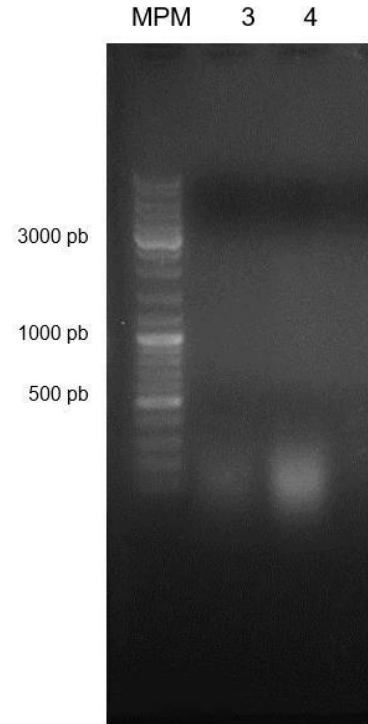


Figura 15: Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % para la detección de ADN genómico mediante PCR. **[MPM]** Marcador de peso molecular. **[3]** Clon 3. **[4]** Clon 4.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se decidió proseguir con la retrotranscripción del ARN. Se llevó a cabo la retrotranscripción del ARN a ADNc utilizando oligos dT para asegurar que el material de partida fuese el ARNm.

4.12 Curva de eficiencia de *primers*

Antes de proceder con el análisis de la expresión génica, se llevó a cabo una curva de eficiencia de los *primers* para garantizar que estos presentaran una eficiencia óptima en la medición de la expresión de los genes de interés. Esto se debe a que se ha observado que, cuando los *primers* exhiben una eficiencia de amplificación subóptima, representan de manera errónea el cambio en la expresión de los genes (47, 48). Además, esta curva de eficiencia ayudó a determinar la concentración adecuada de ADNc molde a utilizar en los experimentos subsiguientes. Para realizar este proceso, se prepararon diluciones de las muestras de ADNc obtenido por la extracción de ARN de células sin transformar y los 4 clones, las cuales fueron posteriormente amplificadas mediante PCR en tiempo real en base a lo mencionado en la metodología.

Al realizar las curvas de eficiencia se procedió a determinar la eficiencia de los *primers* empleados. Para ello, se realizó un promedio a partir de los valores de Ct obtenidos para las réplicas técnicas. Posteriormente, a la cantidad asignada de muestra para cada dilución se le realizó el logaritmo de dicha cantidad. Se representaron gráficamente estos valores de Ct en relación con el logaritmo de la cantidad de muestra asignada para cada dilución. A partir de esta representación, se determinó la pendiente de la regresión lineal, utilizando dicha pendiente para calcular la eficiencia según la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia (\%)} = (10^{-1/\text{pendiente}} - 1) \times 100$$

Tabla 30: Eficiencia de amplificación de los *primers* determinada a partir de diluciones de ADNc

Gen	Muestra	Cantidad de muestra	Log (Cantidad de muestra)	Promedio Ct	
TNF- α	1/10	6250	3,79588002	27,43	Eficiencia (%)
	1/50	1250	3,09691001	29,93	110
	1/250	250	2,39794001	32,04	Pendiente
	1/1250	50	1,69897	33,92	-2.5995

Los datos empleados para calcular la eficiencia de cada juego de *primers* se encuentran registrados en la Tabla 25. De acuerdo con los resultados obtenidos se observa que los *primers* para TNF- α presentaron una eficiencia de 110%, se vio que la eficiencia alcanzada se encuentra dentro del rango aceptable, siendo este de entre 80-110% (48, 49, 50). Dado esto, se decidió proseguir con el ensayo. Además, se examinó la curva de *melting* y no se observaron picos secundarios. (Anexo 4)

Los *primers* que vamos a utilizar para los genes *housekeeping* Beta-actina y GADPH ya fueron testeados en el laboratorio en condiciones experimentales similares por lo que su eficiencia no fue ensayada (46, 52, 53). Los *primers* elegidos muestran eficiencias dentro del rango aceptable. Por otra parte, se observó que la eficiencia obtenida con el par de *primers* de GADPH excede el rango aceptable. Por lo general, eficiencias superiores al 110% podrían atribuirse a la formación de dímeros de *primers* (50). Sin embargo, al examinar detenidamente la curva de *melting*, no se observaron picos secundarios que sugirieron la presencia de dicha conformación. La curva de *melting* es un recurso valioso que permite respaldar los datos obtenidos de la curva de eficiencia. La detección de picos a temperaturas inferiores a 78°C podría indicar la presencia de dímeros de *primers* o, alternativamente, la presencia de productos de amplificación no específicos de menor tamaño (50).

4.13 Análisis de expresión de genes

Se llevó a cabo el análisis de la expresión del gen TNF- α en los diferentes clones obtenidos. Se realizó el análisis empleando las muestras de ADNc diluidas a una proporción de 1/10 para cada uno de los genes de interés. Se decidió trabajar con la dilución 1/10 ya que contamos con valores altos de Ct en la curva de eficiencia de *primers*. Para llevar a cabo el ensayo de expresión génica mediante qPCR, se siguió el procedimiento detallado en la sección 3.18.3 del protocolo.

