



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Obtención de un plásmido que
expresa luciferasa para
establecer un método de
medición de citotoxicidad**

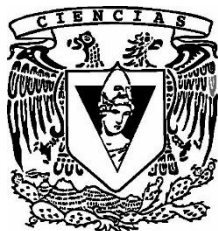
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

**Victor Hugo Morales
Bernardino**



DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Carlos Rosales Ledezma
Ciudad Universitaria Cd. Mx., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno
Morales
Bernardino
Victor Hugo
5522311376
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308192207
2. Datos del tutor:
Dr.
Carlos
Rosales
Ledezma
3. Datos del sinodal 1
Dr.
Saúl
Gómez
Manzo
4. Datos del sinodal 2
Dra.
Claudia Andrea
Segal
Kischinevzky
5. Datos del sinodal 3
Dr.
Juan Luis
Chávez
Pacheco
6. Datos del sinodal 4
Dra.
Diana Elodia
Aguilar
León
7. Datos del trabajo escrito
Obtención de un plásmido que expresa luciferasa para establecer un
método de medición de citotoxicidad
59p
2017

Índice General:

I.	Agradecimientos	4
II.	Agradecimientos Personales	5
III.	Resumen	7
IV.	Introducción	8
	Cáncer.....	8
	Neutrófilos.....	10
	Genes reporteros.....	12
	Plásmidos.....	13
	Citotoxicidad.....	15
	Ensayos para citotoxicidad.....	16
	Transfección de células.....	20
V.	Planteamiento del problema	23
VI.	Objetivos	24
	General.....	24
	Particulares.....	24
VII.	Hipótesis	25
VIII.	Materiales y métodos	26
	Células.....	26
	Tinción con calceína.....	26
	Obtención del plásmido con el inserto <i>luc</i> :.....	27
	Digestiones de los plásmidos.....	27
	Purificación de los fragmentos digeridos.....	28
	Ligación del plásmido con el gene <i>luc</i>	29
	Transformación de bacterias.....	30
	Miniprep.....	30
	Maxiprep.....	31
	Electroforesis de DNA.....	33
	Optimización de la transfección de células con GFP utilizando el equipo Nucleofector 2b (Amaya Inc.).....	33

	Transfección de las células con el plásmido recombinante pcDNA3.1/luc.....	34
	Ensayos de luciferasa.....	35
	Conservación de las células.....	36
IX.	Resultados.....	37
	Detección de células con calceína.....	37
	Construcción del plásmido pcDNA3/luc.....	40
	Obtención del plásmido con el inserto luc.....	43
	Comprobación de ligación por ensayo de restricción.....	45
	Optimización del método de transfección.....	46
	Transfección de las células con el plásmido pcDNA 3.1/luc.....	49
	Obtención de líneas celulares que expresen constitutivamente luciferasa.....	51
X.	Discusión.....	52
XI.	Conclusiones.....	55
XII.	Bibliografía.....	56

Agradecimientos:

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a la Magnífica Facultad de Ciencias por abrigarme en sus instalaciones durante el desarrollo de mis estudios universitarios.

*Este trabajo de tesis de licenciatura se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del **Dr. Carlos Rosales Ledezma** y fue apoyado en parte por el **Proyecto 254434** del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.*

Agradezco al Dr. Carlos Rosales Ledezma su guía, apoyo y gran ayuda durante el desarrollo de éste trabajo. Por las enseñanzas a lo largo de mi servicio social y la realización de mi tesis de licenciatura.

Agradezco enormemente a la M. en IBB Nancy Yorley Mora Perez por su excelente ayuda técnica.

A la QFB Itzia Hacibe Acosta, por su gran apoyo durante la realización experimental de ésta tesis.

A mis sinodales por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo escrito, gracias por las valiosas aportaciones al mismo.

A los profesores que ayudaron a mi formación académica durante mi estancia en la gloriosa facultad de ciencias de nuestra máxima casa de estudios.

Agradecimientos personales:

A mi padre Ancelmo Rosendo Morales Peláez por ser mi ejemplo de rectitud y lucha diaria, por demostrarme que el amor, el respeto y la tolerancia son grandes virtudes que no todos poseen. Por el apoyo incondicional que sin importar los desafíos nunca me ha dejado a la deriva, gracias por todo, te amo papá.

A mi madre Marfa Bernardino Figueroa por ser el mejor ejemplo de madre, que jamás se rinde sin importar los retos y problemas que tenga en frente, por siempre estar a mi lado guiándome en los retos que he enfrentado, por sacar adelante a nuestra familia en los problemas que nos han aquejado, por siempre sacrificarse para nosotros, te amo por siempre mamá.

A mi hermano Ancelmo Rosendo Morales Bernardino por ayudarme desde el inicio de mis estudios, por sembrar en mí las ganas de superación personal y académica cuando más lo necesitaba, por ser para mí un segundo padre y demostrarme que a pesar de lo duro que puede llegar a ser la vida rendirse no es una opción

A mi hermano José Guadalupe Morales Bernardino por ser mi compañero, amigo y cómplice de la vida, por hacerme ver mis terrores y ayudarme a ser mejor persona cada día. Por dejarme seguir sus pasos, sin tu ayuda hoy yo no estaría aquí.

A mis sobrinas María del Pilar y Joanna Rosenda Morales Hernández, gracias por darme la felicidad de compartir días, mañanas y noches con ustedes. Porque aun siendo pequeñas nos han demostrado a todos que las adversidades de la vida siempre pueden superarse, no duden que siempre voy a estar aquí para ustedes.

A Yecenia Martínez Nájera por brindarme apoyo y comprensión en los momentos difíciles, por ayudarme a la realización y conclusión de éste trabajo, por motivarme a ser mejor persona con los consejos que me das. Gracias por estar a mi lado, por procurarme y preocuparte por mí, por llegar a mi vida en el momento justo y

sorprenderme con los maravillosos momentos que hemos pasado, por compartir nuestros gustos y por seguir demostrándome que las dificultades que nos ponen en frente no pueden detenernos por ningún motivo, te adoro.

A mis amigos: Zayda, Carlos, Julio y Rafael por hacer que el tiempo en el laboratorio fuera más ameno.

A quiénes siempre han confiado en mí y me han apoyado.

A todos y cada uno de ellos, muchas gracias.

Resumen:

El cáncer es una enfermedad en la que células anormales se dividen fuera de control y pueden adquirir capacidad para invadir tejidos cercanos. La gran mayoría de cánceres se encuentran dentro de alguno de los siguientes grupos: carcinomas (alrededor del 90% de cánceres humanos), sarcomas (son raros en humanos) y leucemias y linfomas (8% de neoplasias malignas en humanos). Los tumores sólidos no sólo están conformados por células cancerígenas, sino también de células normales del hospedero tales como: adipocitos, fibroblastos y células hematopoyéticas que son atraídas desde el sistema sanguíneo. En los últimos años se ha vuelto evidente que los neutrófilos también se encuentran asociados a tumores y parecen tener un papel crucial en el desarrollo de la enfermedad de cáncer.

Para poder estudiar la capacidad citotóxica de los neutrófilos frente a diferentes tipos de células cancerígenas, se requiere de un método eficiente, rápido y económico. Por lo cual en éste trabajo se planteó utilizar una enzima (Luciferasa) de fácil detección y alta sensibilidad como marcador de las células blanco.

Se logró subclonar un plásmido que codifica para la enzima luciferasa y al mismo tiempo para el antibiótico G418, se comprobó su funcionamiento y se midió su eficiencia. Se transfectaron 3 líneas diferentes de cáncer con el nuevo plásmido (pcDNA 3.1//*luc*) y las células son mantenidas en cultivo para su selección.

Introducción:

Cáncer:

El cáncer es una enfermedad en la que células anormales se dividen fuera de control y pueden adquirir capacidad para invadir tejidos cercanos. Las células cancerosas pueden propagarse en el resto del organismo a través del sistema sanguíneo o del sistema linfático (National Cancer Institute, 2017). La pérdida del control proliferativo exhibida por las células cancerígenas es el resultado de una serie de anomalías acumuladas en los sistemas reguladores de muchas células. De acuerdo al Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos, existen 200 tipos y alrededor de 800 subtipos de cáncer (Song, Merajver, & Li, 2015). Los tipos de cáncer son organizados en base a la localización del órgano en el que se encuentran. La gran mayoría de cánceres se encuentran dentro de alguno de los siguientes tres grupos: carcinomas (alrededor del 90% de cánceres humanos), sarcomas (son raros en humanos) y leucemias y linfomas (8% de neoplasias malignas en humanos) (Cooper, 2000). Los carcinomas son tumores cancerígenos que aparecen en células que recubren diversos órganos o glándulas del cuerpo tales como próstata, mama, estómago, útero, piel, entre otros. La línea celular HeLa es un ejemplo de carcinoma (Lucey *et al.*, 2009). Los sarcomas se derivan de tejido conectivo, que incluye: hueso, músculo y cartílago. Las leucemias se desarrollan en la médula ósea, que es el tejido encargado de producir células sanguíneas. Las líneas celulares K562 y THP-1 son ejemplos de leucemia (Auwerx, 1991; Osti *et al.*, 1997).

Las células THP-1 son un claro ejemplo de leucemia, fueron obtenidas a partir de la muestra sanguínea de un niño de 1 año de edad con leucemia monocítica aguda (Tsuchiya *et al.*, 1980). La morfología de estas células es esférica y en condiciones *in vitro* crecen en suspensión. Las células THP-1 han sido ampliamente utilizadas para comprender de mejor manera mecanismos como: transporte de nutrientes y drogas, vías de señalización, fagocitosis y otras funciones de monocitos/macrófagos

(Chanput *et al.*, 2014). Estas células crecen en suspensión en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute por su acrónimo en inglés) suplementado.

La línea K562 son células linfoides precursoras, aisladas de un paciente femenino de 53 años de edad con leucemia mieloide crónica, éstas son causantes de eritroleucemia, crecen en suspensión y tienen una morfología redondeada. Estas células son positivas para la traslocación de los cromosomas 9-22. Una parte del gen *BCR* (del inglés, *Breakpoint Cluster Region*) en el cromosoma 9 se fusiona con parte del gen *ABL* (toma su nombre del virus Abelson) en el cromosoma 2. La traslocación BCR-ABL da lugar al cromosoma Filadelfia (Koretzky, 2007) y al mismo tiempo a una proteína cinasa de tirosinas que es capaz de interactuar con factores, proteínas y enzimas reguladoras de la división celular (Koeffler & Golde, 1980). Cabe destacar que ésta es una línea celular susceptible de la actividad citotóxica mediada por células NK (Neri *et al.*, 2011).

Las células HeLa por otro lado, son la línea celular más estudiada; fueron también las primeras en establecerse en cultivo (Gey *et al.*, 1952) y provienen de la biopsia de una paciente con cáncer cervical (Hsu *et al.*, 1976). Éstas poseen un crecimiento exponencial (Franke & Scheer, 1971) y han sido utilizadas para medir adhesión celular, mitosis, ensayos con sustancias tóxicas y procesos biosintéticos (Epstein, 1961), éstas son células que en condiciones *in vitro* crecen de manera adherida, con morfología alargada en sus extremos.

Los tumores sólidos no sólo están conformados por células cancerígenas, sino también de células propias del hospedero tales como: adipocitos, fibroblastos y células hematopoyéticas que generan las células del sistema sanguíneo (Genin *et al.*, 2015), entre las que destacan los neutrófilos. Entonces la detección temprana del cáncer es fundamental para un tratamiento efectivo de la enfermedad. Desafortunadamente, en México, el diagnóstico temprano no es eficiente y en los últimos 15 años también se ha observado un incremento en la mortalidad por esta enfermedad (Arce *et al.*, 2011).

Neutrófilos:

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en la sangre y se consideran la primera línea de defensa del organismo durante la inflamación y en distintas infecciones causadas por bacterias invasoras, hongos y protozoarios (Faurichou *et al.*, 2003). Para atacar a los microorganismos, los neutrófilos utilizan alguna de las siguientes estrategias: fagocitosis, degranulación o producción de trampas extracelulares de neutrófilo (NETs por su acrónimo en inglés) (Figura 1). Una disminución en el número de estas células conduce a diversas inmunodeficiencias humanas (Zeidler *et al.*, 2011). Además de su papel clásico en infecciones, los neutrófilos también se encuentran infiltrando muchos tipos de tumores (Kolaczowska *et al.*, 2013). En humanos, los neutrófilos representan entre el 50 % y 70 % de los leucocitos totales en circulación (Doeing *et al.*, 2003).

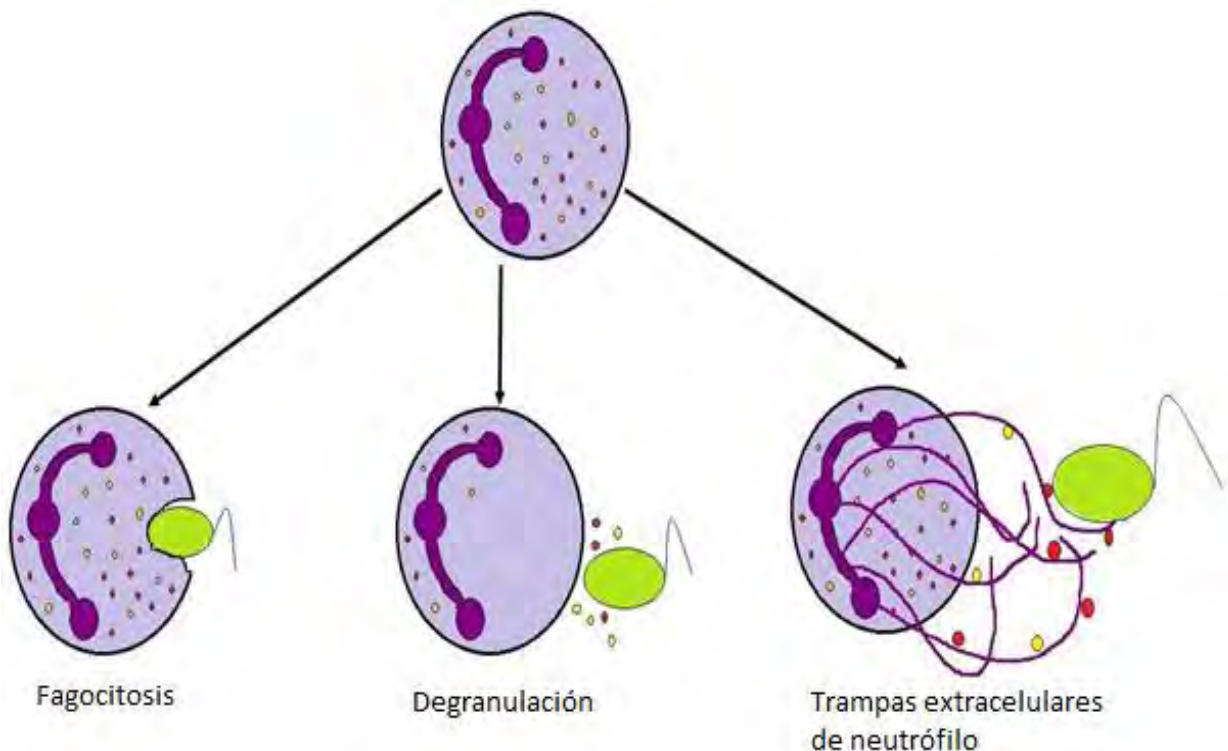


Figura 1. Mecanismos de muerte utilizados por el neutrófilo para la eliminación de microorganismos.

Los neutrófilos son células polimorfonucleares de vida corta que miden entre 7 y 10 μm de diámetro (Figura 2). Éstas células contienen en su citoplasma diversas vesículas que han sido clasificadas como: gránulos azurófilos, gránulos específicos y gránulos peroxidasa-negativos. Los gránulos azurófilos o peroxidasa-positivos (anteriormente conocidos como lisosomas primarios) poseen en su interior principalmente mieloperoxidasa y alfa-defensinas (Faurischou *et al.*, 2003). En la membrana de estos gránulos se expresa el marcador CD63 (Cham *et al.*, 1994). Los gránulos azurófilos sólo son secretados por los neutrófilos en respuesta a algún estímulo (Kjeldsen *et al.*, 1993). Los gránulos específicos (antes llamados gránulos secundarios) contienen principalmente lactoferrina. Los gránulos peroxidasa-negativos, contienen en su interior gelatinasa y metaloproteinasa 9 de matriz (Kolaczowska *et al.*, 2013).

