



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



**“DESARROLLO DE LÍNEAS CELULARES
ESTABLES HEK293 PRODUCTORAS DE hIFN- γ ”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN FARMACIA

PRESENTA:

LF. YOANNA GARCÍA LÓPEZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ANGÉLICA MENESES ACOSTA

CUERNAVACA, MORELOS, JUNIO 2020

Cuernavaca, Morelos a 11 de diciembre de 2019
Folio: FF/D/SAc/ CIP /MF/085/2019

LF. YOANNA GARCÍA LÓPEZ
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FARMACIA
P R E S E N T E

Por este medio le informo que, con base en la propuesta hecha en su solicitud, el Consejo Interno de Posgrado le asigno el siguiente jurado para evaluar la tesis "DESARROLLO DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES HEK293 PRODUCTORAS DE hIFN- γ "

Quedando integrado su comité de la siguiente manera:

PRESIDENTE: Dra. Judith González Christen
SECRETARIO: Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza
V.1. Dr. Oscar Peralta Zaragoza
V.2. Dra. Genoveva Bustos Rivera Bahena
V.3. Dr. Rosaura Aparicio Fabre

Se le solicita entregar las tesis al jurado designado y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Esperando que esta resolución sea en beneficio de su desempeño académico, y sin otro particular por el momento reciba un cordial saludo.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia



Dr. Julio César Rivera Leyva.
Jefatura de Posgrado

ccp: archivo, jurado
mitv

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno (a): Yoanna García López

Título de la tesis: “DESARROLLO DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES
HEK293 PRODUCTORAS DE hIFN- γ ”

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Judith González Christen

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

- Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Firma del miembro del jurado

10/05/2020

Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno (a): Yoanna García López

Título de la tesis: "DESARROLLO DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES
HEK293 PRODUCTORAS DE hFN- γ "

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

- Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Firma del miembro del jurado

13 marzo 2020

Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno (a): Yoanna García López

Título de la tesis: "DESARROLLO DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES
HEK293 PRODUCTORAS DE hFN-γ"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

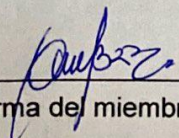
Miembro del jurado: Dra. Genoveva Bustos Rivera Bahena

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi
decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):



Firma del miembro del jurado

13 de Mayo de 2020

Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno (a): Yoanna García López

Título de la tesis: "DESARROLLO DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES
HEK293 PRODUCTORAS DE hIFN- γ "

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Rosaura Aparicio Fabre

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

- Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Firma del miembro del jurado

14 de abril de 2020

Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno (a): Yoanna García López

Título de la tesis: "DESARROLLO DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES
HEK293 PRODUCTORAS DE hFN-γ"

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Oscar Peralta Zaragoza

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi
decisión es:

La tesis:

- Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):



Firma del miembro del jurado

14 de mayo del 2020

Fecha

El presente trabajo se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Farmacia, UAEM, Laboratorio No. 7 “Biotecnología Farmacéutica”, bajo la dirección de la Dra. Angélica Meneses Acosta. Este trabajo fue financiado por la beca de posgrado Conacyt con No. de becario: 894349. Así como al financiamiento del proyecto Ciencia Básica 2015, No. 257408 e INF2014 No. 226271.

AGRADECIMIENTOS

Al comité tutorial:

Dra. Angélica Meneses Acosta

Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza

Dr. José Luis Montiel Hernández

Al jurado evaluador:

Dra. Judith González Christen

Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza

Dr. Oscar Peralta Zaragoza

Dra. Genoveva Bustos Rivera Bahena

Dra. Rosaura Aparicio Fabre

A la Dra. Angélica Meneses Acosta, por aceptarme nuevamente al Laboratorio No. 7. Gracias por sus enseñanzas, dedicación y confianza para la realización de este proyecto.

Al Laboratorio de Biotecnología Farmacéutica, por el apoyo técnico; a la Facultad de Farmacia por las instalaciones brindadas y a CONACYT por la beca otorgada No.: 894349. Gracias por hacer posible la culminación del proyecto.

A mis padres, Juana y Francisco, por su apoyo incondicional. Gracias por su amor, comprensión, confianza y por acompañarme en todos mis proyectos. Gracias por ser la base para alcanzar mis objetivos.

DEDICATORIAS

A mis padres, Juana y Francisco; por su apoyo y dedicación para estar conmigo en cada decisión que eh tomado.

A mis hermanos, Alejandro y Patricia por su apoyo y comprensión.

A mis sobrinos, por sus alegrías y cariño que me brindan.

Gracias por el amor recibido, paciencia y ayuda para lograr esta meta.

Los amo.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	ix
DEDICATORIAS.....	x
ÍNDICE GENERAL	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xvi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xviii
LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES Y SÍMBOLOS	xix
I. RESUMEN.....	xx
I.I ABSTRACT.....	xxi
II. MARCO TEÓRICO	1
2.1 Proteínas Recombinantes (PR).....	1
2.2 Sistemas de expresión para la producción de Proteínas Recombinantes.	1
2.3 Células de mamífero para la producción de proteínas recombinantes.	4
2.4 Características de los vectores de expresión para la producción de PR.	5
2.5 Métodos de transferencia de ADN.	6
2.6 Expresión génica transitoria y estable en células de mamífero.	7
2.7 Mercado de las proteínas recombinantes (PR).	7
2.8 Interferón gamma.....	8
2.9 Terapia con Interferón gamma.	11
III. ANTECEDENTES.....	12
3.1 Expresión de IFN- γ en sistemas hospederos.	12
3.2 Estándar de IFN- γ producido en diversos sistemas de expresión.	13
3.3 Producción de IFN- γ por un sistema de expresión transitorio Ad5/IFN- γ	14
3.4 Desarrollo de líneas celulares estables.	16
3.5 Línea celular HEK293.	17
IV. JUSTIFICACIÓN	19

V. HIPÓTESIS	20
VI. OBJETIVOS	21
6.1 OBJETIVO GENERAL:	21
6.2 OBJETIVOS PARTICULARES:.....	21
VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	22
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
8.1 Vector plasmídico pcDNA3(+).	23
8.1.1 Reactivación de bacterias <i>Escherichia coli</i> DH5- α con el vector plasmídico pcDNA3(+).	24
8.2 Bacterias <i>E. coli</i> DH5- α /pcDNA3(+) en medio LB líquido.	24
8.2.1 Purificación del vector plasmídico pcDNA3(+) a través del kit Miniprep.....	25
8.3 Digestión de pcDNA3(+).	26
8.4 Construcción del vector de expresión pcDNA3+/IFN- γ	26
8.4.1 Vector plasmídico pVAX1/IFN- γ	26
8.4.2 Reactivación de bacterias <i>E. coli</i> DH5- α con pVAX1/IFN- γ	27
8.4.3 Diseño de Oligos y amplificación del gen IFN- γ	27
8.4.4 Reacción de doble digestión del pcDNA3(+) y del fragmento de IFN- γ	30
8.4.5 Ligación del vector pcDNA3(+) con IFN- γ	31
8.4.6 Células bacterianas <i>E. coli</i> DH5- α quimiocompetentes.	32
8.4.7 Transformación bacteriana para la amplificación del vector pcDNA3+/IFN- γ ...	33
8.4.8 PCR de colonias positivas pcDNA3+/IFN- γ	33
8.4.9 Preparación de glicerolos de colonias positivas.	34
8.4.10 PCR del ADN plasmídico purificado pcDNA3+/IFN- γ	34
8.4.11 Secuenciación.....	35
8.5 Línea celular.	35
8.5.1 Medio de cultivo.	35
8.6 Cultivo de células HEK293.....	35