Una vez obtenidos los resultados (Anexo 5), se aplicó el método de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ para normalizar la expresión del gen de interés respecto a los genes de referencia (49). En este método, $\Delta\Delta Ct$ se define como la diferencia entre ΔCt de la muestra y ΔCt del control, donde ΔCt representa la diferencia en los valores de Ct entre el gen de interés (TNF- α) y el promedio de los genes constitutivos (β -actina y GADPH).

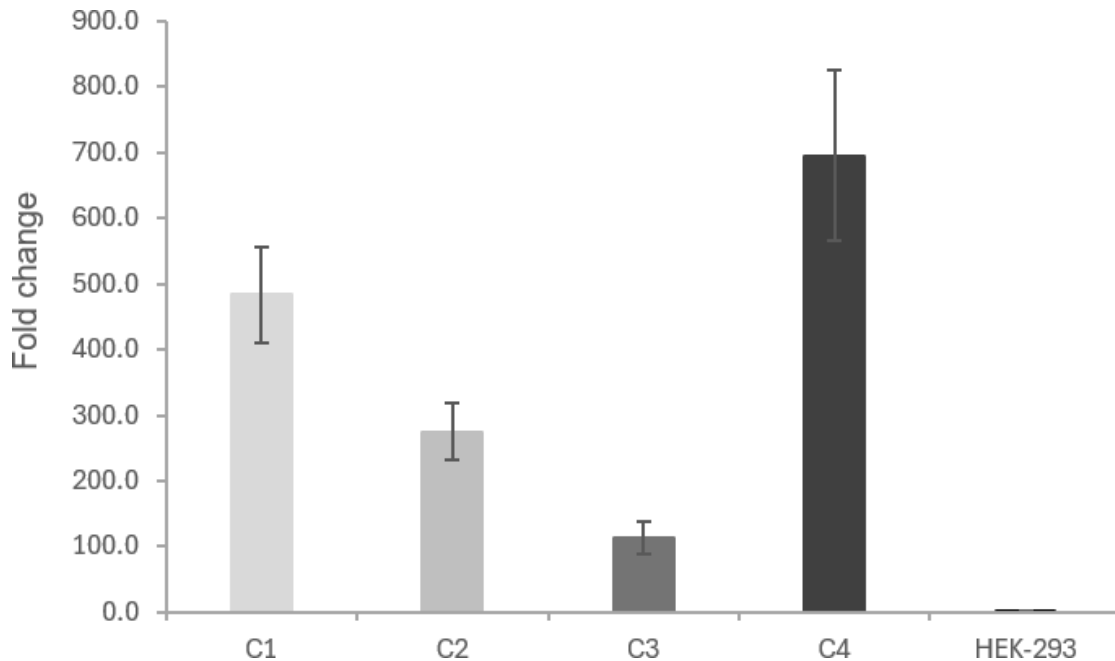


Figura 16. Análisis de la variación de la expresión del gen TNF- α en los diferentes clones. Las columnas corresponden a el resultado obtenido mediante el método de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ para cada clon: clon 1 (C1), clon 2 (C2), clon 3 (C3), clon 4 (C4) y las células HEK-293.

Tras un análisis de los resultados obtenidos, resulta evidente que los cuatro clones muestran una expresión significativamente mayor de TNF- α en comparación con las células HEK-293 no transfectadas (Figura 16). La evaluación revela que el clon con mayor expresión fue el clon 4 con una expresión casi 700 veces mayor (695) al de las células sin transfectar. Los clones 1, 2, y 3 también presentaron niveles significativamente mayores de expresión de TNF- α de 483, 274, y 112, respectivamente.

La disparidad en la expresión génica podría atribuirse a la inserción de una secuencia de ADN específica en tándem en una región particular del genoma, lo que conlleva a la replicación de múltiples copias de dicha secuencia de ADN, alineadas en una disposición contigua y en la misma orientación. Este fenómeno podría haber sido ocasionado por un rearrreglo del plásmido. En virtud de este proceso, es factible alcanzar una mayor expresión de TNF- α . No obstante, otra posibilidad reside en que las copias del plásmido hayan sido insertadas en distintos loci genómicos, lo cual también podría contribuir a la disparidad observada en la expresión génica.

La regulación post-traducciona de TNF- α es un proceso complejo que involucra múltiples etapas después de la síntesis del ARNm. Aunque se puede detectar una gran cantidad de ARNm de TNF- α en las células, es importante confirmar que este ARNm realmente se está traduciendo en la síntesis de la proteína TNF- α . La presencia de ARNm no siempre garantiza la producción de proteínas funcionales. Luego se debería probar que el ARNm de TNF- α se está traduciendo en la proteína correspondiente

Este hallazgo nos permite concluir que hemos producido con éxito cuatro clones que expresan la construcción de interés y presentan un potencial prometedor para futuras investigaciones.