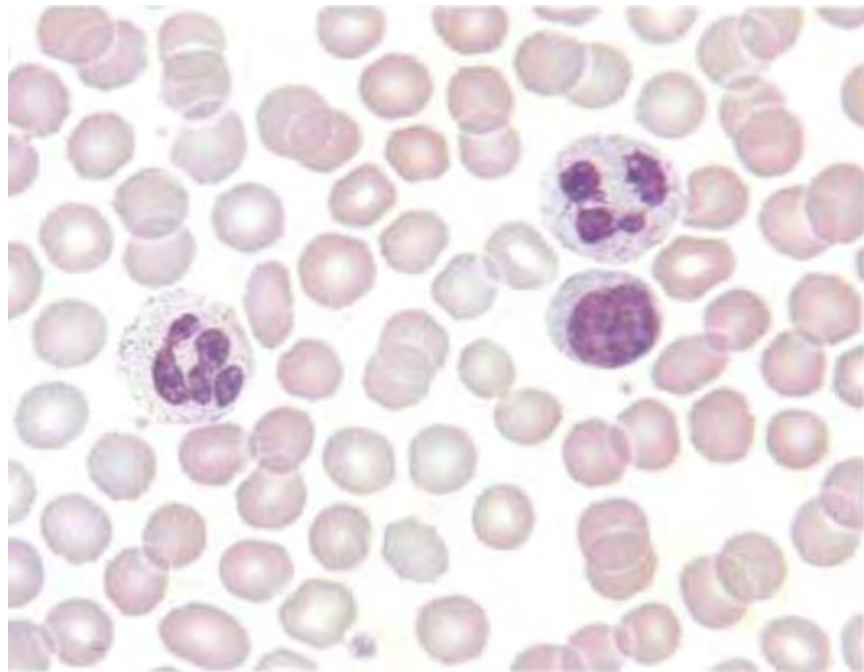


Figura 2. Frotis sanguíneo de sangre normal teñido con Hematoxilina-Eosina donde puede observarse neutrófilos con su núcleo lobulado característico (McDonald *et al.*, 1991).

En los últimos años se ha vuelto evidente que los neutrófilos también se encuentran asociados a tumores y parecen tener un papel crucial en el desarrollo de la enfermedad de cáncer (Uribe-Querol *et al.*, 2015). Parte de este renovado interés por el papel de los neutrófilos en cáncer surge de reconocer que la inflamación es una característica fundamental (*hallmark*) de ésta enfermedad (Hanahan *et al.*, 2011). Los neutrófilos pueden ser potentes células efectoras contra tumores, ya que los compuestos antimicrobianos y citotóxicos de sus gránulos pueden destruir células tumorales y las quimiocinas secretadas por los neutrófilos pueden reclutar otras células con actividad antitumoral (Gregory *et al.*, 2011).

Genes reporteros:

Durante muchos años se han utilizado diversas metodologías para poder observar la expresión de algunas secuencias específicas de DNA dentro de una célula. Una de las metodologías más utilizadas se basa en la expresión de los llamados “genes reporteros”. Los genes reporteros son secuencias de DNA cuyo producto es de fácil detección y cuantificación dentro de las células y ayudan a la identificación de expresión de otros genes. Los genes reporteros son muy utilizados como marcadores de la actividad transcripcional de ciertas secuencias de DNA dentro del núcleo celular (Rosenthal, 1987). Estos genes reporteros pueden insertarse en secuencias reguladoras o promotores y reportar la actividad de los genes de interés (Liu *et al.*, 2009). Se requiere que el DNA reportero sea insertado dentro de una secuencia de DNA llamada “vector” para después ser transferida al interior de la célula. Posteriormente sólo debe medirse la actividad de ese gen reportero mediante ensayos que logren medir su actividad, es importante mencionar que los genes reporteros que se transfieren a las células, deben ser de naturaleza exógena para el blanco de interés (Schenborn *et al.*, 1999).

Entre los genes reporteros utilizados comúnmente se encuentran los que codifican para las enzimas luciferasa, cloramfenicol acetil transferasa, beta-galactosidasa, β -Glucuronidasa y fosfatasa alcalina, entre otros. También se usa ampliamente el gen

de la proteína verde fluorescente (*Green fluorescent protein*), que permite directamente ver a las células que expresan esta proteína (Pérez & Becú-Villalobos, 2009).

Cuando se desea obtener un plásmido (vector) con una nueva secuencia de DNA se recurre a los métodos de biología molecular, los cuales permiten cortar moléculas de DNA circular del plásmido vector con ayuda de enzimas de restricción (endonucleasas), e insertar dentro de él la secuencia de DNA que contenga la información codificante para la expresión del gen deseado. Las endonucleasas son enzimas capaces de reconocer y cortar en secuencias específicas de DNA (Robinson *et al.*, 2002) y se expresan en bacterias. Debido a que microorganismos tales como bacterias y archaeas son susceptibles a ser infectadas por virus, durante su evolución han desarrollado un mecanismo que involucra la eliminación del DNA exógeno a partir de la utilización de éstas enzimas de restricción (Berg *et al.*, 2002).

Plásmidos:

Los plásmidos son material genético circular bacteriano independiente en cuanto a la replicación del genoma de la célula hospedera y de tamaño relativamente pequeño. En algunos casos puede variar desde algunos miles de pares de bases hasta 100 kb (Lodish *et al.*, 2000). En muchas ocasiones se ha comprobado que dentro de este DNA circular pueden encontrarse genes que confieren algunas ventajas, como resistencia a ciertos antibióticos, o en algunos casos a otros organismos bacterianos (Couturier *et al.*, 1988). Muchos plásmidos han sido aislados de bacterias y levaduras para ser optimizados de forma *in vitro* y de esta forma poder utilizarlos en investigación. Para que un plásmido pueda ser utilizado en clonación de DNA estructuralmente debe poseer un origen de replicación, genes de resistencia a uno o más antibióticos y una región (*polylinker* o *multiple cloning site*) donde fragmentos de DNA exógeno puedan ser insertados (Lodish *et al.*, 2000).

El plásmido pGL3-control (Figura 3) tiene un tamaño de 5256 pb y posee una región que codifica para la enzima luciferasa. El cDNA de la luciferasa (*luc*) se encuentra flanqueado en un extremo por una secuencia que es reconocida por la endonucleasa *Hind*III y en el otro una secuencia que reconoce la enzima *Xba*I. El plásmido posee también una secuencia que codifica resistencia a ampicilina.

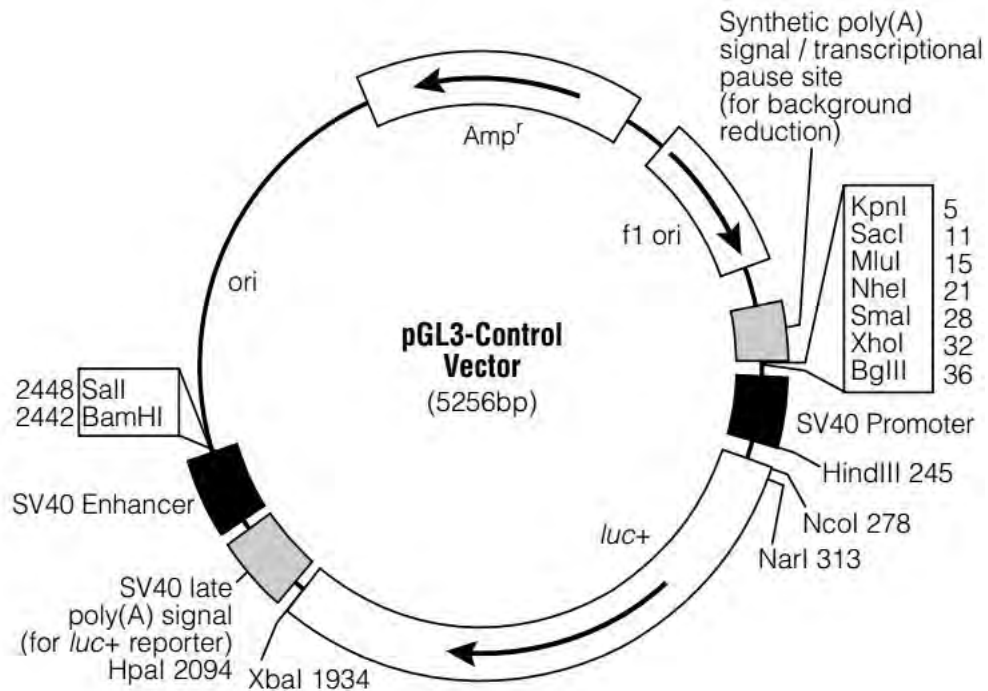


Figura 3. Mapa del plásmido pGL3-Control.

El plásmido pcDNA 3.1/myc-His "A" (Figura 4) tiene un tamaño de 5493 pb, posee un gen de resistencia a ampicilina en procariontes y otro para geneticina (G418) en eucariontes. Este plásmido sirve para dirigir la expresión de genes en células eucariontes, también cuenta con un sitio múltiple de clonación con las secuencias para diferentes endonucleasas, incluyendo: *Hind*III y *Xba*I. Inmediatamente antes de este sitio de clonación, se encuentra una secuencia promotora del virus citomegalovirus (CMV).

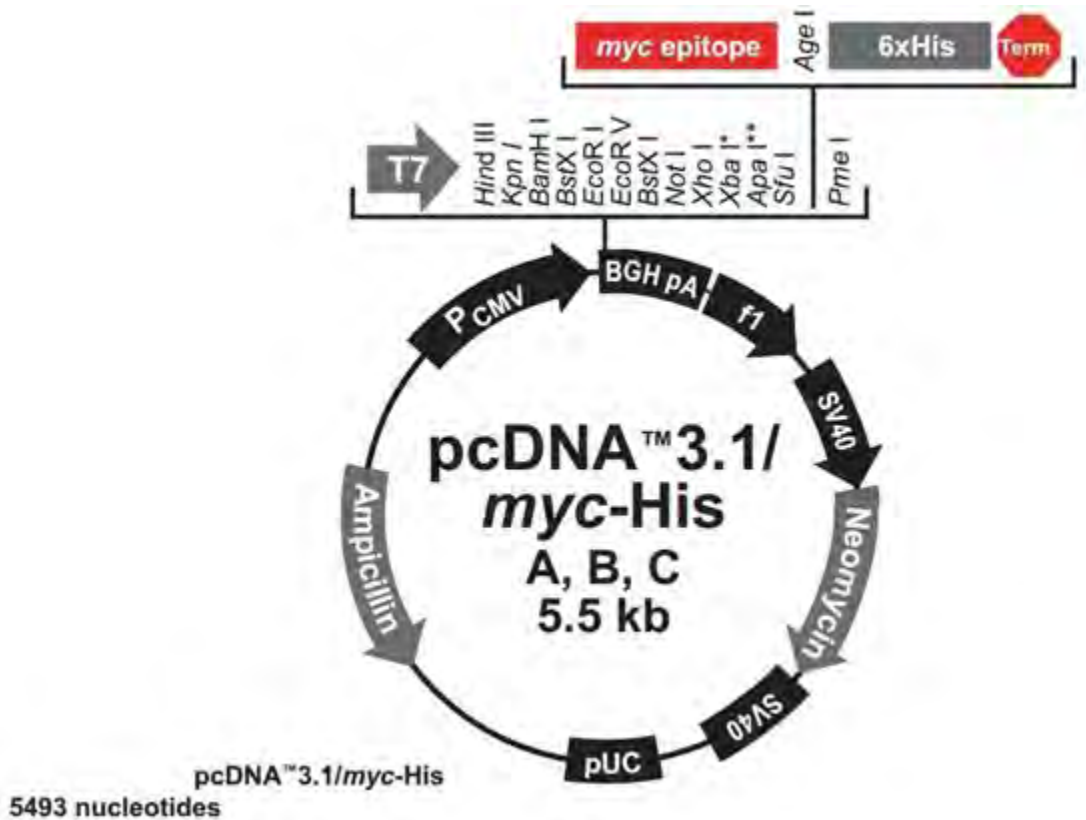


Figura 4. Mapa del plásmido pcDNA 3.1 myc-His

Citotoxicidad:

La citotoxicidad celular es un mecanismo de acción que distintas células del organismo realizan para destruir células infectadas o células tumorales. Las células descritas con más detalle y que han sido llamadas especializadas en realizar esta actividad son los linfocitos NK (por su acrónimo en inglés *Natural Killer*) y los linfocitos T citotóxicos (Tc o TCD8+).

Los linfocitos T citotóxicos poseen en su membrana el correceptor CD8, el cual es capaz de unirse a las moléculas MHC (del inglés *Major Histocompatibility Complex*) de clase I. El MHC de clase I se encuentra presente en todas las células nucleadas del organismo. Cuando estas células son infectadas por virus o parásitos patógenos, expresan en su membrana pequeños péptidos provenientes de estos microorganismos patógenos. Estos péptidos se expresan en la membrana junto con

las moléculas MHC de clase I. Los linfocitos T citotóxicos se encargan de eliminar a las células propias infectadas a través de gránulos que contienen en su interior diversas sustancias tóxicas (granzimas B, perforinas y granulinas). Una vez que las sustancias contenidas en los gránulos de los linfocitos Tc son liberados e ingresan al interior de la célula blanco, se provoca una serie de reacciones proteolíticas que involucra tanto a las granzimas como a las perforinas y a las caspasas de la célula blanco, por lo que inducen la muerte celular por apoptosis. Por otro lado, las células NK han sido consideradas como una tercera población de linfocitos. Debido a que las células NK no poseen los mismos receptores de membrana que los linfocitos B y T, las NK forman parte de la respuesta inmune innata y poseen actividad citotóxica, al igual que los linfocitos Tc.

Ensayos para citotoxicidad:

Durante muchos años se han utilizado los ensayos de citotoxicidad para medir esta actividad utilizando diversos fármacos y sustancias frente células de interés. Un ensayo de citotoxicidad típicamente consiste en medir o evaluar la actividad lítica que presentan las células del sistema inmune (linfocitos T, NK y linfocitos T citotóxicos) o algún fármaco frente a células cancerígenas o células blanco transformadas (Neri *et al.*, 2011). Existen diversas metodologías que han sido utilizadas para la medición de citotoxicidad celular, entre ellas se encuentran: liberación de Cromo radioactivo (^{51}Cr), el ensayo de citotoxicidad con colorantes fluorescentes tales como: calceína-acetoximetil y los ensayos de citotoxicidad con citometría de flujo utilizando los colorantes: carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE), proteína quinasa G-2 (PKG-2, es una enzima que cataliza la transferencia de un grupo fosfato desde el ATP a una preteína) y PKH-26 (se trata de una etiqueta fluorescente de células que se une irreversiblemente en la región de lípidos de las membranas celulares).

El ensayo de liberación de ^{51}Cr ha sido durante mucho tiempo el ensayo de citotoxicidad más utilizado para la medición de la actividad citotóxica de los linfocitos

T CD8+ y de las células NK (Neri *et al.*, 2001) (Figura 5). De manera general, el ensayo consiste en colocar las células blanco en una disolución de cromato de sodio ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$) e incubarlas a 37°C entre 1 y 2 horas. Posteriormente, las células deben lavarse con PBS para después ser colocadas en contacto con las células efectoras a diferentes proporciones de células efectoras a células blanco (*effector to target cell ratio*). Las células juntas se incuban a 37°C entre 2 y 4 horas (Gertner-dardenne, 2012), posteriormente se centrifugan y el sobrenadante es recuperado para medir la cantidad de cromo radioactivo libre. Si las células efectoras tuvieron actividad citotóxica sobre las células blanco entonces el ^{51}Cr es liberado al medio en el que se encuentren las mismas (Nelson, Kurman, & Serbousek, 2001) por lo que puede ser medido con ayuda de un detector de rayos gama. La liberación máxima se produce al agregar algún detergente como el tritón X-100 a las células previamente incubadas con ^{51}Cr , mientras que la liberación espontánea se produce sólo agregando medio de cultivo a las células marcadas (McMillin *et al.*, 2012). La ecuación que se utiliza para medir la actividad citotóxica real de las células es la siguiente:

$$\% \text{ de lisis} = \frac{(\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea})}{(\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea})} \times 100$$

Donde:

La liberación experimental corresponde al valor producido por las células blanco* en contacto con las células efectoras.