8.6.1 Subcultivo de células adherentes HEK293 en frascos T 25 cm ²	36
8.7 Cinética de crecimiento de células HEK293.....	36
8.7.1 Montaje de células HEK293 en placa Corning Costar (24 pozos).....	37
8.8 Recolección de muestras biológicas.....	37
8.9 Técnicas de análisis.....	38
8.9.1 Conteo celular y técnica de exclusión con azul de tripano.....	38
8.10 Curva de muerte de células HEK293 con Geneticin®.....	39
8.11 Transfección de células HEK293 con el plásmido recombinante.....	40
8.11.1 Linealización del vector pcDNA3+/IFN-γ.....	40
8.11.2 Montaje de células HEK293 en placa Corning Costar (6 pozos) para su transfección.....	41
8.11.3 Transfección de cultivos HEK293 con Lipofectamina 2000.....	41
8.12 Selección de células HEK293 transfectadas con Geneticin®.....	42
8.13 1ra evaluación de la expresión del IFN-γ en células HEK293 transfectadas.....	42
8.13.1 Procedimiento de RT-PCR y extracción de ARN total en células HEK293..	43
8.13.2 Cuantificación de IFN-γ por ELISA en SN de células HEK293 transfectadas.	47
8.14 Segunda selección clonal a través de la estrategia de dilución limitante.....	49
8.14.1 Montaje de células transfectadas en placa de 96 pozos.....	49
8.14.2 Expansión de clonas individuales a placas Corning® de 24 pozos.....	50
8.15 Selección y mantenimiento de clonas productoras de IFN-γ.....	50
8.15.1 Montaje de clonas HEK293 productoras en placas de 24 pozos para su caracterización celular.....	50
8.15.2 Evaluación de la expresión génica y proteica del IFN-γ en clonas productoras.....	51
8.16 Adaptación de clonas productoras de IFN-γ a medio libre de suero.....	53
8.17 Descongelación de células HEK293 transfectadas y análisis proteico.....	54
IX. RESULTADOS.....	54
9.1 Amplificación y digestión del plásmido pcDNA3(+).....	54

9.2 Construcción molecular del vector pcDNA3+/IFN- γ	55
9.2.1 Diseño de Oligos y amplificación del gen KpnI-IFN- γ -XbaI.....	55
9.2.2 Doble digestión del vector pcDNA3(+) e IFN- γ	56
9.2.3 Reacción de ligación entre pcDNA3(+) e IFN- γ	57
9.2.4 Transformación de bacteriana y PCR de colonias positivas.	58
9.2.5 PCR y digestión del ADN plasmídico purificado (pcDNA3+/IFN- γ).	59
9.3 Análisis BLAST de la secuencia de IFN- γ	60
9.4 Caracterización morfológica de la línea celular HEK293.	61
9.5 Curva de muerte de cultivos HEK293 con Geneticin®.	64
9.6 Análisis del vector recombinante pcDNA3+/IFN- γ antes de transfectar cultivos HEK293.	66
9.7 Evolución de los cultivos HEK293 transfectados con pcDNA3/IFN- γ	67
9.8 Primera evaluación de la expresión génica y proteica del IFN- γ en los cultivos HEK293 transfectados.	68
9.9 Segunda selección clonal de pools clonales HEK293 transfectados.	70
9.10 Selección y caracterización celular de clonas productoras para IFN- γ	72
9.11 Análisis de la expresión de IFN- γ en células HEK293 adaptadas a medio libre suero.	77
.....	77
9.12 Análisis proteico del IFN- γ en células recombinantes HEK293 descongeladas.	79
X. DISCUSIÓN	81
XI. CONCLUSIÓN GENERAL.....	87
XII. CONCLUSIONES PARCIALES.....	87
XIII. PERSPECTIVAS.....	88
XIV. BIBLIOGRAFÍA.....	89
XV. ANEXOS.....	95
15.1 Preparación de medio LB sólido.....	95
15.2 Preparación de medio LB líquido.	95
15.3 Preparación de ampicilina a 100 μ g/mL.	95

15.4 Preparación de cajas LB con ampicilina 100 µg/mL.	95
15.5 Preparación de CaCl ₂	96
15.6 Cuantificación de ADN plasmídico.	96
15.7 Extracción de ADN plasmídico con Fenol: Cloroformo.	97
15.8 Preparación de geles de agarosa.....	97
15.9 Purificación del gen IFN-γ a partir de geles de agarosa.	98
15.10 Mantenimiento de la línea celular.	99
15.10.1 Descongelamiento de células HEK293.....	99
15.10.2 Congelación de células HEK293 en DMSO.....	99
15.11 Preparación de reactivos para Western Blot.	100
15.11.1 Preparación de geles de acrilamida (gel separador al 12.5% y gel concentrador al 4%).....	101
15.12 Evolución de los cultivos HEK293 durante la cinética de crecimiento.....	101
15.13 Curva de calibración del estándar de Interferón gamma.	102
15.14 Variabilidad de la concentración de IFN-γ en SN de clonas HEK293 aisladas.	102
15.15 SDS-PAGE de SN de clonas HEK293 productoras para IFN-γ.	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No. 1: Esquema representativo de los sitios de N-glicosilación en la estructura del dímero de IFN- γ	9
Figura No. 2: Receptor de IFN- γ tipo II.....	11
Figura No. 3: Estándar de IFN- γ recombinante expresado en <i>E. coli</i>	13
Figura No. 4: Estándar de IFN- γ expresado en células HEK293.....	14
Figura No. 5: Estándar de IFN- γ expresado en células CHO.....	14
Figura No. 6: Producción de IFN- γ en células HEK293 usando el sistema Ad5/IFN- γ	15
Figura No. 7: Vector pcDNA3(+)......	23
Figura No. 8: Vector recombinante pVAX1/IFN- γ	27
Figura No. 9: Secuencia del ADNc del gen IFN- γ	28
Figura No. 10: Gel de agarosa de la digestión del vector pcDNA3(+)......	55
Figura No. 11: Gel de agarosa de la amplificación del IFN- γ a dos Tm de alineamiento.....	55
Figura No. 12: Gel de agarosa de la amplificación del IFN- γ por PCR a partir del vector pVAX1/IFN- γ	56
Figura No. 13: Gel de agarosa de la doble digestión del vector pcDNA3(+) e IFN- γ con las enzimas KpnI y XbaI.....	57
Figura No. 14: Gel de agarosa de la reacción de ligación pcDNA3(+) e IFN- γ	57
Figura No. 15: Crecimiento de colonias positivas después de su transformación en medio LB agar con antibiótico.....	58
Figura No. 16: Gel de agarosa del PCR de colonias positivas a pcDNA3+/IFN- γ	58
Figura No. 17: Gel de agarosa del PCR de colonias positivas purificadas a pcDNA3+/IFN- γ	59
Figura No. 18: Gel de agarosa de la digestión de pcDNA3+/IFN- γ con la enzima KpnI.....	59
Figura No. 19: Análisis BLAST de la secuencia de IFN- γ	61
Figura No. 20: Células embrionarias de riñón humano (ATCC CLR-1573).....	62
Figura No. 21: Células HEK293 en medio DMEM/F-12 al 10% SFB.....	62
Figura No. 22: Cinética de crecimiento de cultivos HEK293.....	63
Figura No. 23: Curva de muerte de células HEK293 con Geneticin®.....	65
Figura No. 24: Morfología de células HEK293 con antibiótico Geneticin®.....	65
Figura No. 26: Gel de agarosa de la digestión del pcDNA3+/IFN- γ obtenido en Maxipred..	66

Figura No. 25: Gel de agarosa del PCR en muestras de ADN plasmídico purificado pcDNA3+/IFN- γ (Maxipred).....	66
Figura No. 27: Gel de agarosa de la linealización de pcDNA3/IFN- γ con la enzima MfeI..	67
Figura No. 28: Viabilidad celular de pools clonales HEK293 transfectados en presencia de Geneticin®.....	68
Figura No. 29: Gel de agarosa del RT-PCR de células HEK293 transfectadas.....	69
Figura No. 30: Cuantificación de IFN- γ en los SN de los pools clonales HEK293 transfectados.....	69
Figura No. 31: Crecimiento de clonas HEK293 individuales al 3er día de cultivo mediante dilución limitante.....	70
Figura No. 32: Clonas HEK293 individuales por dilución limitante al décimo día con antibiótico.....	71
Figura No. 33: Cuantificación de IFN- γ en los SN de clonas HEK293 individuales.....	72
Figura No. 34: Cinética de crecimiento de clona #1.2, producción de IFN- γ ALTA.....	73
Figura No. 35: Cinética de crecimiento de clona #3.1, producción de IFN- γ ALTA.....	74
Figura No. 36: Cinética de crecimiento de clona #3.2, producción de IFN- γ MEDIA.....	74
Figura No. 37: Cinética de crecimiento de clona #1.3, producción de IFN- γ BAJA.....	75
Figura No. 38: Gel de agarosa del RT-PCR de clonas HEK293 productoras de IFN- γ	76
Figura No. 39: Cuantificación de IFN- γ de clonas HEK293 productoras.....	76
Figura No. 40: Análisis de la expresión proteica de IFN- γ por Western Blot SDS-PAGE en SN de clonas productoras.....	77
Figura No. 41: Morfología de células HEK293 en medio definido, provenientes de la clona #3.1.....	78
Figura No. 42: Análisis de la expresión proteica de IFN- γ por Western Blot SDS-PAGE en medio libre de suero, población clonal #3.1.....	79
Figura No. 43: Análisis de la expresión proteica de IFN- γ por Western Blot SDS-PAGE del SN de la clona HEK293 #3.1 descongelada.....	80
Figura No. 44: Evolución de los cultivos HEK293 en la cinética de crecimiento.....	101
Figura No. 45: Curva de calibración del estándar de IFN- γ	102
Figura No. 46: Membrana revelada SDS-PAGE de SN de clonas HEK293 productoras..	103