4.14 Análisis mediante western blot de TNF- α en células transformadas

Posteriormente se decidió evaluar la expresión de TNF- α a nivel proteico en los clones obtenidos. Para identificar un control positivo, se llevó a cabo una revisión bibliográfica buscando líneas celulares que presentan expresión de la proteína TNF- α . Se optó por utilizar células HeLa para este propósito, basándonos en la documentación científica que confirmaba su capacidad de expresar esta proteína cuando se exponen a una concentración final de 100 ng/mL de LPS durante un período de 20 horas (38). Además, resultaba ventajoso contar con esta línea celular disponible en nuestro laboratorio.

Para la detección de TNF- α , se analizó el sobrenadante de las células transfectadas, células HEK-293 sin transfectar y células HeLa y el lisado de las mismas mediante el inmunoensayo western blot. La línea policlonal transfectadas fue crecida en presencia y en ausencia del antibiótico de selección (G418) para evaluar si el crecimiento en estas condiciones interfiere de alguna forma en la expresión de TNF- α .

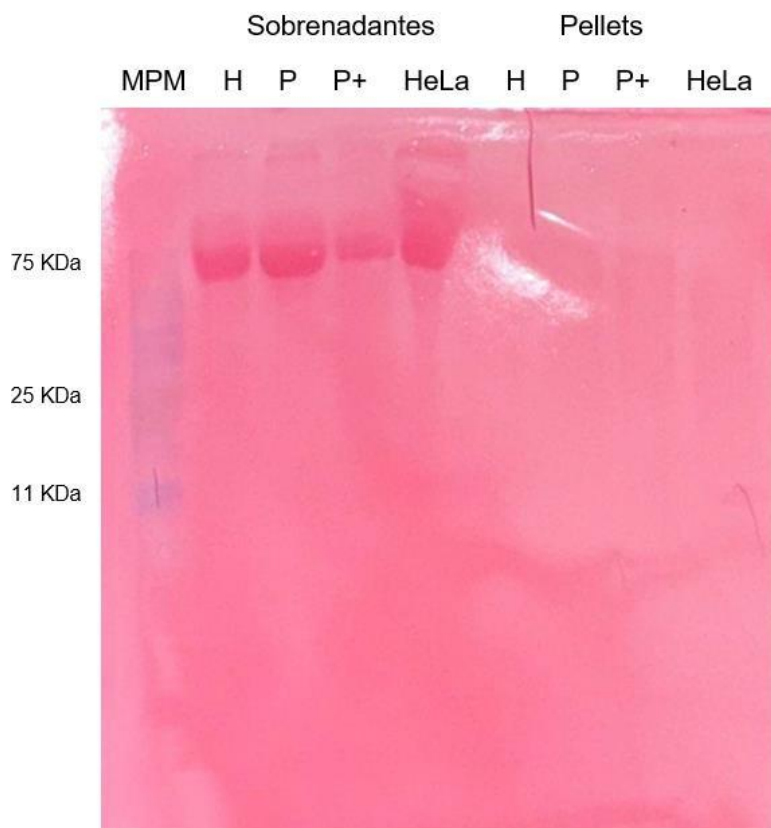


Figura 17: Análisis mediante western blot de la expresión de TNF- α en células HEK 293 transfectadas, luego de la transferencia se tiñó con rojo ponceau. **[MPM]** Marcador de peso molecular *AccuRuler PGB Plus Prestained Protein Ladder* (MAESTROGEN, #02102-250). **(Sobrenadantes)** **[H]** Sobrenadante

células HEK-293. **[P]** Sobrenadante células transfectadas sin antibiótico. **[P+]** Sobrenadante células transfectadas tratadas con antibiótico. **[HeLa]** Sobrenadante células HeLa. **(Pellets)** **[H]** Lisado celular de células HEK-293 **[P]** Lisado celular de células transformadas sin tratar con antibiótico. **[P+]** Lisado celular de células transformadas tratadas con antibióticos. **[HeLa]** Lisado celular de células HeLa.

En la figura 17, se observa las proteínas totales de las muestras. Dicho esto, se confirma que la transferencia se realizó de forma correcta. Se puede visualizar que en los sobrenadantes hay mayor cantidad de proteínas totales que en los *pellets*, en especial a la altura de en especial a la altura de 70-65 kDa. Se visualiza una banda en la misma altura en todas las muestras, podría deberse al suero fetal bovino (SFB) ya que todos los sobrenadantes lo contienen. El SFB es un componente común en los medios de cultivo celular debido a su rico contenido en factores de crecimiento, hormonas, proteínas, vitaminas, minerales y otros nutrientes esenciales para el crecimiento y la proliferación celular. Entre las proteínas presentes en el SFB, una de las más importantes es la albúmina de suero bovino (BSA), es la principal proteína del suero y su peso molecular es aproximadamente de 66,5 kDa.