La liberación espontánea corresponde a las células Diana* colocadas sólo en medio de cultivo.

La liberación máxima corresponde a las células blanco* incubadas en medio de cultivo y posteriormente lisadas.

*Células que fueron previamente incubadas con $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$

Una de sus principales desventajas de este método es que la medición de la actividad citotóxica sólo puede realizarse en un punto final de lectura (Karimi *et al.*, 2014). Otras desventajas son el manejo de materiales radioactivos, que requiere de un entrenamiento especial para la manipulación de material radioactivo por parte del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ); el elevado costo actual

del ^{51}Cr y la necesidad de un contador gama, el cual lamentablemente no es común encontrar en cualquier laboratorio.

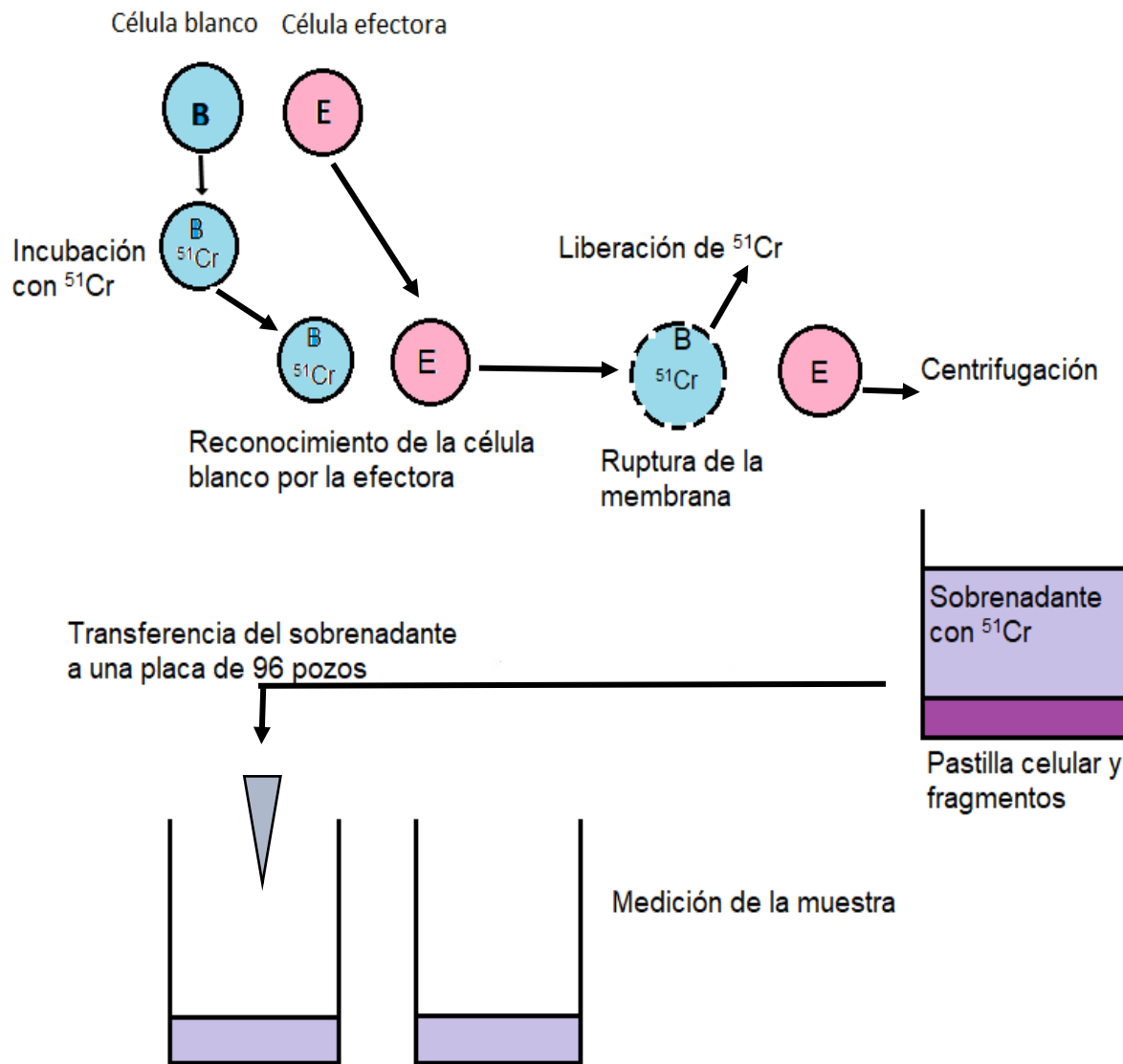


Figura 5. Ensayo estándar de liberación de cromo radioactivo (^{51}Cr).

El ensayo de bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) se ha propuesto desde hace algunos años como otro ensayo para la medición de citotoxicidad. Sin embargo, al ser un ensayo que mide la actividad metabólica de las células, no ha podido demostrarse del todo su aplicabilidad en los ensayos de citotoxicidad celular. Este ensayo consiste en medir a través de espectrofotometría la conversión del MTT a cristales de formazán por acción de la enzima NADPH⁺ en

mitocondrias de células viables (van Meerloo , Kaspers , & Cloos, 2011). El ensayo de MTT es muy utilizado para medir la actividad tóxica de agentes farmacológicos frente a muchas líneas celulares de cáncer. Sin embargo, no hay un criterio en específico que permita diferenciar si el resultado obtenido de la conversión a formazán sea de las células blanco o se debe también a las células efectoras.

El ensayo de citotoxicidad que utiliza a la calceína-acetoximetil o calceína AM ($C_{46}H_{46}N_2O_{23}$) como indicador, consiste en teñir a las células con calceína. La calceína ingresa al interior de las células de forma pasiva a través de la membrana celular y con ayuda de las esterasas es transformada dentro del citoplasma a calceína libre, que es fluorescente (Neri , et al., 2001). Al igual que en el ensayo de liberación de ^{51}Cr , las células blanco que pierden la integridad de su membrana o que son lisadas por la actividad citotóxica de otras, liberan el colorante fluorescente hacia el medio en el que se encuentran, dando lugar así a una intensa señal de color verde que puede ser detectada con ayuda de un lector de fluorescencia.

Brevemente, el método consiste en obtener las células blanco y resuspenderlas en PBS o en medio de cultivo completo con calceína en concentraciones que van desde 1 $\mu g/mL$ hasta los 15 $\mu g/mL$. Las células se incuban durante 30 minutos a 37°C, posteriormente se realiza una serie de lavados con PBS. Al final se obtienen las células que han incorporado en su interior la calceína. Estas células son colocadas de manera similar al ensayo de ^{51}Cr , en diferentes cantidades de células Diana frente a diversas cantidades de células efectoras (*effector to target cells*) en placas de 96 pozos. Las células se incuban a 37°C durante 4 horas. Después el sobrenadante es medido con ayuda de un lector de fluorescencia. Según Neri, et al., 2011 se puede utilizar la misma ecuación del ensayo de liberación de cromo para obtener el porcentaje efectivo de lisis celular. La calceína posee un pico de excitación de 495 nm y uno de emisión de 515 nm.

La principal desventaja de utilizar el método de calceína es su baja sensibilidad, puesto que no logra detectar mediciones de fluorescencia con pequeñas cantidades de células lisadas.

Transfección de células:

La técnica para introducir DNA exógeno al interior de células eucariontes se conoce como transfección celular. La transfección se clasifica en dos tipos: las de métodos físicos y las de métodos químicos. Dentro de los químicos se encuentra el método de fosfato de calcio $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, que consiste en formar un precipitado entre el fosfato de calcio y el DNA, el cual es endocitado por las células. La principal desventaja de este método es que no todas las células se transfectan, requiere de un protocolo optimizado para cada línea celular, en el cual deben variarse las cantidades de DNA, de fosfato de calcio, de tiempo de precipitación y la temperatura a la cual se lleva a cabo la reacción (Ovidio & Portelles, 1997).

Otro método utilizado para introducir DNA a las células es el de DEAE-dextran, el mecanismo por el cual el DNA entra a la célula utilizando esta metodología es poco conocido. Sin embargo, se cree que la vía utilizada es mediada por endocitosis (Selden *et al.*, 1986). Existen 3 diferencias entre el DEAE-dextran y la transfección por sales de fosfato de calcio: 1) El DEAE-dextran sólo se utiliza para transfecciones transitorias, 2) no funciona bien en todas las líneas celulares y 3) requiere menores cantidades de DNA. Una de las principales problemáticas que presenta este método es que debe tomarse en cuenta la citotoxicidad del DEAE-dextran (Lopata, Cleveland, & Sollner-Webb, 1984) ya que debido a ella no puede dejarse por mucho tiempo en contacto con las células.

Otro método muy utilizado es el de transfección con lipofectamina. Este método utiliza liposomas como transportadores del material genético. Es un proceso endocítico en el cual los liposomas engloban al DNA y posteriormente logran fusionarse con la membrana lipídica de la célula (López-Heydeck *et al.*, 2009). Por la naturaleza de los componentes empleados en esta técnica, resulta no ser tóxica y posee un alto grado de eficiencia de transfección, además de ser fácilmente utilizada para introducir tanto RNA (RNA de interferencia y mRNA) como DNA en algunos tipos celulares. Se ha demostrado que posee un alto grado de éxito en

transfecciones de células adherentes (Dalby *et al.*, 2003) aunque disminuye cuando se utilizan células en suspensión.

Dentro de los métodos físicos se encuentra la transfección por electroporación. Es una técnica en la que se administran pulsos eléctricos a las células para provocar poros en la membrana por donde logra permear el DNA. Esta metodología puede ser utilizada para la expresión de DNA de manera transitoria o de manera estable, además de poder usarse en un amplio número de líneas celulares diferentes. La eficiencia de transfección se refiere a cuántas células adquieren el DNA con éxito del total de células utilizadas en el ensayo, y depende de varios factores, entre los que se encuentran: 1) magnitud del campo eléctrico aplicado, 2) duración del campo eléctrico, 3) temperatura durante la electroporación, 4) concentración y tipo de DNA y 5) composición iónica del medio de transfección (Ovidio & Portelles, 1997). Una de las principales desventajas es su costo, debido a que el equipo para hacerlo puede llegar a costar miles de dólares (Figura 6) sin dejar de mencionar el costo de reactivos y cubetas de reacción.



Figura 6. Equipo para transfección por electroporación Nucleofector 2b de Lonza.

Otro método físico es el de microinyección de DNA al interior de la célula. Este método consiste en integrar material genético directamente a la célula con ayuda de objetos finos (capilares) y amortiguadores donde se encuentra suspendida la muestra de interés (Shen *et al.*, 1982). La desventaja que involucra esta metodología es que se necesita personal altamente entrenado debido a que el método funciona transfectando una célula a la vez, por lo que no funciona para realizar grandes comparaciones de resultados bioquímicos.

Tabla 1. Métodos de transfección en células de mamíferos				
Método	Utilidad	Costo	Facilidad ^a	Versatilidad ^b
Fosfato de Calcio	Transitoria y estable	+	+	++
DEAE-Dextran	Transitoria	+	+	++
Electroporación	Transitoria y estable	+++	+	+++
Microinyección	Estable	++++	+++	+
Lipofectamina	Transitoria y estable	++	+	+++

^a Facilidad se refiere a la complejidad de la técnica; mayor número de cruces implica mayor complejidad

^b Versatilidad, se refiere a la aplicabilidad de la técnica para distintos tipos de células en cultivo; mayor número de cruces indica mayor versatilidad.
Tomado y modificado de Ovidio & Portelles, 1997.

Existe un método que utiliza virus como vectores de clonación para poder insertar dentro de su genoma el gen deseado y posteriormente transfecarlo dentro de la célula blanco. Aunque este ensayo es ampliamente utilizado para transfectar células y que adquirir de forma estable el gen de interés debido a la naturaleza misma de los virus debido a que pueden insertar su genoma en la célula blanco, existen algunas desventajas entre las cuales destacan el tamaño y la naturaleza viral. Entre los modelos ampliamente utilizados se encuentra el de adenovirus, debido a que puede transfectarse con el células de forma transitoria y de forma estable (González & Vega, 2007)

Planteamiento del problema:

Los neutrófilos son leucocitos que recientemente han sido detectados infiltrando a muchos tipos de tumores. La evidencia clínica y la derivada de modelos animales con cáncer, sugiere que los neutrófilos pueden favorecer el crecimiento tumoral. Sin embargo, desde hace muchos años se sabe que los neutrófilos pueden destruir a algunas células tumorales. Para poder estudiar la capacidad citotóxica de los neutrófilos frente a diferentes tipos de células cancerígenas, se requiere de un método eficiente, rápido y económico. Debido a que el ensayo clásico de citotoxicidad que utiliza radioactividad, y ésta en pruebas de laboratorio ha caído en desuso, debido principalmente a los riesgos de seguridad y a su alto costo, en este trabajo nos hemos planteado la posibilidad de implementar una técnica para medir citotoxicidad, sin usar radioactividad, y que pueda acercarse a la sensibilidad del método radiactivo. Para esto, se planteó utilizar una enzima de fácil detección y alta sensibilidad como marcador de las células blanco. La enzima que se usará es la luciferasa. Esta enzima es la responsable de generar luz en las luciérnagas. El gen de la luciferasa (*luc*) se clonará en un plásmido que pueda ser transfectado a las células de interés. En las células, la luciferasa se expresa y la intensidad de luz que se genera es proporcional al número de células. Entonces, en un ensayo de citotoxicidad, la disminución en la cantidad de luz que se detecte es indicativo de que hay menos células y por tanto mayor actividad citotóxica de las células efectoras, en este caso de los neutrófilos.

Objetivos:

General:

- Obtener un plásmido que pueda conferir a tres líneas celulares de cáncer (HeLa, K562 y THP-1) la capacidad de expresar la enzima luciferasa y al mismo tiempo resistencia al antibiótico G418.

Particulares:

- Realizar tinciones celulares con calceína utilizando como blanco las células THP-1.
- Identificar y optimizar las condiciones de transfección de las líneas celulares tumorales HeLa, THP-1 y K562 usando el equipo Nucleofector™ 2b (Amaza Inc.).
- Obtener el cDNA de la enzima luciferasa (*luc*) a partir de un plásmido comercial
- Clonar el cDNA *luc* en un plásmido de expresión en células eucariontes, que además contenga un gen de resistencia a un antibiótico para poder seleccionar las células.
- Transfectar el plásmido que codifica para la enzima luciferasa y que confiere resistencia al antibiótico G418 en células HeLa, K562 y THP-1.
- Seleccionar las líneas celulares de cáncer HeLa, THP-1 y K562 que expresen de forma estable el plásmido que codifica el gen *luc*.

Hipótesis:

Si el nuevo plásmido puede inducir la expresión de la enzima luciferasa, podrá también conferir resistencia al antibiótico G418, y permitirá al mismo tiempo tener tres líneas celulares de cáncer que expresen de forma estable la enzima luciferasa, entonces la cantidad de luz que se detecte en las células transfectadas será proporcional a la cantidad de células.