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No. 1: Ventajas y Desventajas de los sistemas de expresión para la producción de PR.....	3
Tabla No. 2: Proteínas de secreción, de membrana y citosólicas producidas por líneas celulares estables.....	17
Tabla No. 3: Secuencias de Oligonucleótidos sintetizados con una enzima de restricción..	28
Tabla No. 4: Programa de PCR gradiente.....	29
Tabla No. 5: Programa de PCR para la amplificación del gen IFN- γ	30
Tabla No. 6: Condiciones para la reacción de ligación.....	31
Tabla No. 7: Componentes para la eliminación de ADN genómico del ARN.....	44
Tabla No. 8: Componentes para la síntesis de la primera cadena de ADNc.....	44
Tabla No. 9: Componentes para la síntesis de ADNc del control positivo GAPDH.....	45
Tabla No. 10: Componentes para la reacción de PCR del IFN- γ en muestras de células HEK293 transfectadas.....	46
Tabla No. 11: Componentes para la reacción de PCR del control GAPDH en muestras de células HEK293 transfectadas.....	46
Tabla No. 12: Desarrolló de líneas HEK293 estables.....	82
Tabla No. 13: Parámetros cinéticos y productividad de IFN- γ	83
Tabla No. 14: Productividades alcanzadas en HEK293 de diferentes proteínas y sistemas.....	86
Tabla No. 15: Concentración de Interferón gamma en diferentes clonas aisladas HEK293.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES Y SÍMBOLOS

°C	Centígrados	α	Alfa
mL	Mililitro	γ	Gamma
μL	Microlitro		
g	Gramo	μ	Velocidad específica de crecimiento
μg	Microgramo	Td	Tiempo de duplicación
ng	Nanogramo	r.p.m.	Revoluciones por minuto
μM	Micromolar		
μg/mL	microgramo/mililitro	kb	Kilobases
		kDa	Kilodalton
cél/mL	células/mililitro	pb	Pares de bases
Aa	Aminoácido	Ad5	Adenovirus serotipo 5
ADN	Ácido desoxirribonucleico		
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario		
ARN	Ácido ribonucleico		
CCI	Concentración celular al tiempo de infección		
CMV	Citomegalovirus		
DEAE	Dietilaminoetanol		
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium		
DMSO	Dimetilsulfóxido		
EGF	Factor de crecimiento epidérmico		
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos		
IFN-γ	Interferón gamma		
IGF-1	Factor de crecimiento parecido a la insulina		
LGS	Ley General de Salud	SFB	Suero Fetal Bovino
MDI	Multiplicidad de infección	Td	Tiempo de duplicación
PBS	Amortiguador Salino de Fosfatos	UV	Ultravioleta
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas		
PR	Proteína recombinante		
RIS	Reglamento de insumos para la salud		

I. RESUMEN

Introducción: El Interferón gamma (tipo II) es una citocina pleiotrópica que regula diversas funciones biológicas. El IFN- γ recombinante se ha expresado en diferentes sistemas que presentan varias desventajas, siendo necesario buscar nuevas alternativas de expresión con mejor calidad y potencial terapéutico, por ejemplo, el uso de líneas celulares de mamíferos, ya que representa una herramienta atractiva para la sobreexpresión de proteínas recombinantes de manera estable. **Objetivo:** Desarrollar líneas celulares HEK293 que expresen de manera estable el Interferón gamma humano para obtener mayor producción en comparación con un sistema de expresión transitorio (Ad5/IFN- γ). **Metodología:** La construcción del vector plasmídico pcDNA3(+) se realizó con el inserto de IFN- γ proveniente del vector pVAX1/IFN- γ . Posteriormente, la bacteria *E. coli DH5- α* se transformó, amplificó y el plásmido se purificó y secuenció. Por otro lado, la línea celular HEK293 se creció en medio DMEM/F-12 al 10% de SFB y la transfección con el vector recombinante se realizó en placa de 6 pocillos. Los cultivos transfectados se mantuvieron y monitorearon para realizar la primera selección clonal a través del gen de resistencia a la neomicina, evaluando la viabilidad celular. Posteriormente, la segunda selección clonal se realizó mediante el método de dilución limitante y las clonas sobreproductoras de IFN- γ se expandieron, la expresión del IFN- γ se detectó por RT-PCR y Western Blot; y, se cuantificó por la técnica ELISA. **Resultados:** Se determinó que la construcción molecular pcDNA3+/IFN- γ se realizó correctamente ya que contiene la secuencia codificante del gen de Interferón gamma (fragmento ~520 pb); asimismo, la secuenciación y el análisis Blast mostraron una similitud del 100% con el gen IFN- γ humano. La caracterización celular mostró una tasa de crecimiento específica de 0.0234 h⁻¹ y un tiempo de duplicación de 29.6 h. Asimismo, la curva de muerte con Geneticin® produjo una dosis letal de 550 μ g/mL. El RT-PCR mostró que había transcripción para el gen IFN- γ humano en todas las clonas transfectadas (520 pb) y el análisis SDS-PAGE también mostró que el IFN- γ se encuentra glicosilado y es de tipo II secretándose al medio de cultivo (~20 kDa). Posteriormente, se observó que en la segunda selección clonal las células HEK293 individuales alcanzaron productividades de IFN- γ de 50 a 400 pg/mL. La caracterización celular de las clonas HEK293 productoras de IFN- γ produjo tiempos de duplicación de 36.86 y 34.83 h (clonas de alta producción), 37.87 h (clon de media producción) y 37.06 h (clon de baja producción) expresando aún la proteína de interés con los subsecuentes pases a excepción de la clona de baja producción. Finalmente, la adaptación a medios libres de suero y el proceso de congelación-descongelación mostró la estabilidad de la clona celular HEK293 recombinante ya que se mantiene a un pase #33 la expresión proteica y génica del IFN- γ . **Conclusiones:** El desarrollo de las líneas celulares HEK293 con expresión estable se realizó correctamente con el vector recombinante pcDNA3+/IFN- γ obteniendo una alta productividad de proteína de 2.6 ng/mL en comparación con un sistema de expresión transitorio (Ad5/IFN- γ , 0.019 ng/mL). Siendo las clonas estables a más de ~215 generaciones y 33 pases.