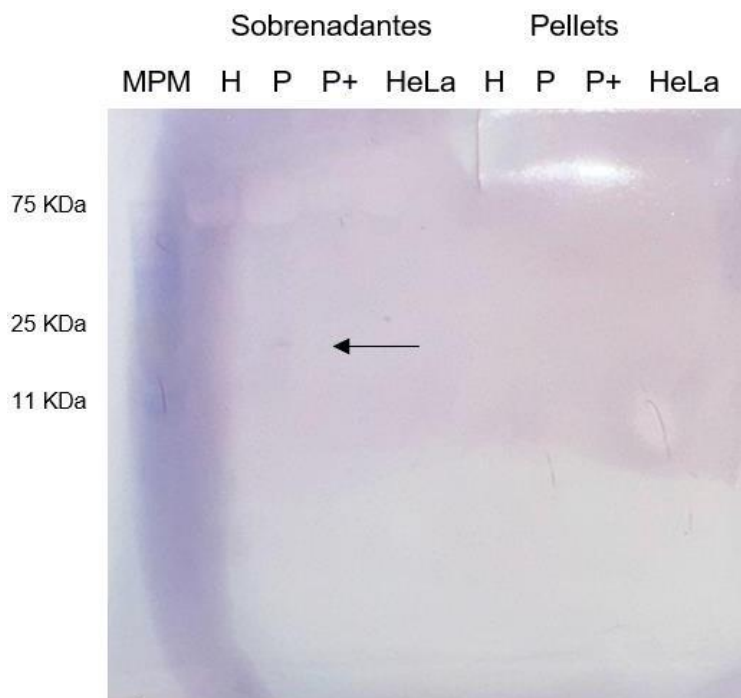


Figura 18: Análisis mediante western blot de la expresión de TNF- α en células HEK 293 transfectadas, luego del revelado. **[MPM]** Marcador de peso molecular *AccuRuler PGB Plus Prestained Protein Ladder* (MAESTROGEN, #02102-250). **(Sobrenadantes)** **[H]** Sobrenadante células HEK-293. **[P]** Sobrenadante células transfectadas sin antibiótico. **[P+]** Sobrenadante células transfectadas tratadas con antibiótico. **[HeLa]** Sobrenadante células HeLa. **(Pellets)** **[H]** Lisado celular de células HEK-293 **[P]** Lisado celular de células transformadas sin tratar con antibiótico. **[P+]** Lisado celular de células transformadas tratadas con antibióticos. **[HeLa]** Lisado celular de células HeLa.

La detección de TNF- α se llevó a cabo mediante el uso de un anticuerpo primario monoclonal específico de ratón (anti-TNF- α), seguido de la incubación con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a fosfatasa alcalina. Este método reveló una banda de 17 kDa en el

sobrenadante de células transformadas cultivadas sin G418, indicando la presencia de la proteína TNF- α . La aparición exclusiva de esta banda en muestras sin presión selectiva sugiere que la transfección es estable y plantea que la presión selectiva podría influir en la expresión proteica, posiblemente debido a la competencia por la maquinaria traduccional o diferencias en el estado metabólico de las células.

Se puede observar una discrepancia entre los niveles de ARNm de TNF- α medidos y la expresión proteica que pareciera ser mucho menor. Esto puede ser resultado de que los estudios fueron realizados en líneas celulares diferentes, pudiendo presentar la línea policlonal una menor expresión que la de los clones individuales. Otra explicación es la compleja regulación postranscripcional que caracteriza a esta citoquina. La modulación de la estabilidad y la traducción del ARNm puede influir significativamente en la cantidad de proteína producida, independientemente de los niveles de ARNm. Por último, la falta de detección de TNF- α en el sobrenadante de las células HeLa tratadas con LPS, sugiere una baja sensibilidad de la técnica.

Estos ensayos deberían ser repetidos, modificando el protocolo de detección e incorporando el análisis de las líneas monoclonales generadas. Además, sería beneficioso añadir control positivo adicional, como la proteína TNF- α purificada de manera de confirmar la eficacia y especificidad del protocolo.

5. Conclusiones

En este trabajo se logró transformar en forma estable la línea celular HEK-293 con el plásmido pcDNA3.1(+)+TNF- α . Se logró obtener una línea celular policlonal recombinante capaz de producir TNF- α . Se realizó la caracterización de las líneas celulares HEK_TNF- α y HEK-293 a lo largo de un periodo de 16 días, durante el cual se observó que la modificación realizada no afecta el crecimiento de las células. A partir de la línea policlonal se produjeron 4 líneas celulares monoclonales mediante la técnica de dilución límite. Se confirmó la correcta transformación de las células mediante PCR con *primers* específicos a partir de extracción de ADN de las células policlonales y de las 4 líneas monoclonales. Se realizó el estudio de la expresión de TNF- α mediante qPCR a partir del ADNc de los 4 clones estudiados se observó que expresan entre 110 y 480 veces más que la línea no transformada. El estudio de la expresión proteica mediante western blot permitió detectar esta citoquina en el sobrenadante de la línea policlonal crecida en ausencia de presión selectiva. Este trabajo proporciona una base sólida para futuras investigaciones sobre TNF- α y su aplicación en terapias contra enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