Materiales y métodos:

- Células:

La línea celular HeLa (carcinoma epitelial de cérvix humano) fue cultivada en medio DMEM, con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y antibiótico (ampicilina 100 µg/mL). Las líneas celulares THP-1 (monocitos de humano) y K562 (linfoblastos de humano) se cultivaron en medio RPMI, con 10 % de SFB y antibiótico (ampicilina 100 µg/mL) en matraces de 25 cm², a 37 °C y en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂.

- Tinción con calceína:

Las células HeLa fueron despegadas de la base del matraz utilizando 0.25% tripsina con EDTA 5 mM por 2 minutos. Las células se transfirieron dentro de un tubo cónico de 15 mL y fueron centrifugadas por 5 minutos a 1200 rpm, se eliminó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en PBS a razón de 1x10⁶ cel/mL. La suspensión celular fue colocada en un microtubo de polipropileno de 1.5 mL y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos en una microcentrífuga. El sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en 200 µl de PBS con 5 µg/mL de calceína. Las células se incubaron a 37 °C durante 20 minutos con agitaciones suaves cada 5 minutos. Posteriormente, las células teñidas se lavaron tres veces con 1 ml de PBS cada vez y resuspendidas en 200 µL de PBS.

La cantidad de fluorescencia emitida por las células se estimó colocando cantidades diferentes de células realizando los cálculos necesarios para realizar las diluciones necesarias (100, 300, 500, 800, 1x10³, 2.5x10³, 5x10³, 7.5x10³ y 1x10⁴, 2x10⁴, 5x10⁴, 1x10⁵, 2x10⁵, 3x10⁵ y 5x10⁵) en pozos de una placa de 96 pozos y midiendo la fluorescencia con ayuda de un lector de placas (Synergy HT BIOTEK) con un filtro de 490nm de excitación y 520 nm de emisión.

- **Obtención del plásmido con el inserto *luc*:**

Debido a que el plásmido pGL3-control contiene al gen que codifica para la enzima luciferasa pero no posee un gen de resistencia a antibiótico en eucariontes (resistencia a neomicina o G418 como marcador de selección), el fragmento que corresponde al gen *luc* se subclonó en el plásmido pcDNA 3.1/myc-His "A". Para lograr obtener las cantidades adecuadas de los dos plásmidos: pGL3-control (Promega Cat. E1751) y pcDNA 3.1/myc-His "A" (Invitrogen), se realizó en primer lugar la transformación de bacterias *Escherichia coli* de la cepa DH5 α por choque térmico con cada uno de los plásmidos. Posteriormente se obtuvieron grandes cantidades de la bacteria transformada y los plásmidos fueron purificados por MaxiPrep mediante la utilización del kit QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen Cat. 12262).

El plásmido pGL3-control posee el gen *luc* y justo antes de la secuencia *luc* se encuentra el sitio de restricción para la enzima *Hind*III (Promega Cat. R6041) y al final de la secuencia *luc* se encuentra el sitio de restricción para la enzima *Xba*I (Promega Cat. R6181). Por lo tanto, mediante la utilización de estas enzimas de restricción se pudo extraer el fragmento perteneciente al gen *luc*. El plásmido pcDNA 3.1/myc-His "A" posee un gen de resistencia a geneticina por lo que fue utilizado como vector para lograr subclonar en éste el gene *luc*.

- **Digestión de plásmidos:**

La digestión del plásmido pcDNA 3.1/myc-His "A" fue realizada por pasos. En primer lugar, se digirió 10 μ g de DNA con la enzima de restricción *Hind*III. Se colocaron 10 μ g de DNA dentro de un microtubo, se agregaron también 2 μ L de buffer E (Promega Cat.R005) y 10 unidades de la enzima, H₂O MiliQ libre de DNAsas para completar un volumen final de 20 μ L. La mezcla fue incubada a 37°C durante 2 horas. Posteriormente la muestra fue corrida en

un gel de agarosa de bajo punto de fusión y el DNA se purificó con ayuda del Kit *QIAEX II Agarose Gel Extraction* (Qiagen Cat. 20021). El DNA fue resuspendido en un volumen final de 15 μ L. Una vez digerido con la enzima *HindIII*, el plásmido pcDNA 3.1/myc-His "A", se digirió nuevamente ahora agregando 2 μ L de la enzima *XbaI*, a los 15 μ L de la muestra anterior y 2 μ L más de buffer D (Promega Ref. R004A). Posteriormente se incubó la muestra a 37°C durante 2 horas. Al término de la incubación se corrieron las muestras en un gel de agarosa de bajo punto de fusión y las bandas fueron purificadas con ayuda del kit mencionado anteriormente.

Para el caso del plásmido pGL3-control la digestión fue realizada con las enzimas *HindIII* y *XbaI* al mismo tiempo. En un microtubo de 1.5 mL se colocaron 5 μ g de DNA del plásmido pGL3-Control (por duplicado) y se agregaron 2 μ L del buffer MC (Promega Ref. R999A) junto con 1 μ L (10 unidades) de la enzima *HindIII*, 1 μ L (10 unidades) de la enzima *XbaI*, y H₂O MiliQ libre de DNAsas suficiente para obtener un volumen final de 20 μ L. La muestra fue corrida en un gel de agarosa de bajo punto de fusión, se observaron las bandas mediante la utilización de una lámpara UV y posteriormente fueron purificadas con ayuda del kit *QIAEX II Agarose Gel Extraction*.

- **Purificación de los fragmentos obtenidos:**

Después de digerir el plásmido pGL3-Control y el plásmido pcDNA 3.1/myc-His "A" con las enzimas *HindIII* y *XbaI* se procedió a correr en gel de agarosa de bajo punto de fusión. Las bandas que coincidieron con el marcador de tamaño de 1500 pb (pertenecientes al gen *luc*) y de 5,500 pb (pcDNA 3.1/myc-His "A") fueron cortadas con ayuda de una navaja nueva tratando siempre de que fuera del menor tamaño posible y se colocaron dentro de microtubos de polipropileno de 1.5mL. Posteriormente las bandas fueron purificadas con ayuda del Kit *QIAEX II Agarose Gel Extraction* de Qiagen.

Los microtubos donde se colocaron las bandas de DNA en agarosa fueron pesados con y sin ellas, se procedió a agregar 3 volúmenes de buffer QX1 por cada 100 μg de agarosa con DNA (esto es 300 μL de Buffer QX1 por cada 100 μg de agarosa). Después se agregaron 30 μL de QIAEX II homogenizado previamente. La mezcla se incubó a 50°C por 10 minutos resuspendiéndola con vórtex cada 2 minutos. Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 10,000 x g (11,100 rpm en microcentrífuga Eppendorf 5415C) por 30 segundos. El sobrenadante se eliminó y la pastilla fue resuspendida en 500 μL de buffer QX1. El pellet fue lavado 2 veces con 500 μL de buffer PE cada vez. La pastilla se dejó secar durante 30 minutos y se eluyó el DNA con 30 μL de H₂O MiliQ libre de DNAsas incubando los tubos a 50°C durante 5 minutos para el caso de las bandas pertenecientes al plásmido pcDNA 3.1/myc-His "A" y durante 5 minutos a temperatura ambiente para las bandas del fragmento que corresponde al gen *luc*. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 10,000 x g (11,100 rpm Eppendorf 5415C) durante 2 minutos y el sobrenadante, conteniendo el DNA, se transfirió a microtubos de polipropileno estériles y se congeló a -20°C.

- **Ligación del plásmido con el gen *luc*:**

Después de digerir el plásmido pcDNA 3.1/myc-His "A" con ayuda de las enzimas *Xba*I y *Hind*III se procedió a la defosforilación. Se agregó 1 μL de fosfatasa alcalina (1 Unidad/ μL , Roche Cat. 10 713 023 001) a cada tubo con el plásmido digerido y purificado, se incubó a 37°C durante 30 minutos. Después de la incubación se agregó 1 μL más de fosfatasa alcalina y la incubación se prolongó por 30 minutos más. Al término de la defosforilación el gen *luc* fue ligado en el plásmido pcDNA 3.1/myc-His "A".

La ligación se realizó de la siguiente forma (se colocaron muestras por duplicado): en un tubo de polipropileno de 1.5 mL se colocaron 1 μL de la ligasa T4 (1Unidad/ μL , Roche Cat. 10 481 220 001), 1 μL de buffer de ligación

(10x/ μ L Roche Cat. 10063220), 2 μ L del plásmido pcDNA 3.1/myc-His "A" digerido, purificado y defosforilado y 2 μ L del gen *luc* purificado. La muestra se dejó incubando a temperatura constante de 16°C toda la noche (12 – 16 horas). El nuevo plásmido se nombró pcDNA 3.1//*luc*.

- **Transformación de bacterias:**

Las bacterias *E. coli* DH5 α fueron transformadas mediante choque térmico, colocando en un microtubo de 1.5mL 20 μ L de las bacterias (células competentes seleccionadas con cloruro de rubidio) y 1 μ g del plásmido de interés (pcDNA 3.1/myc-His "A", pGL3-Control y pcDNA 3.1//*luc*). Cada uno de los tubos fue mantenido en hielo durante 30 minutos, posteriormente se dio un choque térmico colocando las muestras en baño maría a 42 °C durante 60 segundos. Después, a cada tubo se agregaron 100 μ L de medio LB con ampicilina (100 μ g/mL) y los tubos se colocaron en un agitador a 37 °C y 220 rpm durante 1 hora. Las bacterias transformadas fueron colocadas en una placa de agar-LB con antibiótico (ampicilina 100 μ g/mL) por cada plásmido y se mantuvieron en crecimiento a 37 °C dentro de una incubadora durante 24 horas.

- **Miniprep:**

Una vez que las bacterias transformadas con el plásmido pcDNA 3.1//*luc* crecieron sobre la placa de agar LB, se procedió a tomar las colonias de las placas y se colocaron dentro de un tubo de vidrio para bacterias (por separado) con 5 mL de medio LB con antibiótico (ampicilina 100 μ g/mL). Los tubos se mantuvieron dentro de un agitador a 220rpm y 37°C entre 12 y 16 horas. Al término de la incubación, el DNA se purificó utilizando el kit *Wizard Plus SV MiniPreps DNA purification system* (Promega Cat. 1330), como se describe a continuación:

1.5 mL del cultivo de bacterias se colocó dentro de 1 microtubo de 1.5mL, se centrifugó a $10,000 \times g$ (11,100 rpm Eppendorf 5415 C) durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Después se agregó 250 μL de la solución de resuspensión a la pastilla celular. La muestra se homogenizó colocando los tubos en el vórtex durante algunos segundos, y posteriormente se añadieron 250 μL de la solución de lisis celular. El tubo se mezcló por inversión 4 veces y se incubó a temperatura ambiente por no más de 5 minutos. Después se agregaron 10 μL de la solución de proteasa alcalina y se incubó nuevamente a temperatura ambiente por 5 minutos. Al término de la incubación se agregaron 350 μL de la solución de neutralización, se mezcló por inversión 4 veces y se centrifugó a máxima velocidad durante 10 minutos. Posteriormente el sobrenadante se transfirió por decantación a una de las columnas del kit que se encontraba previamente montada sobre un tubo recolector de 2 mL. El tubo se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante del tubo recolector y se agregó a la columna 750 μL de la solución de lavado, se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto y la columna fue lavada una vez más con 250 μL de solución de lavado. El sobrenadante se descartó y la columna se transfirió a un microtubo de 1.5 mL estéril, se añadieron 30 μL de H_2O Mili Q y se centrifugó a máxima velocidad por 2 minutos para eluir el DNA. El DNA purificado fue congelado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso.

- **Maxiprep:**

Se tomó una colonia de bacterias transformadas para el plásmido pGL3-control, una colonia de las bacterias transformadas con el plásmido pcDNA3.1/myc-His "A", y una colonia de las bacterias transformadas con el plásmido pcDNA 3.1/luc. Cada una se colocó por separado en un tubo para cultivo con 5 mL de medio LB más antibiótico, se mantuvieron dentro de una incubadora a $37\text{ }^\circ\text{C}$ con agitación a 220 rpm durante 4 horas. Pasado éste

tiempo se transfirió a un matraz con 500 mL de medio LB con antibiótico, 37 °C con agitación a 220 rpm durante 12 – 16 horas.

El cultivo con cada uno de los plásmidos se colocó dentro de 2 frascos (250 mL) para centrifuga (Beckman Coulter J2-21) utilizando el rotor JA-14, se centrifugó a 6000 x g (6300 rpm) a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante se eliminó y la pastilla de bacterias se utilizó para purificar el plásmido, usando el kit *QIAfilter Plasmid Maxi Kit* (Qiagen Cat. 12262), como se describe abajo.

El método consiste en lisar las células con ayuda de un buffer, posteriormente colocarlo en un cartucho de filtración para posteriormente colocar el filtrado dentro de otro cartucho de elusión previamente preparado y equilibrado con un buffer.

Al iniciar la técnica se prepararon las columnas, al QIAGEN-tip se agregaron 10 mL de buffer QBT, se dejó que el buffer saliera de la columna por gravedad y se procedió con la lisis celular. La pastilla de bacterias fue resuspendida en 10 mL de buffer P1 (buffer de resuspensión), se añadieron 10 mL de Buffer P2 (buffer de lisis celular) y se mezcló por inversión hasta observar el cambio total de coloración blanco hacia azul y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añadieron después 10 mL del buffer P3 (buffer de neutralización) frío y se mezcló inmediatamente por inversión hasta observar el cambio de coloración a blanco, se tapó la boquilla del *QIAfilter Cartridge* y se colocó el contenido dentro del mismo sin insertar el émbolo. Esto fue incubado a temperatura ambiente por 10 minutos, posteriormente se colocó el embolo al filtro y se vació el contenido dentro del *QIAGEN-tip*, la columna fue lavada 2 veces con 30 mL de buffer QC (buffer de lavado) cada vez. Al término de los 2 lavados se eluyó el DNA con 15 mL de buffer QF (buffer de elusión) en un tubo para centrífuga de 50 mL. Se agregaron 10.5 mL de Isopropanol a temperatura ambiente y se centrifugó a 15,000 x g (11,200 rpm) utilizando el rotor JA-20 en la centrífuga Beckman Coulter J2-21, por 30 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se permitió la

evaporación del alcohol por 2 minutos, se agregaron 200 μ L de H₂O MiliQ libre de DNAsas. Finalmente, el DNA fue cuantificado y congelado a -20°C hasta su uso.

- **Electroforesis de DNA:**

Las muestras digeridas de los plásmidos pGL3-Control y pcDNA 3.1/myc-His "A" fueron corridas en un gel de agarosa 1% en buffer TAE 1X 45 minutos a 75 volts. Posteriormente las bandas de DNA fueron visualizadas en un equipo Odyssey CLx de LI-COR y el software *Image Studio*. Se pudieron comparar las muestras digeridas (DNA linealizado) con las que no (DNA super enrollado).

Cuando las bandas de las muestras fueron observadas de forma lineal se procedió a correr el contenido total de las muestras digeridas en agarosa de bajo punto de fusión 1% en buffer TAE 1X por 45 minutos a 75 volts para posteriormente realizar la purificación con ayuda del *kit QIAEX II Agarose Gel Extraction*.

- **Optimización de la transfección de células con GFP utilizando el Nucleofector 2b (Amaya Inc.):**

En la transfección celular se utilizó el equipo Nucleofector 2b (Amaya Inc.) y la proteína verde fluorescente (GFP: *Green Fluorescent Protein*) para encontrar el programa más adecuado que tuviera el mayor porcentaje de transfección. Para encontrar las condiciones más adecuadas (programas de transfección) en las líneas celulares THP-1 y K562, se colocaron las células suspendidas en medio de cultivo dentro de 1 tubo cónico de centrifuga de 15 mL (para cada línea celular). Las células HeLa fueron desprendidas de la base del matraz agregando 2 mL de 0.25 % tripsina - EDTA al matraz de cultivo. Éste se colocó dentro de la incubadora a 37°C durante 2 minutos, se agregaron después 2 mL de medio DMEM y la suspensión celular se tomó para colocarla en un tubo cónico de centrifuga de 15 mL.