I.I ABSTRACT

Introduction: Interferon gamma (type II) is a pleiotropic cytokine that regulates various biological functions. Recombinant IFN- γ has been expressed in different systems that have several disadvantages, and it is necessary to search for new expression alternatives with better quality and therapeutic potential, for example, the use of mammalian cell lines, since it represents an attractive tool for overexpression of stably recombinant proteins. **Objective:** To develop HEK293 cell lines that stably express human Interferon gamma to obtain higher production compared to a transient expression system (Ad5/IFN- γ). **Methodology:** The construction of the plasmid vector pcDNA3(+) was performed with the IFN- γ insert from the vector pVAX1/IFN- γ . Subsequently, the *E. coli* DH5- α bacterium was transformed, amplified, and the plasmid was purified and sequenced. On the other hand, the HEK293 cell line was grown in DMEM/F-12 medium with 10% SFB and transfection with the recombinant vector was performed in a 6-well plate. Transfected cultures were maintained and monitored to perform the first clonal selection through the neomycin resistance gene, evaluating cell viability. Subsequently, the second clonal selection was performed using the limiting dilution method and the IFN- γ overproducing clones were expanded, IFN- γ expression was detected by RT-PCR and Western Blot; and, it was quantified by the ELISA technique. **Results:** It was determined that the pcDNA3+/IFN- γ molecular construction was carried out correctly since it contains the coding sequence for the Interferon gamma gene (fragment ~520 bp); likewise, sequencing and Blast analysis showed 100% similarity with the human IFN- γ gene. Cell characterization showed a specific growth rate of 0.0234 h⁻¹ and a doubling time of 29.6 h. Likewise, the death curve with Geneticin® produced a lethal dose of 550 μ g/mL. RT-PCR showed that there was transcription for the human IFN- γ gene in all transfected clones (520 bp) and SDS-PAGE analysis also showed that IFN- γ is glycosylated and is type II secreting into the culture medium (~20 kDa). Subsequently, it was observed that in the second clonal selection the individual HEK293 cells reached IFN- γ productivities of 50 to 400 μ g/mL. The cellular characterization of the IFN- γ -producing clones HEK293 produced doubling times of 36.86 and 34.83 h (high production clones), 37.87 h (medium production clone) and 37.06 h (low production clone) still expressing the interest with subsequent passes except for the low production clone. Finally, adaptation to serum-free media and the freeze-thaw process showed the stability of the recombinant HEK293 cell clone since the protein and gene expression of IFN- γ is maintained at a #33 pass. **Conclusions:** The development of HEK293 cell lines with stable expression was carried out correctly with the recombinant vector pcDNA3+/IFN- γ obtaining a high protein productivity of 2.6 ng/mL compared to a transient expression system (Ad5/IFN- γ , 0.019 ng/mL). The clones being stable to more than ~215 generations and 33 passes.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Proteínas Recombinantes (PR).

De acuerdo al artículo 222Bis de la Ley General de Salud (LGS), se considera *“medicamento biotecnológico a toda sustancia que haya sido producida por biotecnología molecular, que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica, que se identifique como tal por su actividad farmacológica y propiedades físicas, químicas y biológicas”*.

Clasificándose a los biofármacos o medicamentos biotecnológicos de acuerdo al Reglamento de Insumos para la Salud (RIS) artículo No. 81 en: Proteínas recombinantes (PR), Anticuerpos monoclonales, Péptidos sintéticos, Ácidos nucleicos sintéticos o de plásmidos. Por lo que es muy importante caracterizar sus propiedades farmacológicas, físico-químicas y biológicas; para garantizar su calidad, eficacia y seguridad (De la Madrid Hurtado, 2009; Iglesias-Osma, González Correa, Moreno, & Tejerina, 2013).

En el caso de las proteínas recombinantes, la tecnología del ADN recombinante ha sido importante para el desarrollo de la Biotecnología de las mismas; ya que gracias a la manipulación de genes se han logrado producir cantidades considerables de proteínas adecuadas para su análisis y para diversas aplicaciones terapéuticas, impulsándose a la investigación en este campo.

Por lo tanto, las PR son denominadas como aquellas proteínas producidas por cualquier ente biológico procarionte o eucarionte al que se le introduce, por técnicas de ingeniería genética, una secuencia de ácido desoxirribonucleico que las codifica (Leon, 2014). Generalmente, estas proteínas se expresan en distintos sistemas biológicos, de acuerdo a las características que se desea tenga la proteína en cuestión. Así mismo, como proteínas bioterapéuticas representan un pilar para el tratamiento de una variedad de enfermedades, por ejemplo; autoinmunes, enfermedades infecciosas, cáncer, hematológicas, etc. Cambiando las tecnologías detrás de su producción desde que estas fueron aprobadas por primera vez en los años 80's.

2.2 Sistemas de expresión para la producción de Proteínas Recombinantes.

Los genes codificantes para las proteínas de interés son capaces de transferirse a otros hospederos u organismos diferente a los nativos. Los sistemas más utilizados para la producción y expresión de proteínas recombinantes son las bacterias, levaduras, células de insecto y células de mamífero. La selección de un sistema de expresión adecuado dependerá en gran medida de las propiedades químicas y biológicas de la proteína de

interés, del origen biológico, su aplicación posterior y el bioproceso que se empleará para su producción (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2004).

La síntesis de proteínas en sistemas bacterianos han sido los más utilizados; gracias a su amplia variedad de ventajas, como fácil manipulación genética y en cultivo, bajos costos de producción (García *et al.*, 2013). Estos son ideales para la producción de proteínas de bajo peso molecular que no requieran modificaciones postraduccionales. Un ejemplo del microorganismo comúnmente utilizado es la bacteria *Escherichia coli*, dado que ha sido muy bien caracterizada desde el punto de vista genético y fisiológico; además, presenta una mayor velocidad específica de crecimiento con la cual no posee requerimientos costosos asociados al medio de cultivo, lo que ha permitido el desarrollo de una gran variedad de vectores de expresión y cepas mutantes. Sin embargo, las desventajas de su implementación son, su ineficiencia para secretar proteínas al medio de cultivo, la generación de endotoxinas dañinas para la salud, la incapacidad de realizar muchas de las modificaciones postraduccionales complejas, así la capacidad de generar cuerpos de inclusión inactivando la función de las proteínas (García *et al.*, 2013).

En el caso de la producción de proteínas basados en levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*) se ha demostrado que son eficientes y económicas para proteínas de eucariotas. Estas levaduras presentan ciertas ventajas como un apto plegamiento de proteínas, realización de modificaciones postraduccionales, fácil manipulación, crecimiento a alta densidad, secreción de la proteína recombinante al medio de cultivo, existencia de vectores de expresión y cepas disponibles, altos niveles de producción de proteína, etc. Presentan ciertas desventajas en su implementación, como la baja eficiencia en la secreción de proteínas heterólogas, producción de hiperglicosilaciones y patrones de glicosilaciones no deseables, así como también pueden presentar actividad proteolítica (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2004). Además, es importante mencionar que las glicoproteínas provenientes de las levaduras pueden tener una vida media baja debido a que al unirse a receptores de manosa expresados en la superficie de macrófagos, son captadas y eliminadas por estas células (Drago Serrano y Sainz Espuñes, 2006).

Por otro lado, las células de insecto es otro sistema útil y versátil para la producción de proteínas recombinantes, el cual consiste en la infección de células de insecto con un baculovirus recombinante que contiene el gen de la proteína de interés. Así mismo, representan un buen sistema para expresar PR con modificaciones postraduccionales; sin

embargo, la glicosilación puede ser no idéntica al de células de mamífero con un tiempo de proceso de producción más largo (Chávez-Peña *et al.*, 2010).

En la Tabla No. 1, se resumen las ventajas y desventajas de cada sistema de expresión. Puesto que el generar proteínas solubles y homogéneas es un paso importante en el proceso general de determinación de la estructura de las mismas, la elección de un sistema de expresión adecuado tiene gran influencia en la calidad y cantidad de la proteína recombinante producida.

Tabla No. 1: Ventajas y Desventajas de los sistemas de expresión para la producción de PR.

SISTEMA DE EXPRESIÓN	VENTAJAS	DESVENTAJAS
<ul style="list-style-type: none"> Bacterias (Por ejemplo, <i>Escherichia coli</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> - Fácil manipulación genética y en cultivo - Bajos costos de producción - Producción de proteína recombinante de bajo peso molecular - Desarrollo de una variedad de vectores de expresión 	<ul style="list-style-type: none"> - No secretan la proteína al medio de cultivo - No realizan modificaciones postraduccionales complejas - Generan cuerpos de inclusión - Generación de endotoxinas
<ul style="list-style-type: none"> Levaduras (Por ejemplo, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Pichia pastoris</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> - Plegamiento de proteínas - Modificaciones postraduccionales adecuadas - Fácil manipulación - Alta densidad celular - Secretan la proteína al medio de cultivo 	<ul style="list-style-type: none"> - Baja eficiencia en la secreción de proteína recombinante - Producen hiperglicosilaciones - Producen patrones de glicosilación no deseables - Pueden presentar actividad proteolítica

- **Células de insecto**

- Altos niveles de producción de proteína recombinante	
- Realizan modificaciones postraduccionales	- Tiempo de proceso más largo - Resguardos virales con alto contenido de partículas virales infecciosas

2.3 Células de mamífero para la producción de proteínas recombinantes.

En la actualidad, las células de mamífero son un sistema óptimo para producir proteínas recombinantes dadas las ventajas que tienen contra otros sistemas de expresión; como los descritos anteriormente, debido a que han demostrado ser un sistema capaz de generar glicosilaciones complejas donde la estructura y la actividad de la proteína son óptimas, un plegamiento adecuado y secretar el producto al medio de cultivo facilitando su posterior purificación. Desde la década de los 90, se ha venido incrementado la producción de biofármacos complejos utilizando esta tecnología, dado que las proteínas generadas en otros sistemas de expresión no contienen la calidad requerida por la industria biofarmacéutica. Sin embargo, a pesar de sus desventajas como son altos costos de producción, largos tiempos de cultivo, bajo rendimiento, utilización de medios de cultivo costosos, entre otros, su implementación sigue en pie (Tavira Montalván *et al.*, 2009). La finalidad de utilizar las células de mamífero ha consistido en estudiar las relaciones proteína: función; estudiar procesos bioquímicos o moleculares; para producir proteínas que están disponibles en cantidad limitada; analizar la respuesta a fármacos innovadores; etc. (Drago Serrano y Sainz Espuñes, 2006).