6. Perspectivas a futuro

Nos planteamos como perspectivas a futuro realizar la caracterización las 4 líneas monoclonales realizando curvas de crecimiento y además se podría realizar una cuantificación proteica a lo largo de un periodo de 16 días. Por otro lado, se propone realizar el análisis de expresión génica de la línea policlonal HEK_TNF- α mediante qPCR. También, se debería repetir el ensayo de cuantificación proteica vía western blot, optimizando el uso del anticuerpo primario, e incluyendo el análisis de las líneas monoclonales y un control positivo. Y como último, se plantea diseñar y ejecutar ensayos biológicos para evaluar la actividad de la citoquina producida por las células generadas en este estudio.

7. Referencias bibliográficas

1. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 2010;327(5963):291–295.
2. Barratt-Due A, Pischke SE, Brekke OL, Thorgersen EB, Nielsen EW, Espevik T, et al. Bride and groom in systemic inflammation - The bells ring for complement and Toll in cooperation. *Immunobiology*. 2012;217(11):1047-56.
3. Bianchi ME, Manfredi AA. Immunology. Dangers in and out. *Science*. 2009;323(5922):1683-4.
4. 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.
5. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*. 2015;16(4):343–353.
6. Lam KT. EVASIÓN PARASITARIA AL SISTEMA DEL COMPLEMENTO [Tesis de Grado]. España: Universidad Complutense; 2018.
7. Levine SJ, Larivée P, Logun C, Angus CW, Ognibene FP, Shelhamer JH. Tumor necrosis factor-alpha induces mucin hypersecretion and MUC-2 gene expression by human airway epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 1995;12(2):196-204.
8. González-Amaro R, García-Monzón C, García-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. *J Exp Med*. 1994;179(3):841-848.
9. 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).
10. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*. 2000;50(3):184-195.
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. *Gaceta Médica de México*. 2014;150:334-344.
12. Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu. Rev. Cell Biol*. 2006;9:317–343.
13. Rigby WF. Introduction to TNF gene regulation. Trabajo presentado en: ACR Basic Science Symposium. Memorias del ACR Basic Science Symposium; 2000 Octubre 30. p 173-183.

14. 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. *Infect Immun.* 1996;64(12):5403-5405.
15. Anaya JM. Descripción Molecular del TNF- α . 2003;19(2):112-120.
16. Franco DL. Mecanismos moleculares de sensibilización y protección de la apoptosis inducida por TNF- α . [Tesis de Doctorado]. Argentina: Universidad de Buenos Aires; 2003.
17. Le J, Vilcek J. Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest.* 1987;56(3):234-248.
18. Mathison JC, Wolfson E, Ulevitch RJ. Participation of tumor necrosis factor in the mediation of Gram negative bacteria lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. *J.Clin. Invest.* 1988;81(6):1925-1937.
19. Tracey KJ. Tumor necrosis factor-alpha. En: Thomson A. *The cytokine handbook*. 2da. ed. San Diego: Academic Press; 1994. p 289-300.
20. Dinarello CA, Moldawer LL. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. A primer for clinicians. 2da. Thousand Oaks, CA: Amgen; 1999.
21. 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.
22. 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 63 inhibitors in therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021;22(5):1 16.
23. Boussiotis VA, Nadler LM, Strominger JL, Goldfeldt AE. Tumor necrosis factor α is an autocrine growth factor for normal human B cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91(15): 7007–7011.
24. Mora Arias TT, Andrade Ortega L, Bourlon Cuéllar RA. Medicamentos biológicos en artritis reumatoide. *Med Int Mex.* 2010;26(3):259-268.
25. Recillas-Targa F. Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. *Mol Biotechnol.* 2006;34(3):337–354.
26. Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: The present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2010;397(8):3173–3178.
27. Rodríguez Aguilar M. DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA ESTABLE CHO-S pcDNA3/IFN- γ PARA LA PRODUCCIÓN DE IFN- γ HUMANO RECOMBINANTE. [Tesis de Maestría]. México: Universidad Autónoma del Estado de Morelos; 2019.