Las células en suspensión fueron contadas en un hemocitómetro y se resuspendieron a razón de 1×10^7 células/mL en 100 μ L de disolución para transfectar (PBS con CaCl_2 1 mM, MgCl_2 1 mM, Hepes 20 mM, KCl 10 mM, glucosa 10 mM, Manitol 25 mM), se colocaron los 100 μ L de la suspensión celular en un tubo de polipropileno estéril de 1.5mL, se agregaron 5 μ g de DNA. La mezcla se colocó dentro de una celda para electroporación y se insertó la celda dentro del equipo Nucleofector 2b, se seleccionaron los programas para cada transfección. Una vez que el equipo transfectó las células, se agregaron 500 μ L de medio de cultivo fresco a la celda, se tomaron las células y se añadieron en uno de los pozos de una placa de cultivo. Al término de las transfecciones la placa fue colocada dentro de una incubadora en condiciones de cultivo.

Las células fueron observadas 24 horas después utilizando el microscopio Olympus IX70, con ayuda de la lámpara fluorescente y el filtro WB. Se tomaron fotografías de las muestras y se contaron las células fluorescentes. Posteriormente se utilizó la siguiente fórmula para dar una aproximación de la eficiencia de transfección:

$$\text{Eficiencia de transfección} = \frac{\text{células fluorescentes}}{\text{células totales por campo}}$$

- **Transfección con el plásmido recombinante pcDNA3.1//uc:**

Las células HeLa, THP-1 y K562 fueron utilizadas para transfectar el plásmido recombinante pcDNA3.1//uc con los programas anteriormente probados. Se tomó un matraz de 25 cm² por cada transfección y se le agregó 2 mL de medio de cultivo fresco, se colocó dentro de una incubadora y se procedió a transfectar las células por duplicado siguiendo la metodología

anteriormente descrita. Para demostrar que la transfección y funcionalidad del plásmido pcDNA 3.1//*luc* fueron exitosas se colocaron como control negativo 1×10^6 células HeLa, THP-1 y K-562 en las mismas condiciones de transfección sin plásmido. Como control positivo se trataron 1×10^6 células de cada línea celular con 5 μ g del plásmido pGL3-control.

Posteriormente después de la transfección, las células fueron mantenidas en condiciones de cultivo durante 24 horas. Una vez pasadas 24 horas, se tomaron las células de uno de los duplicados para realizar un ensayo de luciferasa. A las células correspondientes al otro duplicado se les reemplazó el medio de cultivo con 2 mL de medio fresco que contenía 500 μ g/mL de G418. Las células se mantuvieron en cultivo cambiando el medio cada 3 días hasta el día 14.

- **Ensayos de luciferasa:**

24 horas después de la transfección, en un tubo de polipropileno nuevo de 1.5 mL se colocaron 100,000 células por cada línea celular, después se centrifugaron a $8165 \times g$ (10,000 rpm *Eppendorf centrifuge* 5415c) durante 5 minutos. El sobrenadante se eliminó y se agregaron 50 μ L de buffer de lisis (Trizma Base 25 mM, Tritón X-100 1 %, EDTA 2 mM, DTT 1 mM, pH= 7.8). Las células se incubaron en hielo 10 minutos, después fueron centrifugadas a $16004 \times g$ (14,000 rpm) durante 2 minutos, el sobrenadante se colocó dentro de un tubo para FACS (tubos de polipropileno de 12x75mm). Posteriormente se agregaron 100 μ L de buffer de reacción (ácido nitrilotriacético 30 mM, ATP 3 mM, sulfato de magnesio 15 mM, DTT 10 mM, pH 7.8) y 50 μ L de D-luciferina 250 μ M (pH 6.2-6.7). Inmediatamente después se procedió a medir durante 40 segundos la emisión de luz en un luminómetro Monolight 2010. Los resultados obtenidos por el equipo equivalen a unidades arbitrarias de luz.

- **Conservación de las células transfectadas**

Las células que son transfectadas con el plásmido pcDNA 3.1/luc y que generan buenos resultados en el ensayo de luciferasa se mantendrán en condiciones de cultivo por 20 días. El medio de cultivo para la línea celular HeLa será reemplazado por medio fresco 500 µg/mL de Geneticina, cada 3 días, mientras que para las células THP-1 será reemplazado cada 4 días y para las células K562 cada 5 días.

RESULTADOS:

Detección de células con calceína:

La calceína es un colorante que al ingresar a las células y por acción necesaria de las enzimas esterasas es transformada para poder emitir luz, existen diversas metodologías para saber si una célula blanco ha sido lisada (actividad citotóxica) por acción de células efectoras, entre ellas se encuentra el ensayo de liberación de cromo radioactivo y ensayos en los que se mide la actividad de los genes reporteros, por ello se probó en primer lugar si el método de tinción celular utilizando calceína era lo suficientemente sensible para medir diferencias entre diversas cantidades de células. Células HeLa y K562 se tiñieron con calceína y se colocaron en cantidades crecientes en pozos de una placa de 96-pozos.

La intensidad de fluorescencia emitida por las células se midió con un lector de placas. Entre cero y mil células, la fluorescencia fue aproximadamente la misma (Figura 7). La fluorescencia se detectó a partir de 5,000 células para HeLa y sólo después de 300,000 células para K562 (Figura 7). Esto significa que la fluorescencia emitida por calceína y detectada con el lector de placas, no fue lo suficientemente diferente entre números de células bajos. Los resultados indican que éste método no puede discriminar entre cantidades pequeñas de células, como las empleadas en los ensayos de citotoxicidad mediante la metodología de cromo radiactivo. Por lo que el método de calceína no es adecuada para marcar a las células blanco.

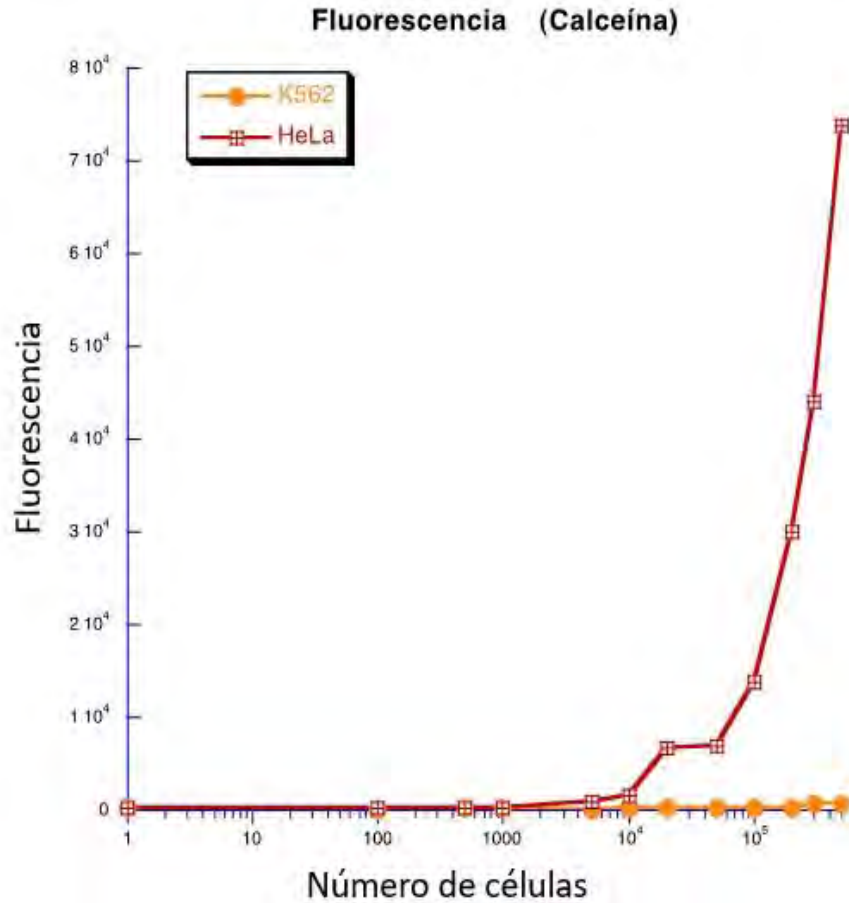


Figura 7. Células HeLa y K562 que fueron teñidas con calceína. Cantidades crecientes de células se colocaron dentro de los huecos de una placa de 96 pozos y la fluorescencia emitida se detectó con un lector de placas.

Dado lo anterior se decidió probar un método enzimático, puesto que en la literatura se ha reportado que una pequeña cantidad de enzima es capaz de catalizar producto y por tanto se puede medir con facilidad.

Para evaluar la señal generada por la enzima luciferasa, se realizó la transfección de células HeLa con el plásmido pGL3-Control, que codifica para la enzima luciferasa. Se utilizaron dos programas O-005 y I-013 del Nucleofector. 24 horas después de la transfección, cantidades crecientes de células se lisaron para medir la actividad de la luciferasa. Observando que existe una señal adecuada de luz a partir de 500 células (Figura 8).

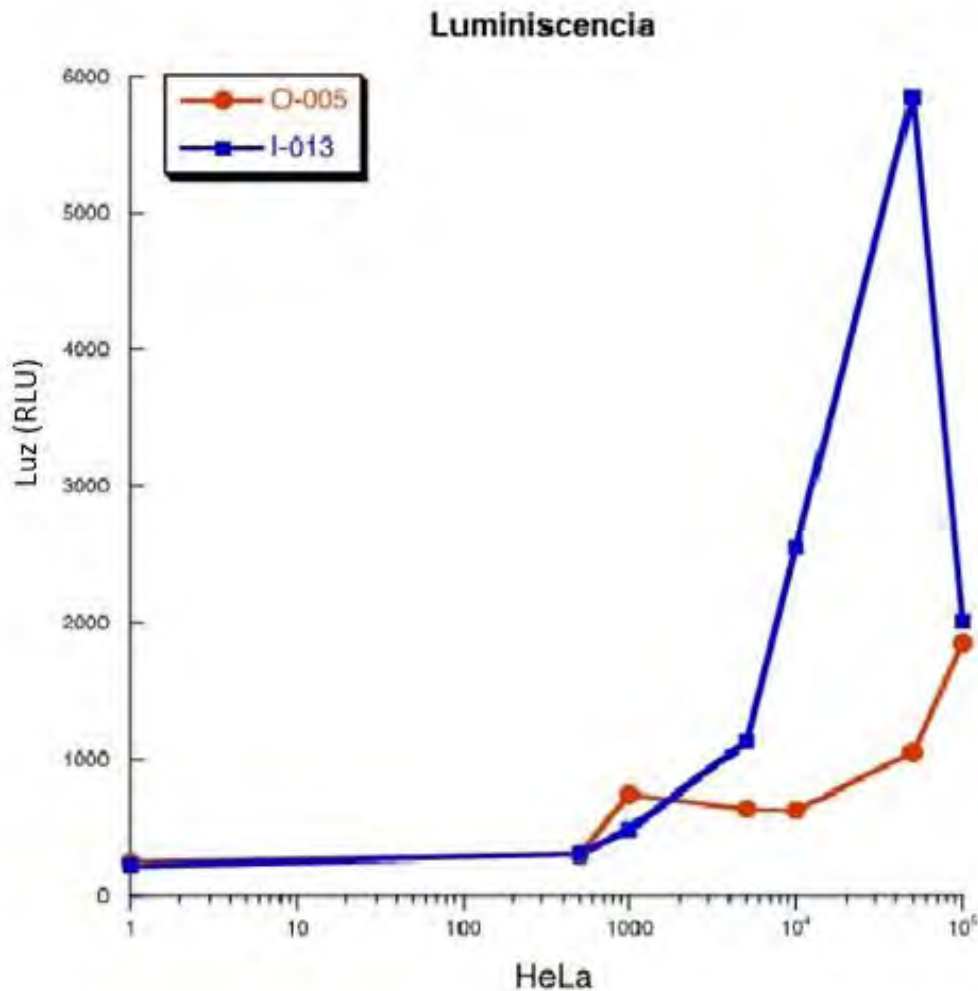


Figura 8. Células HeLa transfectadas con el plásmido pGL3-Control utilizando los programas O-005 y I-013 del Nucleofector. Cantidades crecientes de células se usaron para medir la actividad de luciferasa. La cantidad de luz se reporta en unidades relativas de luz (RLU: *relative light units*).

Cuando se realiza un ensayo de transfección, no todas las células adquieren el plásmido. La eficiencia de transfección se refiere al número de células a las que puede introducirse el plásmido. Para estimar la eficiencia, se repitió la transfección utilizando los mismos programas del Nucleofector, pero ahora utilizando un plásmido que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP). Las células que incorporen el plásmido y que sinteticen la proteína ahora se harán visibles mediante la utilización de un microscopio de fluorescencia. Al colocar las células transfectadas

y que expresan GFP al microscopio se pudo observar que la cantidad de células fluorescentes era extremadamente baja (Figura 9).

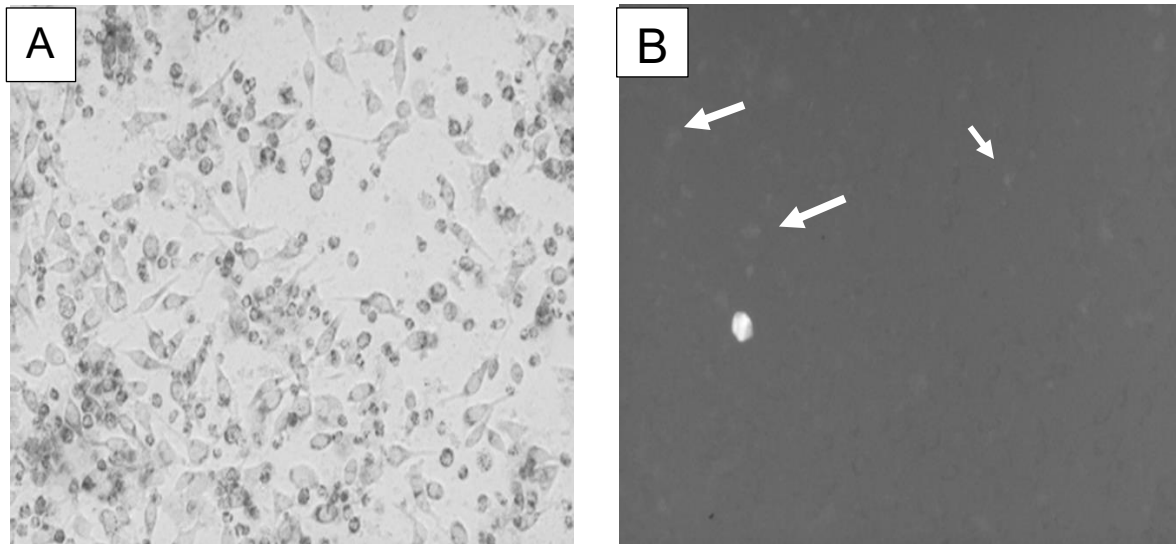


Figura 9. Células HeLa transfectadas con el programa I-013 y que expresan GFP. Las células se observaron en A) campo claro y en B) fluorescencia 24 horas después de la transfección.

La eficiencia de transfección resultó menor del 1 %. Aún con esta eficiencia de transfección tan baja, se obtuvo una señal adecuada al medir la luciferasa. Esto significa que la señal que detectamos en 500 células en realidad provenía de unas 5 células expresando el gen *luc*. Por tanto, las células blanco que expresan luciferasa sí pueden ser usadas en un ensayo de citotoxicidad. Entonces, nos dedicamos a preparar un plásmido que codificara para el gen *luc* y al mismo tiempo un gen de resistencia, lo que permitiría seleccionar sólo a aquellas células positivas para el plásmido. Al mismo tiempo se buscó mejorar la eficiencia de la transfección probando otros programas del Nucleofector.

Construcción del plásmido pcDNA3/*luc*:

Para construir el plásmido con el gen *luc* y resistencia a neomicina, se usaron los plásmidos pGL3-Control, que codifica para luciferasa y pcDNA 3.1/myc-His "A", que es plásmido con el gen de resistencia al antibiótico geneticina y un sitio de clonación

múltiple donde se puede insertar el gen *luc*. Cada uno de estos plásmidos se transformó en bacterias de *E. coli* DH5- α competentes (Figura 10) y a partir de ellas los plásmidos se purificaron en grandes cantidades usando un ensayo de maxiprep.