Las líneas celulares de mamíferos no humanos más utilizadas son: células de riñón de hámster bebé (BHK21), células de mieloma murino (NS0 y Sp2) y las células de ovario de hámster chino (CHO); donde esta última se utiliza en la fabricación de >70% de las PR aprobadas actualmente (Lalonde y Durocher, 2017). Las ventajas más importante de las células CHO es que son capaces de crecer rápidamente (Td: 16-18 h) en suspensión en medios químicamente definidos sin suero, producir PR con modificaciones postraduccionales complejas que son similares a las proteínas producidas en humanos, así

como su fácil producción a gran escala; sin embargo, también son incapaces de producir algunos tipos de glicosilación humana (carecen de α [2-6]sialiltransferasa y de α [1-3/4] fucosiltransferasas) además de producir glicanos que no se expresan en humanos tal como: α -gal y NGNA (Dumont *et al.*, 2016).

En cambio, las líneas celulares de mamífero humanas se han convertido en una herramienta esencial para la producción de las proteínas recombinantes terapéuticas dado a que su patrón de glicosilación complejo es igual a la proteína natural endógena de los humanos. De ellas la línea celular HEK293 (Células embrionarias de riñón humano) ha ido ganando importancia significativa en el campo biofarmacéutico durante las últimas dos décadas. Aunque inicialmente se empleó para la producción de vectores adenovirales, también se ha convertido en una línea celular preferida para la expresión de proteínas transitorias o estables (Liste-Calleja *et al.*, 2015).

2.4 Características de los vectores de expresión para la producción de PR.

Las proteínas recombinantes son producidas mediante diversos procesos productivos, generalmente los pasos a considerar para su obtención son: tener un gen que codifique la proteína de interés, un vector en el que se inserta una secuencia de ADN, un hospedero adecuado que exprese dicha secuencia, un bioproceso de producción, métodos de separación y purificación, etc. La información genética de la proteína a producir usualmente se inserta en un vector de expresión.

Los vectores más útiles contienen diversos elementos como:

- Sitio múltiple de inserción, compuesto de varias enzimas de restricción donde se inserta el gen de interés (ADN extraño)
- Un promotor eficiente para el inicio de la transcripción (ejemplos: CMV, SV40, CAG, EF1 α)
- Marcadores particulares que pueden ser útiles para seleccionar células que hayan integrado de manera estable el ADN plasmídico (por ejemplo, a antibióticos; para clonación en sistemas bacterianos: ampicilina y para sistemas eucarióticos: Neomicina, Puromicina, Higromicina, etc.)
- Un origen de replicación
- Señales de procesamiento de ARNm que incluyen secuencias intermedias y secuencias de escisión y poliadenilación del ARNm (Kaufman, 2000).

Posteriormente, el vector recombinante puede ser transferido a través de métodos físico-químicos como se describe a continuación, para ingresar el ADN exógeno a la célula hospedera y permitir la expresión de la proteína de interés.

2.5 Métodos de transferencia de ADN.

El lograr altos niveles de producción de proteína dependerá en gran medida del método de entrega de ADN y expresión génica, así como la estabilidad del ARN, eficacia de traducción y modificaciones postraduccionales adecuadas. Existen diversos métodos para la transferencia de material genético a las células de mamífero, ya sea a través de virus o aquellos mediados por transferencia directa de ADN. Los primeros métodos desarrollados fueron a través de DEAE-dextrano y la precipitación de fosfato de calcio; el método DEAE-dextrano está basado en la obtención de complejos entre la resina y DEAE y el ADN, donde los polímeros del DEAE dextrano tienen una carga que les permite unirse a las cargas muy negativas de las moléculas del ADN, posteriormente, el ADN se introduce en las células mediante choque osmótico usando DMSO o glicerina. Por otro lado, la precipitación de fosfato de calcio consiste en la formación de un precipitado entre el cloruro de calcio y el ADN en una solución salina de fosfatos generando unos agregados que serán fagocitados por las células (el agregado de calcio podría aparentemente proteger el ADN de la degradación por las nucleasas celulares) (Parham *et al.*, 1998).

También, se han desarrollado productos lípidos catiónicos que facilitan la absorción de ADN a las células de mamífero como es la Lipofectamina. Esta se caracteriza por ser un reactivo catiónico basado en liposomas que proporciona una alta eficacia de transfección y altos niveles de expresión génica. Donde la eficacia de transfección óptima y la viabilidad celular dependerán en gran medida de la densidad celular, la concentración de liposomas y ADN, la presencia o ausencia de componentes de los medios de cultivo (como antibióticos o suero), etc. (Dalby *et al.*, 2004). Otro método físico-químico muy común es la electroporación el cual consiste en provocar un aumento de la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana celular mediante la implementación de un campo eléctrico aplicado externamente; provocando la generación de poros que permitirán la entrada de ADN exógeno a la célula hospedera. Siendo muy utilizado para la transformación de bacterias, levaduras, entre otros (Parham *et al.*, 1998).

Existen también otros compuestos que se usan actualmente para la transferencia de ADN los cuales incluyen a la polietilenimina, polibreno/DMSO, así como vectores virales (tales como: adenovirus, lentivirus, baculovirus, etc.).

2.6 Expresión génica transitoria y estable en células de mamífero.

Para analizar rápidamente un gran número de variantes de proteínas y realizar su caracterización bioquímica inicial, los experimentos de expresión transitoria son más ventajosos. Alternativamente, una vez que se ha identificado una variante apropiada o para caracterizar completamente la proteína en cuestión, se requieren grandes cantidades de la proteína homogénea por lo que, bajo estas condiciones la inversión requerida para generar una línea celular clonal estable estaría justificada.

La expresión génica transitoria se caracteriza cuando las células toman el ADN y lo expresan en un corto periodo de tiempo de varios días a semanas con una pérdida total del gen a través de la división celular u otros procesos. Esta expresión a menudo es un método conveniente y rápido para estudiar la expresión de los genes extraños en células de mamífero; donde en este caso las células transfectadas transitoriamente expresarán el gen, pero no lo integrarán en su genoma y no se replicará (Kaufman, 2000). Además, el rendimiento de la proteína depende de la eficiencia de la transfección, un factor que puede variar considerablemente de un experimento o individuo a otro. Este problema puede ser particularmente inconveniente para los experimentos a gran escala, ya que la expresión no es directamente escalable como lo es para líneas celulares estables.

En contraste con la expresión transitoria, la expresión estable permite la expresión a largo plazo, así como la expresión uniforme, definida y reproducible del gen de interés con procesos de amplificación con mayor facilidad. Por lo tanto, cuando se requiere una gran cantidad de proteína recombinante, se recomienda la construcción de líneas celulares de expresión estable para una producción de proteína reproducible y rentable. La expresión estable a largo plazo de un gen de interés puede conseguirse mediante vectores eucarióticos que albergan elementos para el mantenimiento episomal en el núcleo de una célula transfectada o mediante la integración directa del plásmido transfectado en el genoma de la célula hospedera por lo que las demás generaciones lo tendrán integrado (Lonza Cologne, 2012; Lalonde y Durocher, 2017).