28. Luthra A, Spanjaard RA, Cheema S, Veith N, Kober L, Wang Y, Jing T, Zhao Y, Hoeksema F, Yallop C. 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;186:105920.
29. Chin CL, Goh JB, Srinivasan H, Liu KI, Gowher A, Shanmugam R, Lim HL, Choo M, Tang WQ, Tan AHM. A human expression system based on HEK293 for the stable production of recombinant erythropoietin. *Sci Rep*. 2019;9:1-16.
30. Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2005;51:187–200.
31. 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.
32. Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK. Role of TNF α in pulmonary pathophysiology. *Respir Res*. 2006;7(125).
33. Hsu H, Shu H-B, Pan M-G. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD Interactions Define Two Distinct TNF Receptor 1 Signal Transduction Pathways. 1996.
34. Glaser, K. B., Falduto, M., Metzger, R., Pederson, T., Pease, L., Shiosaki, K., & Morgan, D. W. Expression, release, and regulation of human TNF α from stable transfectants of HEK-293 cells. *Inflammation Research*. 1997;46:127–128.
35. Uphoff CC, Drexler HG. Detection of mycoplasma contaminations. *Methods in Molecular Biology*. 2013;946:1–13.
36. Ananth S. A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection [Internet] EEUU: Bio-Rad Laboratories; 2021 [citado 2024 Mar 5]. Disponible desde: https://www.academia.edu/4635006/A_Guide_to_Polyacrylamide_Gel_Electrophoresis_and_Detection.
37. Valle, J. M. Generación de una línea celular productora de tnf- α humano. [Tesis de Grado]. Uruguay: Universidad ORT Uruguay; 2022.
38. 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. *Oncotarget*. 2014;5(20):9727–9743.
39. Promega Corporation. pGEM®-T Easy Vector Systems [Internet]. Madison (Wisconsin): Promega Corporation; diciembre 2013 [citado 2024 marzo 21]. Disponible desde: <https://worldwide.promega.com/es-es/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/?catNum=A1360#protocols>
40. Masters JRW. Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2000;1(3):233–236.
41. Puerta JD, Usme-Ciro JA, Gallego-Gómez JC. Implementación de un control interno en la detección molecular de las principales especies de micoplasmas contaminantes

- de cultivos celulares. *Salud Uninorte*. 2013;29(2):160-173.
42. Abaandou L, Quan D, Shiloach J. Affecting hek293 cell growth and production performance by modifying the expression of specific genes. *Cells*. 2021;10(7).
 43. 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.
 44. Gama I. Puesta a punto de un método de screening para bacterias ácido-lácticas con potencial inmunomodulador. [Tesis de Grado]. Uruguay: Universidad ORT Uruguay; 2020.
 45. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2da Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
 46. Agustina L, Soledad D. Obtención de aminoácidos tipo micosporina provenientes de microalgas y evaluación in vitro del efecto protector sobre queratinocitos humanos expuestos a radiación ultravioleta. [Tesis de Grado]. Uruguay: Universidad ORT Uruguay; 2023.
 47. Bustin SA, Nolan T. *A-Z of Quantitative PCR*. San Diego: International University Line; 2004.
 48. Čepin's U. *Understanding qPCR Efficiency and Why It Exceeds 100%*. 2017
 49. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001;25(4):402–408.
 50. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper– Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*. 2004;26(6):509–515.
 51. Rocha AJ, Monteiro-Júnior JE, Freire JEC, Sousa AJS, Fonteles CSR. Real Time PCR: the Use of Reference Genes and Essential Rules Required to Obtain Normalisation Data Reliable to Quantitative Gene Expression. *Journal of Molecular Biology Research*. 2015;5(1):45.
 52. Federico C, Sofía R. Estudio del efecto de ácidos grasos saturados y poliinsaturados en células cancerosas de pulmón humanas. [Tesis de Grado]. Uruguay: Universidad ORT Uruguay; 2022.
 53. Isabella GC. Puesta a punto de un método de screening para bacterias ácido-lácticas con potencial inmunomodulador. [Tesis de Grado]. Uruguay: Universidad ORT Uruguay; 2020.

8. Anexo

8.1 Anexo 1: Secuencia *primers* para la secuenciación

Tabla A1: Secuencia de los *primers* 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