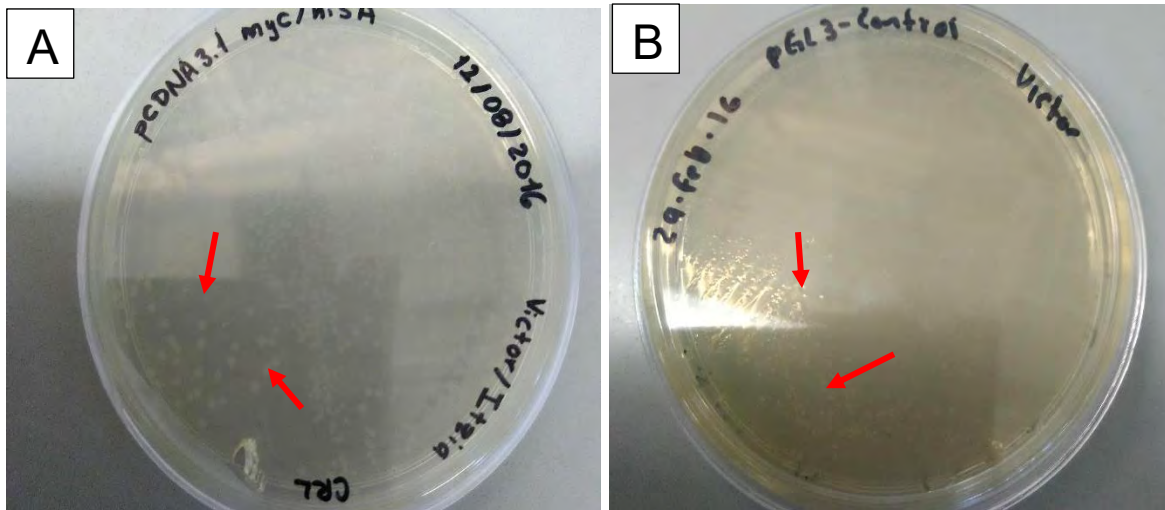


Figura 10. Bacterias de *E. coli* DH5 α transformadas con A) pcDNA 3.1/myc-His "A" o con B) pGL3-Control.

El DNA obtenido se utilizó para realizaron las digestiones de restricción de ambos plásmidos. El plásmido pGL3-Control, digerido con las enzimas *Hind*III y *Xba*I liberó un fragmento aproximado de 1700 pb correspondiente al gen de luciferasa *luc* (Figura 11).

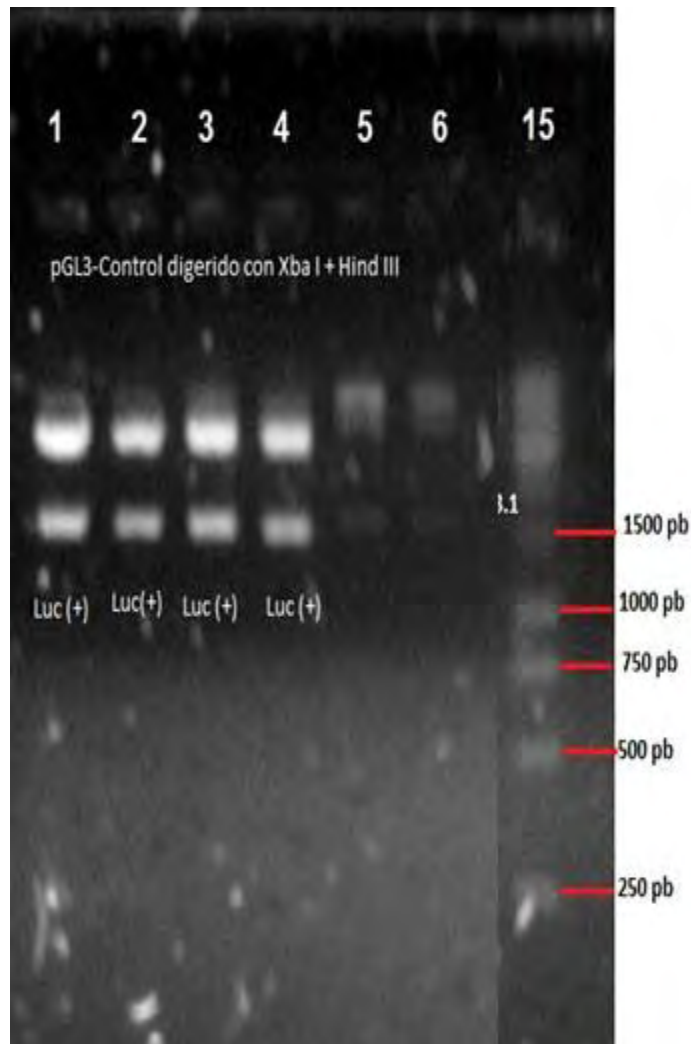


Figura 11. Plásmido pGL3-Control. En los pozos 1,2,3 y 4 se observa el plásmido pGL3-Control digerido con las enzimas *HindIII* y *XbaI*, puede observarse en cada uno de éstos pozos una banda que corresponde al gen *luc* que se encuentra cercano a los 1,500 pb de acuerdo al marcador de tamaño utilizado en el pozo 15.

El plásmido pcDNA 3.1/myc-His "A" también fue digerido con las dos enzimas *HindIII* y *XbaI* (Figura 12). El plásmido digerido se ve linearizado en un gel de agarosa con un tamaño de 5.5 kpb. El fragmento del gen *luc* y el plásmido pcDNA 3.1/myc-His "A" digerido fueron purificados como para realizar posteriormente la ligación del fragmento que codifica para el gen *luc* dentro del plásmido pcDNA 3.1/myc-His "A".

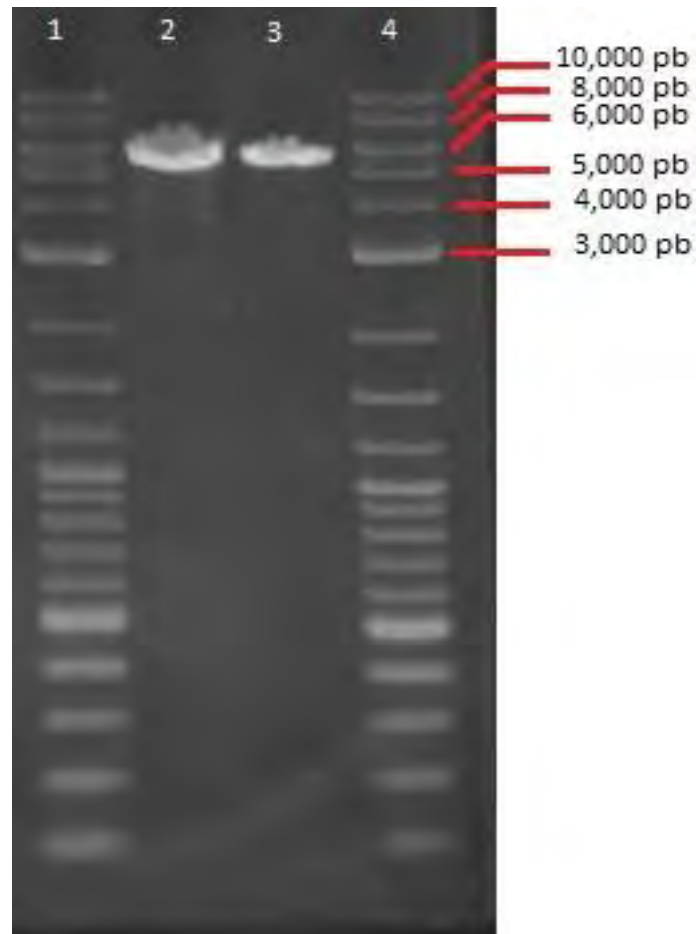


Figura 12. Doble digestión del plásmido pcDNA 3.1/myc-His “A” con las enzimas *Hind*III y *Xba*I. En los pozos 1 y 4 se observa el marcador de tamaño, mientras que en los pozos 2 y 3 puede apreciarse el plásmido pcDNA 3.1/myc-His “A” digerido.

Obtención del plásmido con el inserto del gen *luc*:

El fragmento del plásmido correspondiente al gen *luc* y el plásmido pcDNA 3.1/myc-His “A” digeridos y purificados se mezclaron en varias proporciones moleculares 1:3, 1:5 y 1:9 de vector:inserto. El producto de la ligación se transformó en bacterias y se cultivaron por 24 h. La proporción 1:9 fue la única en funcionar ya que en la placa donde se colocaron bacterias con ésta proporción pudieron apreciarse algunas colonias de bacterianas. Se tomaron algunas colonias de bacterias y se pusieron a crecer para después purificar el plásmido por miniprep.

Después de obtener el DNA del plásmido pcDNA 3.1/luc, éste fue digerido sólo con una enzima de restricción (*Hind*III) para linearizarlo. El plásmido procedente de las colonias 1 y 2 mostró un tamaño similar al del plásmido pcDNA 3.1/myc-His "A" (Figura 13). En cambio, el plásmido proveniente de las colonias 3 y 4 mostró un tamaño más grande que el del plásmido pcDNA 3.1/myc-His "A" (Figura 13). El plásmido de estas colonias tiene un tamaño cercano a 8000 pb, lo cual indica que el fragmento perteneciente al gen *luc* fue ligado exitosamente dentro del plásmido pcDNA 3.1/myc-His "A". Este nuevo plásmido se nombró pcDNA 3.1/luc (Figura 14).



Figura 13. DNA de colonias aisladas de bacterias *E. coli* DH5 α transformadas con el producto de la ligación fueron crecidas y el plásmido correspondiente purificado por Miniprep. El DNA correspondiente al plásmido de cuatro colonias (carriles 3, 4, 5 y 6) fue digerido con *Hind*III para linearizarlo y corrido en un gel de agarosa. El plásmido pcDNA3.1/myc His linearizado (carril 2) se corrió en el mismo gel.

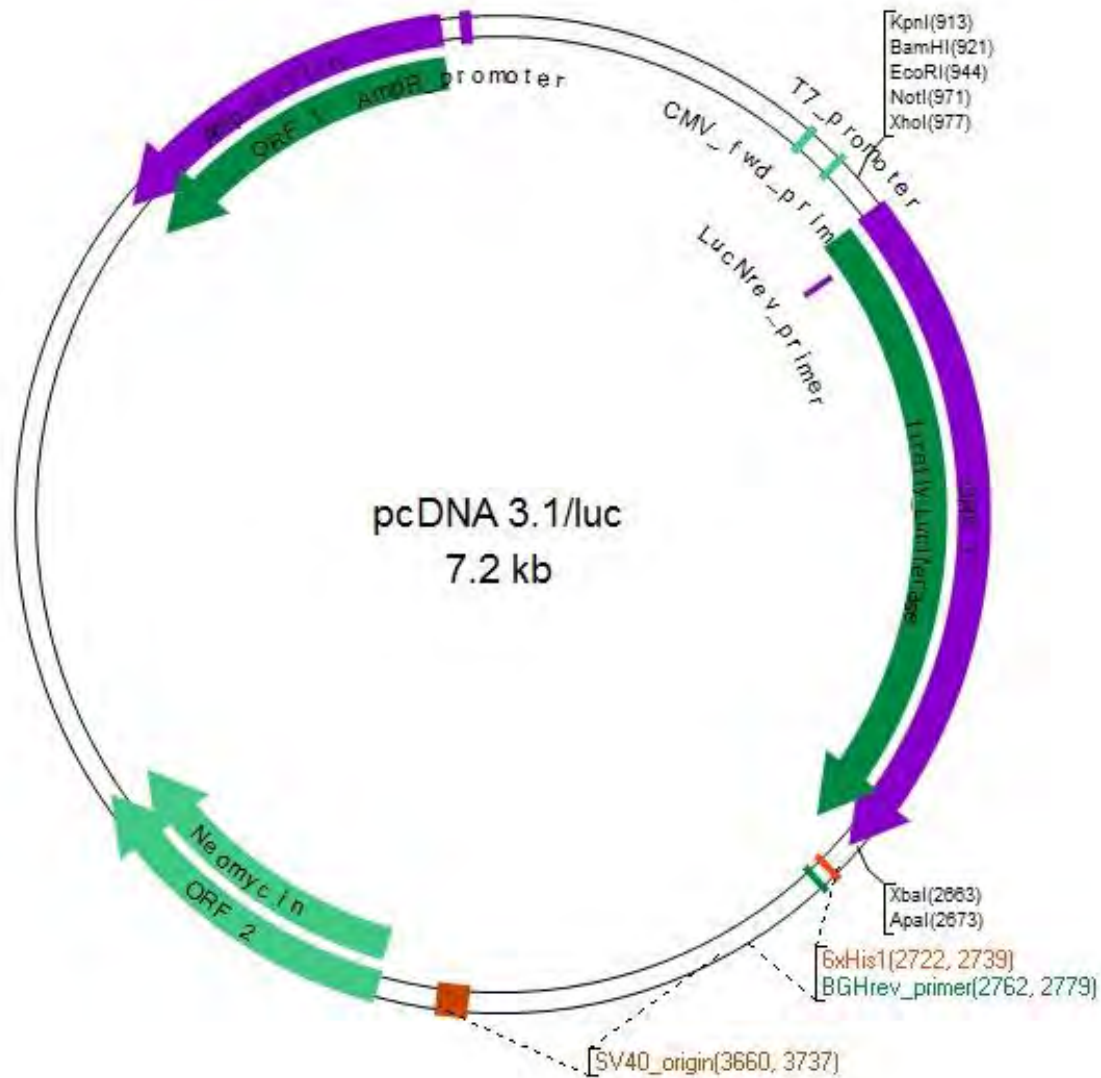


Figura 14. Mapa del plásmido pcDNA 3.1/luc (7.2 kb)

Comprobación de ligación por ensayo de restricción:

Con el propósito de confirmar que el nuevo plásmido efectivamente contenía el fragmento *luc*, el plásmido pcDNA 3.1/luc se digirió con las dos enzimas de restricción *XbaI* y *HindIII*. Esto generó dos bandas de DNA, una de un tamaño cercano a 5000 pb y la otra de un tamaño aproximado a 1500 pb. La banda de

mayor tamaño corresponde al plásmido vacío original y la banda de menor tamaño es el fragmento con el cDNA de luc (Figura 15). Lo anterior muestra que el fragmento luc fue ligado exitosamente al plásmido pcDNA 3.1/myc-His "A".

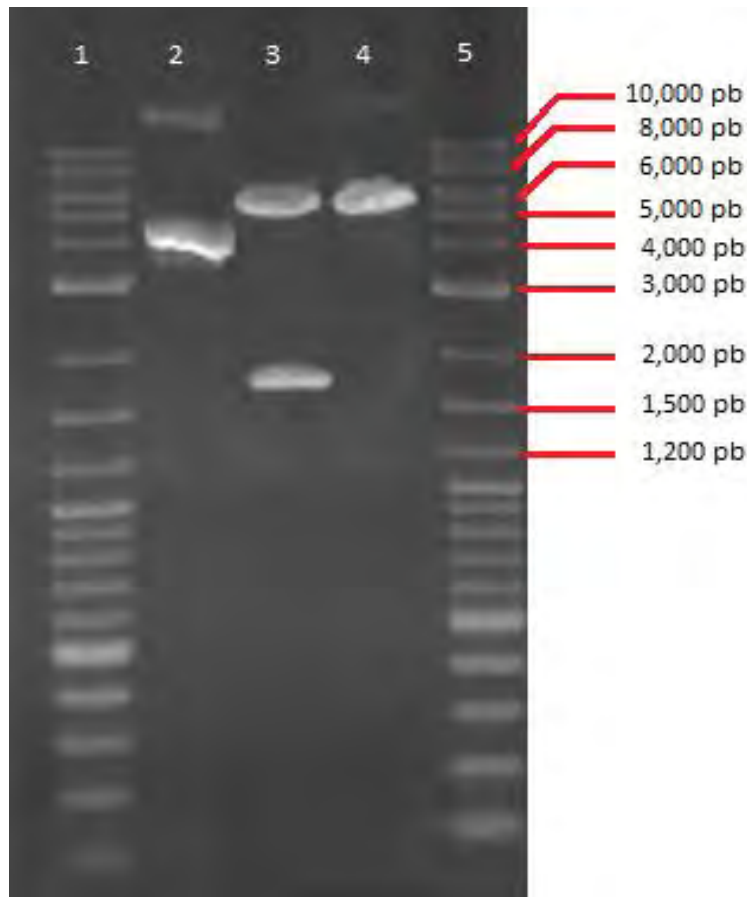


Figura 15. Digestión del nuevo plásmido pcDNA3/*luc*. El plásmido pcDNA 3.1/myc-His "A" sin digerir (carril 2), o digerido sólo con la enzima *Xba*I para linearizarlo (carril 4) y el plásmido pcDNA 3.1/*luc* digerido con las enzimas *Xba*I y *Hind*III (carril 3) se separaron por electroforesis en gel de agarosa. Los marcadores de tamaño están en los carriles 1 y 5.