2.7 Mercado de las proteínas recombinantes (PR).

En nuestros días, más de 200 biofármacos se encuentran en el mercado y más de 350 se encuentran en pruebas clínicas, además de muchos otros en desarrollo. Siendo utilizados principalmente para el tratamiento de enfermedades crónicas, diabetes y cánceres; así como enfermedades inflamatorias, por ejemplo, psoriasis, esclerosis múltiple; y enfermedades reumáticas. Las regiones de Europa, América del Norte y Asia-Pacífico

poseen la mayor cuota del mercado para proteínas recombinantes; estimándose que las ventas en América del Norte alcanzarán los US \$150 millones para el final del 2022. En 2018, el tamaño global fue de US \$562 millones y se espera que alcance los US \$969 millones a fines de 2025, con una tasa compuesta anual de 0.081 durante 2019-2025. Siendo principalmente fabricados por Eli Lilly and Company, Merck KGaA y Novo Nordisk AS, entre otros, como Abcam plc, BPS Bioscience Inc., PerkinElmer, Inc., Laboratorios Bio-Rad, Inc., Thermo Fisher Scientific Inc., Sigma Aldrich (Fact. MR, agosto 2017, Recombinant Protein Market Forecast, Trend Analysis & Competition Tracking: Global Market insights 2017 to 2022, link: <https://www.factmr.com/report/186/recombinant-protein-market>; GlobeNewswire, 2020; ReportLinker, RECOMBINANT PROTEIN MARKET - GROWTH, TRENDS, AND FORECASTS (2019-2024), link: https://www.reportlinker.com/p05865770/?utm_source=GNW).

Las principales proteínas recombinantes en el mercado son: anticuerpos monoclonales (20%), factores de crecimiento, citocinas (19%), enzimas, entre otros; donde cerca del 30% de estas, son producidas principalmente en bacterias teniendo rendimientos del 30% de proteína total. Estas células son ampliamente usadas debido a su rápido crecimiento, baja labilidad al estrés mecánico, altas productividades y escalamiento sencillo; sin embargo, se han utilizado otros sistemas de sobreexpresión para mejorar los procesos productivos y calidad de la proteína en cuestión. Un ejemplo de ello, es el uso de líneas celulares de mamífero, donde cerca del 70% de proteínas recombinantes aprobadas por la FDA, son producidas principalmente en células CHO, pero también en HEK293, siendo esta última importante para su uso ya que presenta la capacidad de plegar proteínas y realizar modificaciones postraduccionales complejas proporcionándonos una proteína altamente igual a las proteínas endógenas humanas (Lalonde y Durocher, 2017).

2.8 Interferón gamma.

El IFN- γ es una proteína inmuno-regulatoria que afecta la intensidad y duración de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa. Esta proteína pertenece a la familia de los interferones, siendo el único representante del tipo II. Se caracteriza por ser una proteína homodimérica (proteína compuesta por dos cadenas peptídicas idénticas), codificada por el gen ubicado en el cromosoma 12. Tiene aproximadamente 166 aminoácidos y un peso molecular que oscila entre los 40 a 60 kDa debido a que está glicosilada (Smith & Denning, 2014).

Su función biológica activa es en forma de dímero, donde sus subunidades monoméricas se unen no covalentemente entre sí de forma antiparalela, formando una estructura globular compacta. Además, contiene dos sitios de N-glicosilación potenciales en las posiciones Asn-25 (esencial para el plegamiento y dimerización de IFN- γ recién sintetizado) y Asn-97 de su cadena polipeptídica (ver Figura No. 1); en la cual, basándose en su estructura tridimensional del dímero, los sitios de N-glicosilación se encuentran situados en la superficie. Por lo tanto, una adecuada glicosilación de esta citocina podría aumentar el tiempo de supervivencia biológicamente activo en la circulación sanguínea con una actividad específica 2 veces mayor en comparación con una proteína de IFN- γ no glicosilada (Sareneva *et al.*, 1995).

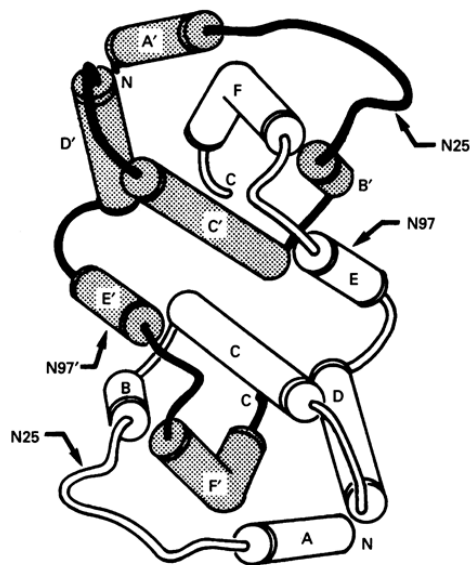


Figura No. 1: Esquema representativo de los sitios de N-glicosilación en la estructura del dímero de IFN- γ . Estructura tridimensional del homodímero de IFN- γ , donde las hélices α se representan en cilindros y las regiones no helicoidales se muestran como tubos; así mismo, los sitios de N-glicosilación se muestran con flechas. Tomado de Sareneva *et al.*, 1995.

Por otro lado, se diferencia de los interferones tipo I en que éste se une a su propio receptor. Los interferones tipo I se unen a receptores compuestos por dos subunidades, IFNAR1 e IFNAR2 presentes en la superficie de células humanas (Mata-Espinosa & Hernández-Pando, 2008). El Interferón gamma se une a su propio receptor de superficie presente en casi todas las células sanguíneas excepto en eritrocitos maduros (ver Figura No. 2). Este receptor está compuesto por un tetrámero resultado de la asociación del IFN γ R1 (es un dímero de dos cadenas denominadas α) y del IFN γ R2 (que es un dímero de proteínas llamadas cadena β). La cadena IFN γ R1 se une a su ligando IFN- γ , facilitando la unión de las dos proteínas del IFN γ R2 al complejo IFN γ R1/IFN- γ ; necesario para la transducción de

señales. Las cadenas del receptor están asociadas con quinasas citoplasmáticas JAK1 y JAK2 respectivamente; su activación es mediante fosforilación una vez que se ha llevado la unión al ligando, generando así la activación transcripcional de los genes inducibles a través de la vía de señalización JAK-STAT1 (Janus-Quinasa/Transductor de señal y activador de la transcripción 1). En esta vía los STAT activados por fosforilación se translocan al núcleo actuando como factores de transcripción uniéndose a secuencias de activación de IFN- γ o GAS (sitio de activación de IFN- γ) de genes inducibles de IFN- γ presente en los promotores de los genes estimulados por IFN (ISG). Así, el efecto del IFN- γ sobre la activación de vías de señalización puede mediar respuestas antiproliferativas, apoptóticas, etc. dependiendo de los niveles de expresión de los genes (C. Platánias, 2005; Mata-Espinosa & Hernández-Pando, 2008; Zaidi & Merlino, 2011; Shtrichman and Samuel, 2001).