8.2 Anexo 2: Visualización plásmido pcDNA3.1(+)+TNF- α

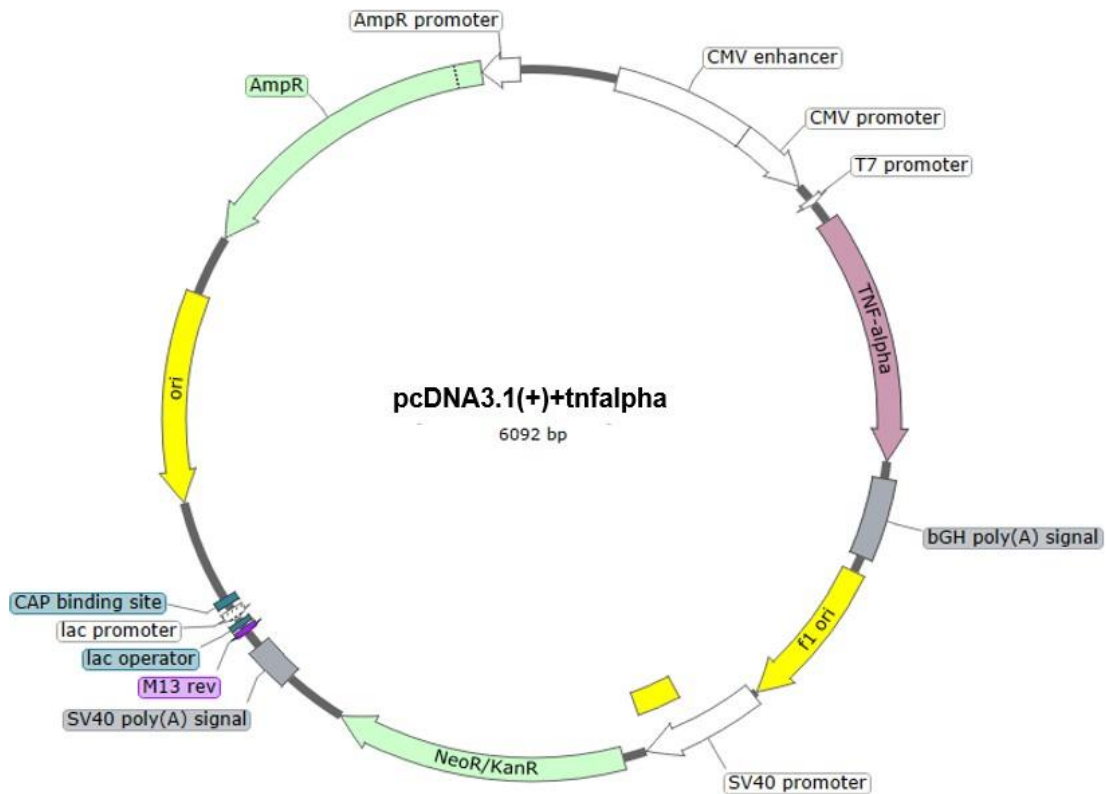


Figura A2: Mapa del plásmido pcDNA3.1(+)+TNF- α (genscript #NM_000594.4), que muestra sus características. Promotor de CMV (CMV promoter) y CMV enhancer para la expresión constitutiva en células de mamífero, MCS (del inglés: "Multiple Cloning Site"), resistencia a neomicina en eucariotas, resistencia a ampicilina en bacterias.

8.3 Anexo 3: Secuencia de la proteína TNF- α

Tabla A2: Secuencia de la proteína TNF- α

Proteína	Secuencia
TNF- α	<p>CTCTTCCTCTCACATACTGACCCACGGCGCTAGCCTCTCTC CCCTGGAAAGGACACCATGAGCACTGAAAGCATGATCCGG GACGTGGAGCTGGCCGAGGAGGCGCTCCCCAAGAAGACA GGGGGGCCCCAGGGCTCCAGGCGGTGCTTGTTCTCAGC CTCTTCTCCTTCCTGATCGTGGCAGGCGCCACCACGCTCTT CTGCCTGCTGCACTTTGGAGTGATCGGCCCCAGAGGGAA GAGTTCCCCAGGGACCTCTCTAATCAGCCCTCTGGCCCA GGCAGTCAGATCATCTTCTCGAACCCCGAGTGACAAGCCTG TAGCCCATGTTGTAGCAAACCCTCAAGCTGAGGGGCAGCTC CAGTGGCTGAACCGCCGGGCAATGCCCTCCTGGCCAATG GCGTGGAGCTGAGAGATAACCAGCTGGTGGTGCCATCAGA GGGCCTGTACCTCATCTACTCCCAGGTCCTTTCAAGGGCC AAGGCTGCCCTCCACCCATGTGCTCCTCACCCACACCATC AGCCGCATCGCCGTCTCCTACCAGACCAAGGTCAACCTCCT CTCTGCCATCAAGAGCCCTGCCAGAGGGAGACCCAGAG GGGGCTGAGGCCAAGCCCTGGTATGAGCCCATCTATCTGG GAGGGGTCTTCCAGCTGGAGAAGGGTGACCGACTCAGCGC TGAGATCAATCGGCCCGACTATCTCGACTTTGCCGAGTCTG GGCAGGTCTACTTTGGGATCATTGCCCTGTGAGGAGGACG AACATCCAACCTTCCCAAACGCCTCCCCTGCCCAATCCCT TTATTACCCCTCCTTCAGACACCCTCAACCTCTCTCGAGTT A</p>
TNF- α (Genscript)	<p>ATGAGCACTGAAAGCATGATCCGGGACGTGGAGCTGGCCG AGGAGGCGCTCCCCAAGAAGACAGGGGGGCCCCAGGGCT CCAGGCGGTGCTTGTTCTCAGCCTCTTCTCCTTCCTGATC GTGGCAGGCGCCACCACGCTCTTCTGCCTGCTGCACTTTG GAGTGATCGGCCCCAGAGGGAAGAGTTCCCAGGGACCT CTCTAATCAGCCCTCTGGCCAGGCAGTCAGATCATCTT CTCGAACCCCGAGTGACAAGCCTGTAGCCCATGTTGTAGCA AACCTCAAGCTGAGGGGCAGCTCCAGTGGCTGAACCGCC GGGCCAATGCCCTCCTGGCCAATGGCGTGGAGCTGAGAGA TAACCAGCTGGTGGTGCCATCAGAGGGCCTGTACCTCATCT ACTCCCAGGTCCTTTCAAGGGCCAAGGCTGCCCTCCAC CCATGTGCTCCTCACCCACACCATCAGCCGCATCGCCGTCT CCTACCAGACCAAGGTCAACCTCCTCTCTGCCATCAAGAGC CCCTGCCAGAGGGAGACCCAGAGGGGGCTGAGGCCAAG CCCTGGTATGAGCCCATCTATCTGGGAGGGGTCTTCCAGCT GGAGAAGGGTGACCGACTCAGCGCTGAGATCAATCGGCC GACTATCTCGACTTTGCCGAGTCTGGGCAGGTCTACTTTGG GATCATTGCCCTGTGA</p>