Optimización del método de transfección:

Como se mencionó previamente, la eficiencia de transfección de las células fue muy baja, cuando mucho 1 % para las células HeLa (Figura 16), las células K562 (Figura 17) y las células THP-1 (Figura 18). Para poder obtener una mayor eficiencia de transfección, se probaron múltiples programas sugeridos por el fabricante, en el

Nucleofector. Para poder estimar la eficiencia rápidamente, nuevamente se utilizó un plásmido que codifica para la GFP.

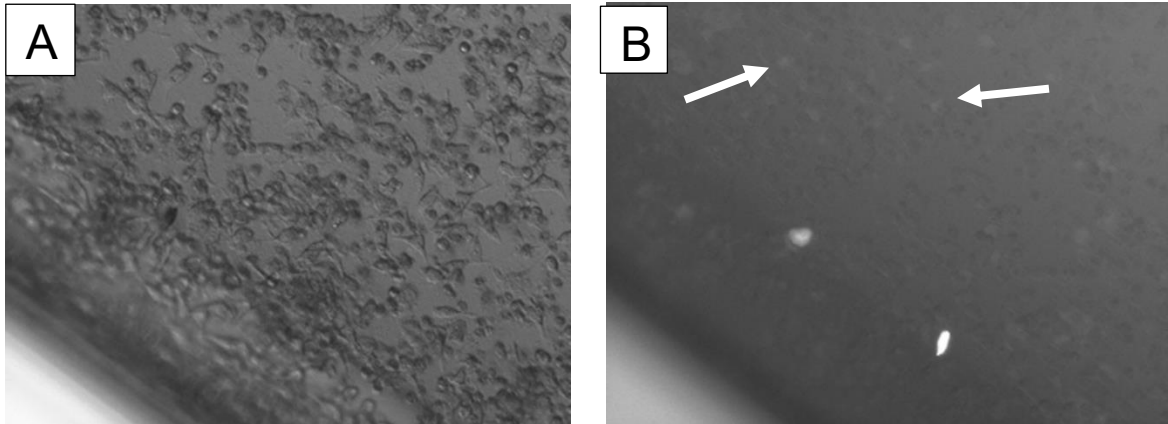


Figura 16. Células HeLa transfectadas con 5 μg de plásmido GFP y el programa I-013 del Nucleofector. Las células se observan al microscopio en A) campo claro y en B) fluorescencia, 24 h después de la transfección.

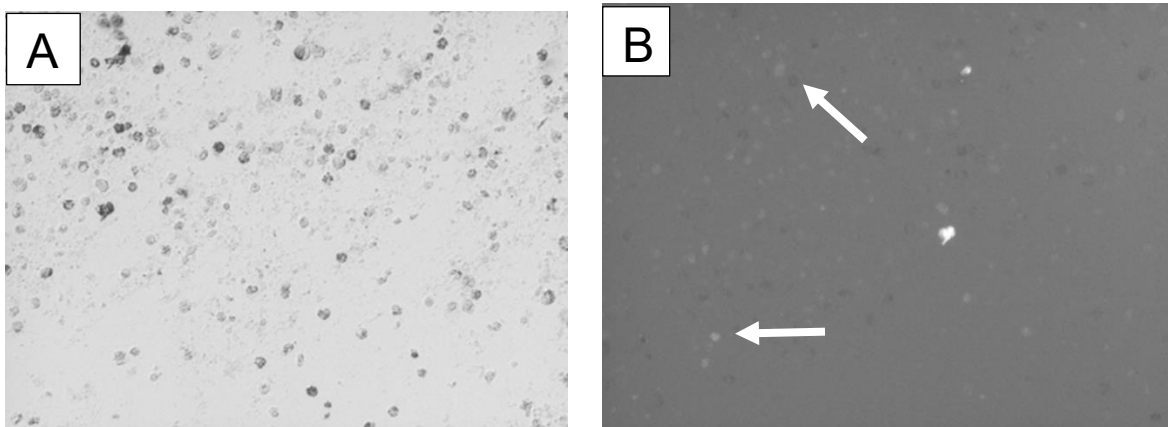


Figura 17. Células K562 transfectadas con 5 μg de plásmido GFP y el programa T-003 del Nucleofector. Las células se observan al microscopio en A) campo claro y en B) fluorescencia, 24 h después de la transfección.

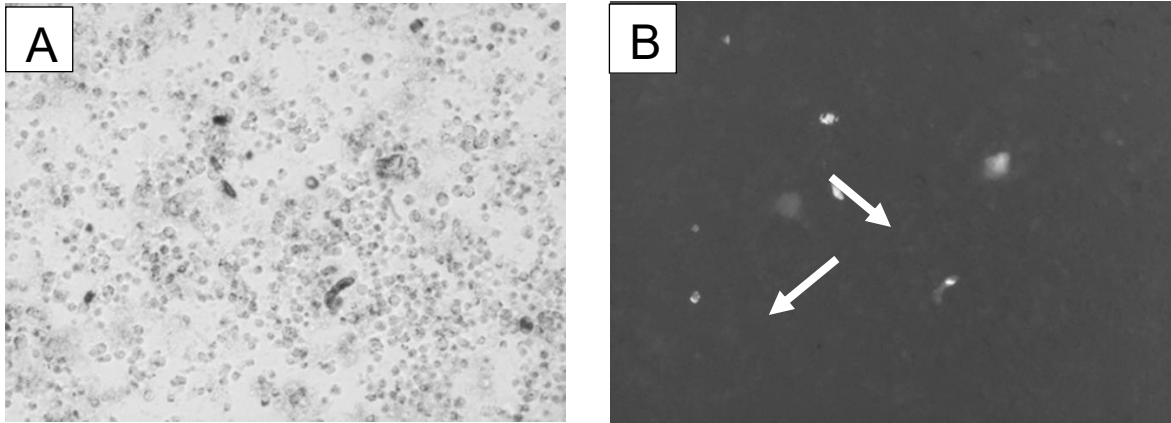


Figura 18. Células THP-1 transfectadas con 5 μ g de plásmido GFP y el programa Y-001 del Nucleofector. Las células se observan al microscopio en A) campo claro y en B) fluorescencia, 24 h después de la transfección.

Para la línea celular HeLa se utilizaron 8 programas: I-013, U-030, A-024, X-001, U-023, U-013, P-022, T-024. El programa U-023 dio la mejor eficiencia de transfección, 8 % (Figura 19). Igualmente, para la línea celular THP-1 se utilizaron 16 programas: V-001, Y-001, T-020, T-001, O-017, T-005, T-016, U-015, S-004, U-002, U-020, O-020, C-005, U-016, A-030, Y-010. El programa T-020 dio la mejor eficiencia de transfección, 9 % (Figura 20). Para la línea celular K562 sólo se utilizó el programa T-003.

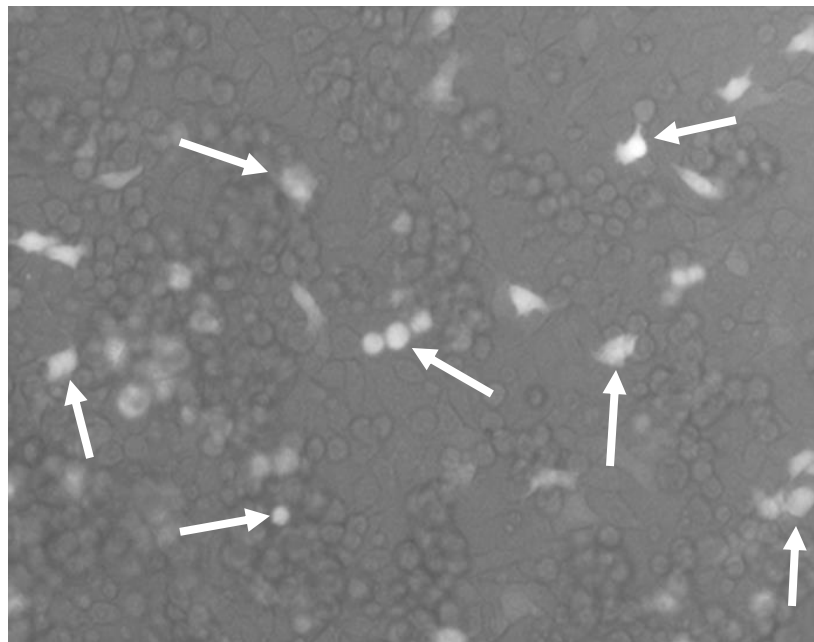


Figura 19. Células HeLa transfectadas con GFP utilizando el programa U-023 del Nucleofector. Las células se observaron al microscopio fluorescente 24 h después de la transfección. Las células que adquirieron el plásmido fluorescen y se ven blancas en la fotografía y las células no transfectadas se ven grises (células no fluorescentes).

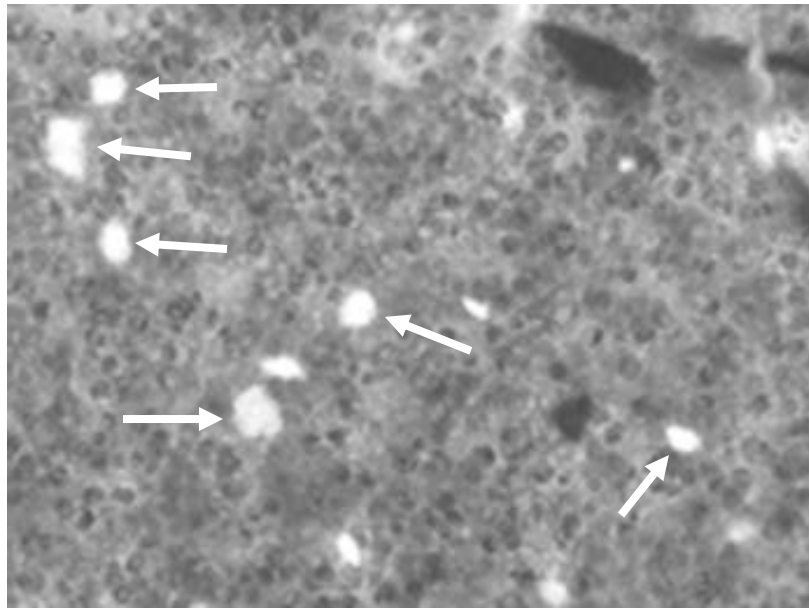


Figura 20. Células THP-1 transfectadas con GFP utilizando el programa T-020 del Nucleofector. Las células se observaron al microscopio fluorescente 24 h después de la transfección. Las células que adquirieron el plásmido fluorescen y se ven blancas en la fotografía y las células no transfectadas se ven grises (células no fluorescentes).

Transfección de las células con el plásmido pcDNA 3.1//*luc*:

Después de encontrar los programas del Nucleofector que permiten una mejor eficiencia de transfección, se procedió a realizar transfecciones de las líneas celulares utilizando el plásmido pcDNA 3.1//*luc*.

Las células THP-1 y HeLa se transfectaron con 5 µg del mismo del plásmido pcDNA 3.1//*luc* y después de 24 horas, se tomaron 50,000 células para medir la luciferasa.

En células que no recibieron el plásmido la intensidad de luz fue menor a 200 unidades relativas de luz (Figura 21). En cambio, las células transfectadas con el plásmido dieron una señal muy fuerte de luz (Figura 21).

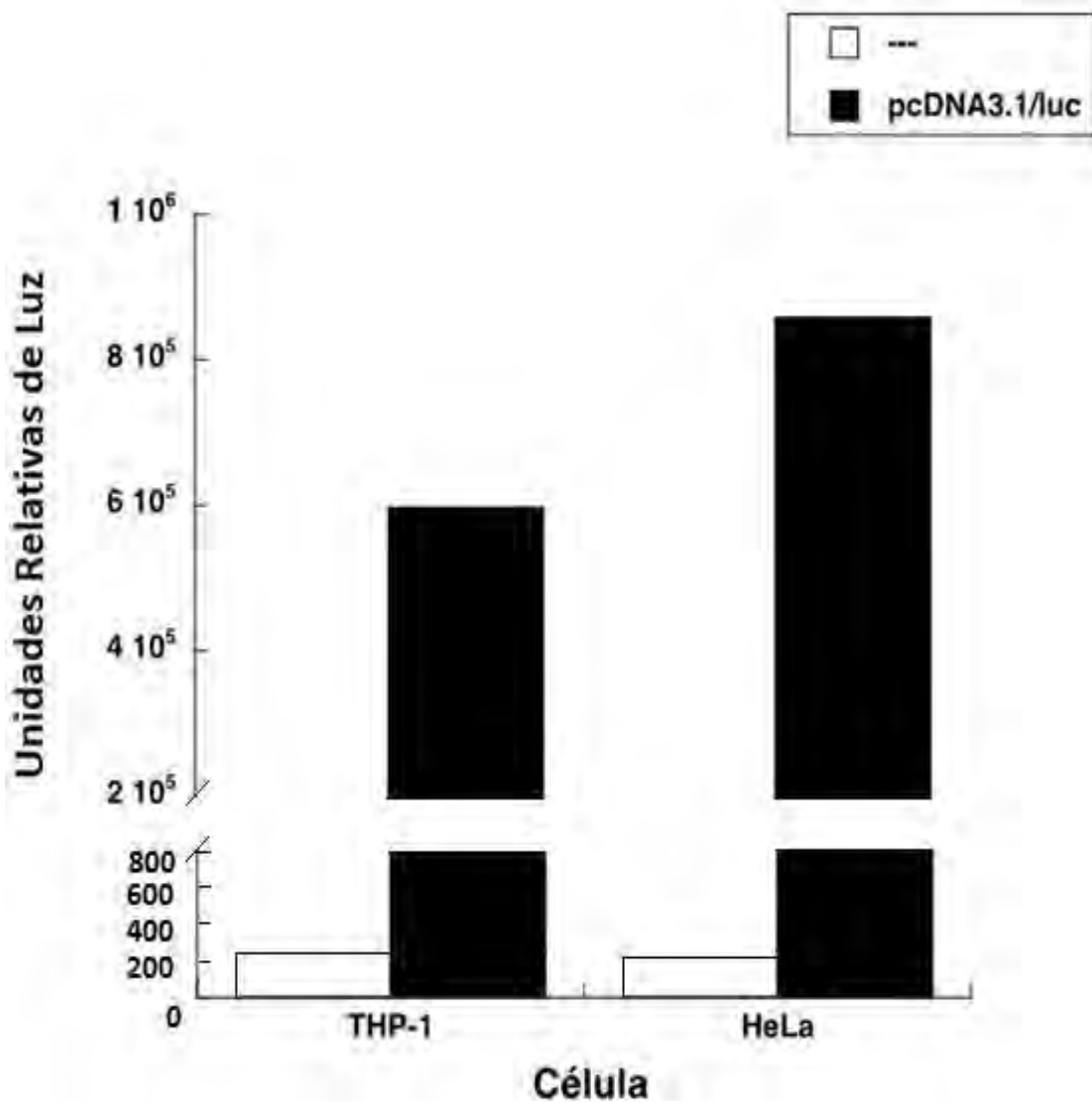


Figura 21. Resultados de un ensayo de luciferasa, utilizando células THP-1 y HeLa transfectadas por separado con el plásmido pcDNA 3.1//uc. Después de la transfección las células se cultivaron por 24 horas y la actividad de luciferasa se midió en 50,000 células.