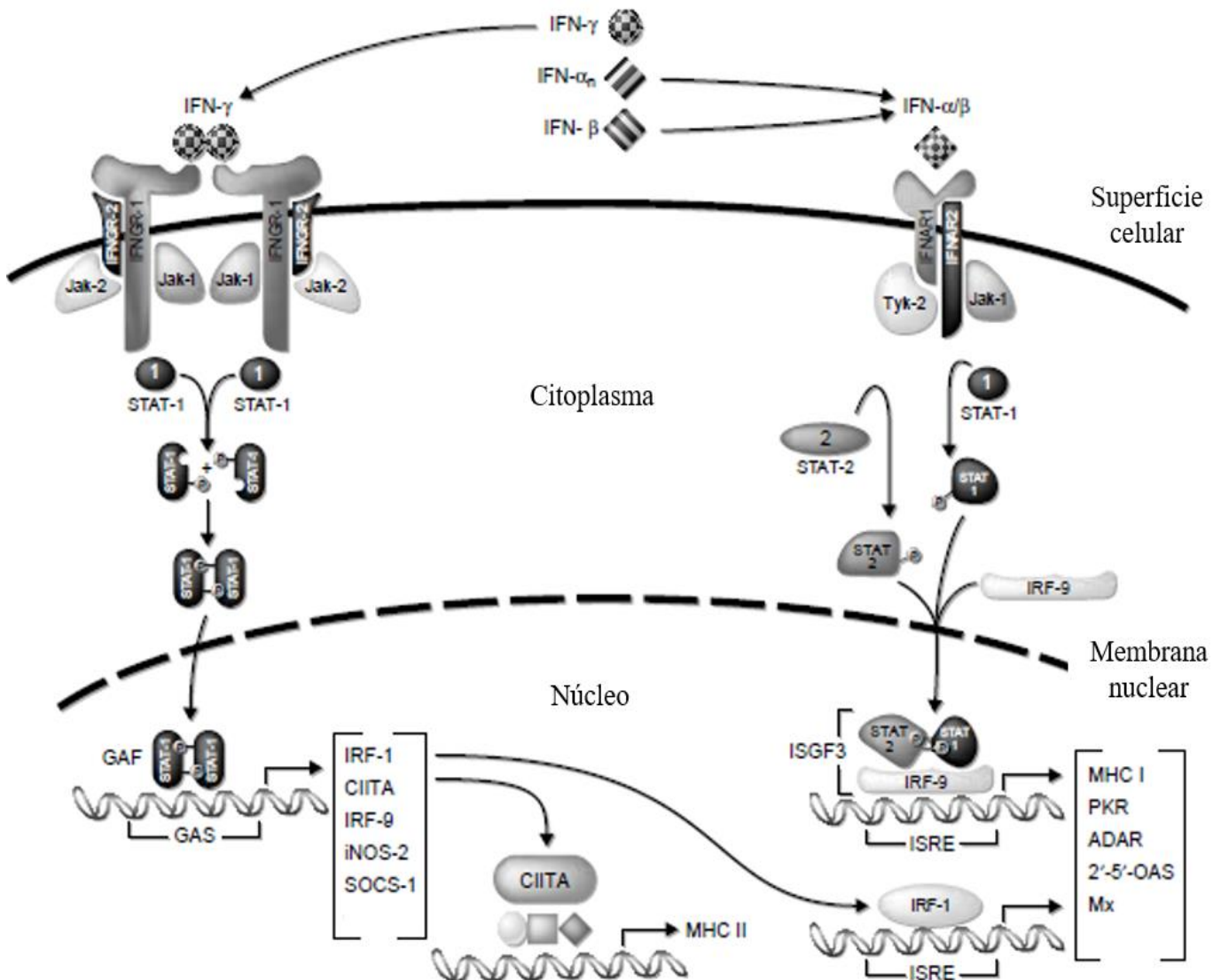


Figura No. 2: Receptor de IFN- γ tipo II. El Interferón gamma se une a su propio receptor de superficie en casi todas las células, excepto en eritrocitos maduros; el cual está compuesto por dos subunidades IFN γ R1 e IFN γ R2 que están asociadas con JAK1 y JAK2, respectivamente (Tomado y modificado de Shtrichman and Samuel, 2001).

Las células capaces de producir Interferón gamma son los linfocitos T y B, los macrófagos y las células NK, así como las células dendríticas y neutrófilos. Diferentes interleucinas como la IL-2, IL-18, IL-12 y el Interferón α , son capaces de promover también su producción (Mata-Espinosa & Hernández-Pando, 2008).

Su importancia radica en sus múltiples actividades biológicas siendo una proteína con capacidad de inhibir la replicación de los virus, madurar y activar a las células dendríticas e incrementar la expresión de moléculas del sistema principal de histocompatibilidad de clase I y clase II. También es un potente estimulador de los macrófagos aumentando su actividad tumoricida y fagocítica, activa a células inmunes facilitando la presentación de antígenos a los linfocitos T para que puedan reconocer y eliminar más fácilmente a las células tumorales, así como también regula la producción de anticuerpos por las células B y estimula la diferenciación de células TH₁ (Smith & Denning, 2014).

2.9 Terapia con Interferón gamma.

Actualmente en el mercado existe Interferón gamma recombinante, fabricado por Horizon Pharma, bajo el nombre comercial de **Actimmune o Imukin** por Boehringer Ingelheim Pharma. Es una solución inyectable de Interferón gamma-1b un polipéptido de aproximadamente 140 aa producidos por fermentación en *E. coli* cuyos monómeros son no glicosilados con un peso ~16 kDa. Ambos medicamentos se administran de forma subcutánea y están indicados para reducir la frecuencia de infecciones severas en pacientes con enfermedad Granulomatosa crónica y Osteopretosis maligna grave. También se ha demostrado que Actimmune es efectivo contra una variedad de enfermedades, incluyendo cáncer, tuberculosis, fibrosis pulmonar idiopática, esclerodermia, hepatitis, etc. (Miller, Maher y Young, 2009). Ambos, se administran en dosis de 50 mcg/m² tres veces por semana (tratamiento costoso) en pacientes con una superficie corporal mayor de 0,5 m² y de 1,5 μ g/Kg/dosis en pacientes cuya superficie corporal es igual o menos de 0,5 m², por lo que no se recomiendan dosis por arriba o debajo de la indicada ya que no se ha demostrado la seguridad y eficacia de las mismas. Por lo que si se producen reacciones adversas severas (síntomas similares a la gripa como fiebre, escalofríos, cefalea, fatiga, mialgia; así como neutropenia reversible, trombocitopenia severa, diarrea, vómitos, etc.), la

dosis debería ser reducida al 50% o suspender el medicamento (Horizon, 2019; Sanitarios, 2018).

En general, el tratamiento con Interferón gamma recombinante es bien tolerado, pero dada la toxicidad es un campo abierto para la búsqueda de nuevas formas que reduzcan los efectos adversos.

III. ANTECEDENTES

3.1 Expresión de IFN- γ en sistemas hospederos.

El Interferón gamma se ha venido desarrollando desde hace más de 30 años por su infinidad de efectos para la defensa del huésped (acción en la inmunidad innata y adaptativa) buscándose mejorar cada vez su expresión y calidad. Principalmente se ha expresado en sistemas bacterianos como *E. coli* (monómero de 17 kDa no glicosilado con una vida media en el torrente sanguíneo corta probablemente a su falta de glicosilación) pero dentro de sus desventajas es que está en forma de cuerpos de inclusión insolubles que deben replegarse de manera *in vitro* dificultando la purificación posterior haciéndolo más costoso (García *et al.*, 2013).

Sin embargo, a pesar de estar ya en el mercado, se ha buscado sobreexpresar en otros sistemas hospederos para mejorar su actividad biológica, semivida en el torrente sanguíneo y proceso de purificación. Uno de ellos es las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), donde se determinó en esta última que debido a la baja producción obtenida no es económicamente viable para su uso. Así mismo, se han utilizado células de mamífero (CHO), líneas de células de insecto (infectados con Baculovirus) y vectores virales (Adenovirus, Lentivirus) para la expresión del hIFN- γ ; obteniendo altos costos de cultivo, contaminación cruzada, bajos rendimientos, entre otros. A pesar de estos inconvenientes, el uso de líneas celulares de mamífero sigue en pie ya que algunos estudios han demostrado que una glicosilación adecuada puede mejorar las propiedades de las proteínas recombinantes al aumentar su estabilidad, vida media en la circulación sanguínea y disminuir su inmunogenicidad. Por lo tanto, una forma de favorecer la glicosilación igual a la humana es el utilizar líneas celulares de mamíferos humanas para dicha producción proteica (Razaghi, Tan, *et al.*, 2016).

3.2 Estándar de IFN- γ producido en diversos sistemas de expresión.

Existe IFN- γ estándar el cual ha sido expresado de manera recombinante en distintos sistemas de sobreexpresión como *E. coli*, células HEK293 y CHO. A continuación, se describen sus características principales.

El Interferón gamma humano recombinante expresado en *E. coli* se presenta como una glicoproteína con una masa molecular de ~17 kDa (no glicosilado) en un análisis por geles SDS-PAGE (ver Figura No. 3) y es distribuido por Sigma-Aldrich (No. Catálogo: I3265).

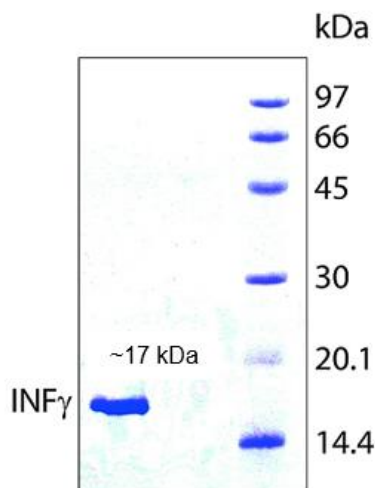


Figura No. 3: Estándar de IFN- γ recombinante expresado en *E. coli*. Peso molecular ~17 kDa (no glicosilado). Análisis en SDS-PAHE, teñido con azul Coomassie. Tomado del sitio web de Merck, Sigma-Aldrich®, No. Catálogo: I3265, información actualizada 2014. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/2/i3265dat.pdf>.