8.4 Anexo 4: Curvas de eficiencia de *primers*

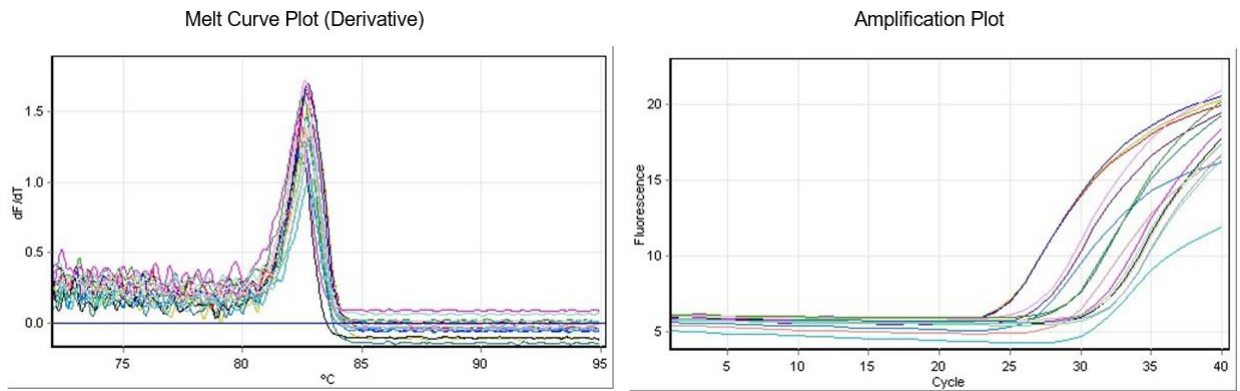


Figura A3: Curva de eficiencia de *primers* para TNF- α

8.5 Anexo 5: Curvas de expresión de genes

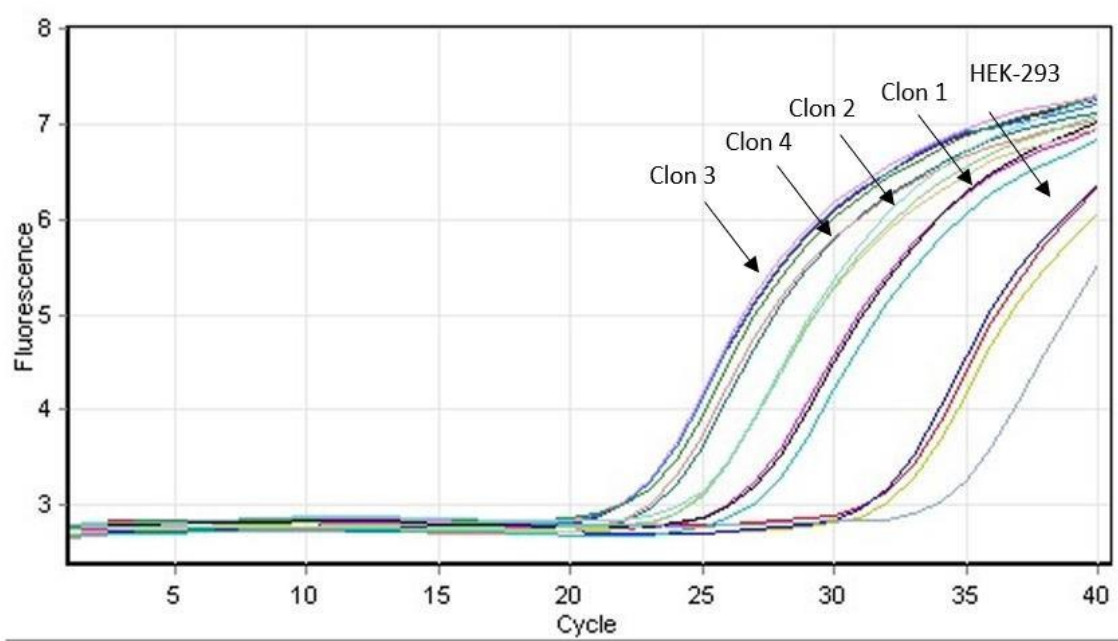


Figura A4: Análisis de expresión del gen TNF- α . Expresión del gen TNF- α (—) en células HEK-293, clon 1, clon 2, clon 3, clon 4.