Debido a que no todas las células son transfectadas, la señal de luciferasa en realidad proviene de sólo una fracción de las células. Tomando en cuenta que la eficiencia de transfección es de 8 % para células HeLa y de 9 % para células THP-1, la señal de luciferasa que se detectó en realidad proviene de unas 4000 células. Entonces cuatro células darán una señal que es cuatro o cinco veces más grande que la basal. Por tanto, las células marcadas con luciferasa pueden ser detectadas con facilidad en pequeños números, como los que se requieren en un ensayo de citotoxicidad.

Obtención de líneas celulares que expresen constitutivamente luciferasa:

Las células HeLa, THP-1 y K562 fueron transfectadas con el plásmido pcDNA 3.1/luc, utilizando los programas del Nucleofector seleccionados y mencionados anteriormente. Las células fueron mantenidas en cultivo y en presencia del antibiótico G418. Estas células se encuentran ahora en cultivo celular. Las células que sobreviven al antibiótico son las positivas para la expresión del gen de resistencia y también positivas para la expresión de la luciferasa. Cuando todas las células en cultivo sean positivas para luciferasa, éstas se guardarán en congelación y podrán usarse para los ensayos de citotoxicidad.

Discusión:

Las técnicas desarrolladas en décadas pasadas para medir citotoxicidad celular están perdiendo poco a poco su utilidad a pesar de que en su momento fueron muy usadas en distintas áreas de la investigación. El desuso obedece al elevado costo del material radiactivo y a la falta de equipo en muchos laboratorios para poder detectar la radioactividad.

El método planteado durante éste trabajo resuelve el problema de utilizar equipo y material radioactivo en ensayos de citotoxicidad. Las células blanco se pueden marcar con la expresión de una enzima de fácil medición y que proporcione señales fuertes, aún con números pequeños de células. La enzima que se seleccionó es la luciferasa. Esta enzima es la que produce luz en las luciérnagas, cuando actúa sobre su sustrato la luciferina (McCutcheon *et al.*, 2015; de Wet *et al.*, 1987). El gen de la luciferasa (*luc*) se ha clonado y se puede expresar en células eucariontes con facilidad. La actividad de la luciferasa se puede medir detectando la cantidad de luz que se genera al reducir a la luciferina, el sustrato de la enzima luciferasa. Debido a que se trata de un método enzimático y el producto de la reacción, puede medirse en cantidades muy pequeñas, la sensibilidad del método aumenta y puede llegar a ser comparable a la que se tiene con el método que utiliza cromo radioactivo. Además, el gen de la enzima luciferasa puede transfectarse en diferentes líneas celulares, dando versatilidad al ensayo de citotoxicidad.

El primer paso en este trabajo fue la construcción de un nuevo plásmido que contiene el gen *luc* y también un gen de resistencia a neomicina, para poder seleccionar posteriormente en cultivo a las células transfectadas. El gen *luc* se obtuvo de un plásmido comercial pGL3-Control que dirige la expresión del gen *luc*, pero que no contiene un gen de resistencia. El gen *luc* se clonó entonces en el plásmido pcDNA 3.1/myc-His que contiene el gen de neomicina y además un sitio de clonación múltiple donde éste se pudo insertar fácilmente. El nuevo plásmido denominado pcDNA3.1/*luc*, permite eficientemente expresar luciferasa en las células transfectadas.

Durante éste trabajo se utilizó la técnica de transfección por electroporación con el equipo Nucleofector para introducir el plásmido pcDNA3.1/-luc en diferentes líneas celulares de cáncer. Este método de transfección resulta en un mayor porcentaje de células transfectadas cuando se trata de líneas celulares que crecen en suspensión. Existen metodologías que no utilizan corriente eléctrica para poder introducir material genético exógeno a la célula. Sin embargo, el equipo Nucleofector tiene un alto índice de éxito en diversas líneas celulares, tanto para células que crecen en suspensión como para células que crecen adheridas al sustrato.

Para encontrar el programa del equipo Nucleofector que diera la mejor eficiencia de transfección, se utilizó un plásmido que dirige la expresión de la proteína verde fluorescente. De esta forma las células positivas pueden verse y cuantificarse fácilmente con un microscopio de fluorescencia. De este modo se seleccionaron los programas que dieron una eficiencia de transfección cercana al 10 %. Con estos programas se transfectaron las células THP-1 (leucemia monocítica, que crece en suspensión) y HeLa (carcinoma epitelial, que crece adherida) con el nuevo plásmido pcDNA3.1/luc. En estas condiciones se encontró que 50,000 células transfectadas dieron una señal muy alta de luz (entre 600,000 y 800,000 unidades relativas de luz). Considerando que sólo el 10 % de las células fueron transfectadas, esto quiere decir que 5 células dan una señal de tres a cuatro veces sobre el valor basal del ensayo (200 unidades de luz). Por tanto, la sensibilidad del método es muy buena.

Para poder implementar el ensayo de citotoxicidad se requiere que todas las células expresen la luciferasa. Esto se logrará, seleccionando sólo a las células positivas. Ya que el plásmido pcDNA3.1/luc también confiere resistencia al antibiótico G418, las células en cultivo serán todas positivas a la expresión de la luciferasa. Las células transfectadas se encuentran ahora en cultivo en presencia del antibiotico G418. En cuanto se logre establecer la línea celular que establemente exprese la luciferasa, se podrá implementar el ensayo de citotoxicidad usando números pequeños de

células blanco. Los resultados de esta tesis indican que fácilmente se podrán detectar hasta un mínimo de cinco células por ensayo. Cabe mencionar que en las células K562 solo se utilizó un programa de transfección debido a problemas durante el cultivo de ésta línea celular por lo que podría existir un programa distinto al mencionado en la metodología que funcione con un porcentaje aceptable de eficiencia utilizando el mismo buffer de transfección que en las células K562 y THP-1.

Conclusiones:

El plásmido obtenido en este trabajo puede ser utilizado para transfectar al menos tres líneas celulares sin embargo, de encontrarse los programas adecuados no puede descartarse la posibilidad de que pueda hacerse en un amplio número de líneas diferentes, se demostró también que funciona debido a que mostró ser eficiente al medir la emisión de luz por parte de células que expresan esta enzima.

Se construyó exitosamente un plásmido (pCDNA3.1//*luc*) capaz de expresar luciferasa y contener genes de resistencia para antibióticos en bacterias y líneas celulares neoplásicas. Se pudo observar que al medir la luz que emiten las células transfectadas con el plásmido pcDNA 3.1//*luc*.

Los programas encontrados para las líneas celulares mostraron tener una eficiencia aceptable, debido a que el plásmido posee un gen de resistencia al antibiótico y las células que resultan ser positivas a la transfección pueden recuperarse y proliferar en el medio de cultivo con ese antibiótico.

El empleo del equipo Nucleofector fue efectivo para transfectar las líneas celulares de leucemia (THP-1) y cáncer de mama (HeLa), la transfección con éste equipo mostró una eficiencia aceptable (aproximadamente del 10%), es factible optimizar esta eficiencia.

Las células blanco se pueden marcar con la expresión de una enzima de fácil medición y que proporcione señales fuertes, aún con números pequeños de células. Las células transfectadas expresaron el gen *luc* y se pudo cuantificar la emisión de luminiscencia.

Bibliografía

- Arce, C., Bargalló, E., Villaseñor, Y., Gamboa, C., & Lara, F. (2011). Oncogúia. Cáncer de mama. *Cancerología* 6, 77-86.
- Auwerx, J. (1991). The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* , 22-31.
- Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 657-670.
- Cham, B., Gerrard, B., & Bainton, D. (1994). Granulophysin is located in the membrane of azurophilic granules in human neutrophils and mobilizes to the plasma membrane following cell stimulation. *American Journal of Pathology*, 1369-1380.
- Chanput , W., Mes , J., & Wichers , H. (2014). THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*, 37-45.
- Cooper, G. (2000). *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition*. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P., & Maas, W. (1988). Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiological Reviews*, 375-395.
- Dalby , B., Cates , S., Harris , A., Ohki , E., Tilkins , M., Price , P., & Ciccarone , V. (2004). Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* , 95-103.
- de Wet , J., Wood , K., DeLuca , M., Helinski , D., & Subramani , S. (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*, 725-737.

- Doeing, D., Borowicz, J., & Crockett, E. (2003). Gender dimorphism in differential peripheral blood leucocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. *BioMed Central Clinical Pathology*, 3.
- Epstein, M. (1961). Some unusual features of fine structure observed in HeLa cells. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 153-162.
- Faurschou, M., & Borregard, N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*, 1317-1327.
- Franke, W., & Scheer, U. (1971). Some structural differentiations in the HeLa cell: heavy bodies, annulate lamellae, and coarse de maillet endoplasmic reticulum. *CYTOBIOLOGIE*, 317-329.
- Genin, M., Clement, F., Fattaccioli, A., Raes, M., & Michiels, C. (2015). M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BioMed Central Cancer*, 577.
- Gertner-dardenne, J. (2012). Standard 4-hours Chromium-51 (51Cr) Release Assay. *Bio-protocol*, e301.
- Gey, G., Coffman, W., & Kubicek, M. (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research*, 264–265.
- González, M., & Vega, A. (2007). ¿Cómo superar la membrana celular? *Revista de Salud Animal*, 8-20.
- Gregory, A., & Houghton, A. (2011). Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cáncer Research*, 2411-2416.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 646-674.

- Hsu , S., Schacter , B., Delaney , N., Miller , T., McKusick , V., Kennett , R., . . . Bodmer , W. (1976). Genetic characteristics of the HeLa cells. *Science*, 392-394.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía, E. (2015). *Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama (19 de octubre)*. Obtenido de <http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/mama0.pdf>
- Karimi, M., Lee, E., Bachman, M., Salicioni, A., Behrens, E., Kambayashi, T., & Baldwin, C. (2014). Measuring Cytotoxicity by Bioluminescence Imaging Outperforms the Standard Chromium-51 Release Assay. *PLoS ONE*, e89357.
- Kjeldsen, L., Bainton, D., Sengelov, H., & Borregard, N. (1993). Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils: identification of a distinct gelatinase-containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation. *Blood*, 3183-3191.
- Koeffler, H., & Golde , D. (1980). Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood*, 344-350.
- Kolaczkowska, E., & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Immunology*, 159-175.
- Koretzky , G. (2007). The legacy of the Philadelphia chromosome. *Journal of Clinical Investigation*, 2030-2032.
- Liu, A., New, D., Lo, R., & Wong, Y. (2009). Reporter Gene Assays. En P. Clemons, N. Tolliday, & B. Wa, *Cell-Based Assays for High-Throughput Screening* (págs. 109-123). Springer Protocols.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology*, 4th edition. New York City: MacMillan.

- Lopata, M., Cleveland , D., & Sollner-Webb, S. (1984). High level transient expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment. *Nucleic Acids Research*, 5707-5717.
- López–Heydeck, S., Cajero–Juárez, Alonso–Morales, R., Martínez–Castañeda, J., Robles–González, J., Barbabosa–Pliego, A., & Vázquez–Chagoyán, J. (2009). La lipofección incrementa la eficiencia de mutagénesis dirigida en células troncoembrionarias de ratón E14 TG2a. *Veterinaria México*, 85-93.
- Lucey, B., Nelson-Rees , W., & Hutchins , G. (2009). Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 1463-1467.
- McCutcheon, D., Porterfield, W., & Prescher , J. (2015). Rapid and scalable assembly of firefly luciferase substrates. *Organic Biomolecular Chemistry*, 2117-2121.
- McDonald , G., Paul, J., & Cruickshank, B. (1991). *Atlas de Hematología* . Panamericana.
- McMillin, D., Delmore , J., Negri, J., Vanneman, M., Koyama , S., Schlossman, R., . . . Mitsiades, C. (2012). Compartment-Specific Bioluminescence Imaging platform for the high-throughput evaluation of antitumor immune function. *Blood*, e131-138.
- National Cancer Institute . (27 de Marzo de 2017). *U.S. National Library of Medicine*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0015630/>
- Nelson, D., Kurman, C., & Serbousek, D. (2001). 51Cr Release Assay of Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC). *Current Protocols in Immunology*, 7.27.1–7.27.8.

- Neri, S., Mariani, E., Meneghetti, A., & Cattini, L. (2011). Calcein-Acetyoxymethyl Cytotoxicity Assay: Standardization of a Method Allowing Additional Analyses on Recovered Effector Cells and Supernatants. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1131–1135.
- New England Biolabs. (5 de Diciembre de 2016). *Types of Restriction Endonucleases*. Obtenido de New England Biolabs: <https://www.neb.com/products/restriction-endonucleases/restriction-endonucleases/types-of-restriction-endonucleases?device=pdf>
- Osti, F., Corradini, F., Hanau, S., Matteuzzi, M., & Gambari, R. (1997). Human leukemia K562 cells: induction to erythroid differentiation by guanine, guanosine and guanine nucleotides. *Haematologica*, 395-401.
- Ovidio, F., & Portelles, Y. (1997). Transfección de ADN a células de mamíferos. *Biotecnología Aplicada*, 146-161.
- Pardee, J. (2011). Understanding Breast Cancer. Cell biology and therapy—A visual approach. *Morgan & Claypool Life Sciences*.
- Pérez, M., & Becú-Villalobos, D. (2009). La proteína verde fluorescente ilumina la biociencia. *Medicina*, 370-374.
- PerkinElmer Inc. (07 de Febrero de 2017). *PerkinElmer Inc.* Obtenido de <http://www.perkinelmer.com/es/lab-products-and-services/application-support-knowledgebase/radiometric/chromium-51-release-assay.html>
- Restriction Enzymes: Performing Highly Specific DNA-Cleavage Reactions. (2002). En J. Berg, J. Tymoczko, & L. Stryer, *Biochemistry, 5th edition* (pág. 1050). New York.
- Robinson D, Walsh, P., & Bonven, J. (2002). Restriction Endonucleases. En A. Gerstein, *Molecular Biology Problem Solver: A Laboratory Guide* (págs. 225-266).

- Rosenthal , N. (1987). Identification of regulatory elements of cloned genes with functional assays. *Methods Enzymology*, 704-720.
- Schenborn , E., & Groskreutz , D. (1999). Reporter gene vectors and assays. *Molecular Biotechnology*, 29-44.
- Schreiber , R., Old , L., & Smyth , M. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 1565-1570.
- Shen, Y., Hirschhorn, R., Merce, W., Surmacz, E., Tsutsui, Y., Soprano, K., & Baserga, R. (1982). Gene Transfer: DNA Microinjection Compared with DNA Transfection with a Very High Efficiency. *Molecular and cellular biology*, 1145-1154.
- Song, Q., Merajver, S., & Li, J. (2015). Cancer classification in the genomic era: five contemporary problems. *BioMed Central Human Gnomics*, 9:27.
- Tsuchiya , S., Yamabe , M., Yamaguchi , Y., Kobayashi , Y., Konno , T., & Tada , K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International Journal of Cancer*, 171-176.
- Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2015). Neutrophils in cancer: Two sides of the same coin. *Journal of Immunology Research*, 983698.
- van Meerloo , J., Kaspers , G., & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. En *Cancer Cell Culture* (págs. 237-245). Humana Press.
- Zeidler, C., Germeshauan, M., Klein, C., & Welte, K. (2008). Clinical implications of ELA2-,HAX1-, and G-CSF-receptor (CSF3R) mutations in severe congenital neutropenia. *British Journal of Haematology*, 459-467.