Por otro lado, el Interferón gamma humano recombinante expresado por las células HEK293, también de compañía Sigma No. de Catálogo: I17001, se presenta como una glicoproteína con una masa molecular de 16 kDa (no glicosilado) y entre 18-25 kDa (glicosilado) a través de geles SDS-PAGE (ver Figura No. 4).

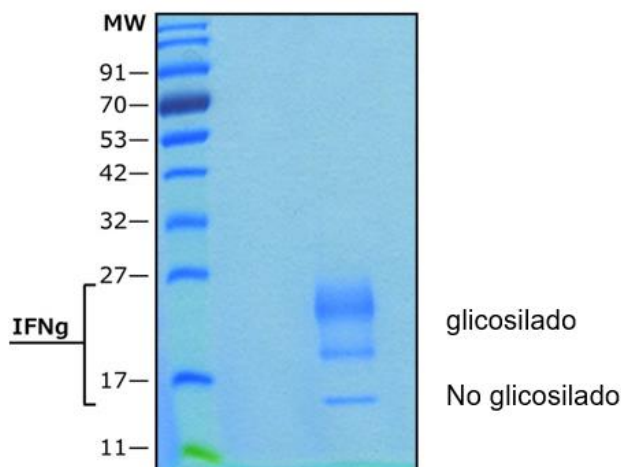


Figura No. 4: Estándar de IFN- γ expresado en células HEK293. Peso molecular SDS-PAGE 18-25 kDa (glicosilado). Tomado del sitio web de Merck, Sigma-Aldrich®, 2019, No. Catálogo: I17001. Información actualizada 2019. Link: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Datasheet/11/i17001dat.pdf>.

Finalmente, el Interferón gamma humano recombinante expresado por las células CHO (No. de Catálogo: 11725-HNAS) migra como dos bandas en SDS-PAGE con una masa molecular entre 21-25 kDa probablemente a las diferencias en la glicosilación (ver Figura No. 5).

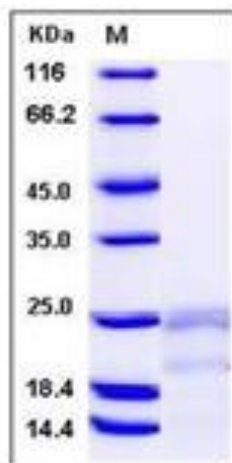


Figura No. 5: Estándar de IFN- γ expresado en células CHO. Peso Molecular SDS-PAGE entre 21-25 kDa. Tomado de Sino Biological Inc., No. de Catálogo: 11725-HNAS. Información actualizada 2007-2020. Link: <https://www.sinobiologicalcdn.com/reagent/GMP-11725-HNAS.pdf>.

3.3 Producción de IFN- γ por un sistema de expresión transitorio Ad5/IFN- γ

En el grupo de investigación de la Dra. Angélica Meneses Acosta se han realizado diferentes proyectos de investigación para el uso de sistemas adenovirales para transfectar diferentes genes. Uno de ellos fue desarrollo por la MF Nadia Romero Martínez en el año 2014, quien consiguió un sistema de expresión transitorio (Ad5/IFN- γ) en la línea celular HEK293 (Romero Martínez, 2014).

Posteriormente, el proyecto de tesis de maestría de LF Concepción Sosa García tuvo como objetivo evaluar el efecto de la Multiplicidad de Infección y la Densidad Celular sobre el metabolismo celular, la producción del Interferón gamma humano y el título adenoviral, utilizando el vector ya descrito. De acuerdo con los resultados (ver Figura No. 6) se concluyó que las células HEK293 son capaces de expresar y secretar la proteína de interés alcanzando una máxima productividad de IFN- γ de 19.2 pg/mL a las 120 h de cultivo y en la combinación de la densidad de 0.6×10^6 cél/mL a la MOI más alta (5) (Sosa García, 2018).

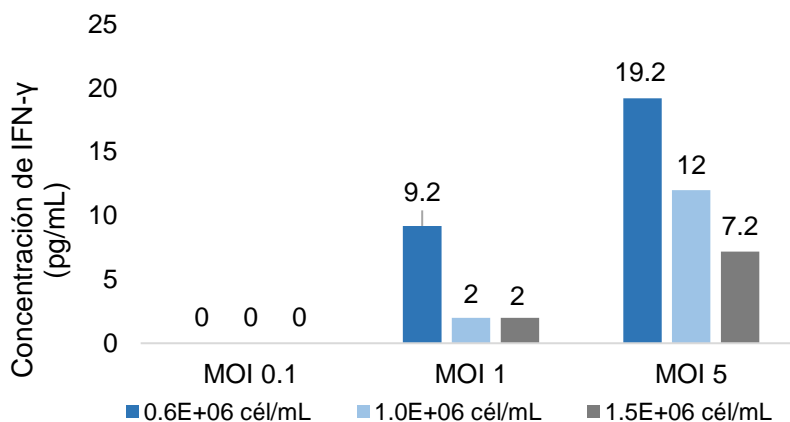


Figura No. 6: Producción de IFN- γ en células HEK293 usando el sistema Ad5/IFN- γ . Se observa que la mejor productividad alcanzada es a MOI 5 a una densidad celular de 0.6×10^6 células/mL. Tomado de Sosa García, 2018.

Por otro lado, el trabajo de investigación para la titulación de Licenciatura de Yoanna García López, se observó que una línea celular A549 (cancerígena de pulmón), si es capaz de expresar también el Interferón gamma humano usando este sistema de transfección, aunque su producción alcanzada es baja de 5.33 pg/mL (MOI 10) a las 144 h de cultivo (García López, 2018). Así también, el LF. Uriel Abdallah Sánchez Pacheco demostró que el Interferón gamma se expresa en las células MCF-7 obteniendo una producción de 7 pg/mL (MOI 15) y 18.67 pg/mL (MOI 30) a las 120 h de cultivo (Sánchez Pacheco, 2017).

Por lo tanto, con base a estos resultados es evidente que el sistema transitorio no es adecuado para obtener una alta productividad proteica el cual es un impedimento para caracterizar completamente la proteína de interés; si se busca evaluar su actividad biológica *in vitro* e *in vivo*, así como su patrón de glicosilación. Por lo tanto, se requiere de la búsqueda de nuevas alternativas para obtener mayor productividad proteica, así como mejor calidad y que puedan tener un uso de potencial terapéutico. Proponemos que las líneas celulares con expresión estables son un sistema adecuado para que nos permitan alcanzar a periodos largos una mayor concentración del producto.

3.4 Desarrollo de líneas celulares estables.

El desarrollo de líneas celulares estables se ha utilizado para aplicaciones en estudios de función genética, ensayos de descubrimiento de fármacos o la producción de proteínas terapéuticas (anticuerpos monoclonales o PR). La ventaja de producir líneas estables es que se puede ampliar y lograr un alto rendimiento del producto donde su construcción generalmente toma tres pasos: (1) entrega del gen de interés al genoma de la célula hospedera (mediante integración aleatoria o dirigida a través de vectores de expresión); (2) selección y detección de clones con expresión estable a través de marcadores de selección añadidos en los vectores de expresión y (3) realización de pruebas de estabilidad para asegurar la expresión de la proteína en el transcurso del tiempo. Hasta ahora, ha sido un reto importante lograr su desarrollo para muchos tipos de células (por ejemplo, MCF7 o U937) ya que las eficiencias de transfección y/o las frecuencias de integración han sido bajas. Sin embargo, los métodos de transfección comunes como la lipofección, el uso de agentes catiónicos y en casos muy específicos la biobalística, se han usado para la expresión estable en líneas celulares fáciles de transfectar como HeLa, HEK293, COS-7 o CHO. Además, existen sistemas que facilitan la selección de células transfectadas como la resistencia a antibióticos (neomicina fosfotransferasa), resistencia metabólica (glutamina sintetasa) o el uso de marcadores fluorescentes (GFP) (Lonza Cologne, 2012).

En la Tabla No. 2 se muestran las diversas líneas estables desarrolladas que expresan diversas proteínas de mamíferos tanto citosólicas, de membrana como de secreción. Las cuales han utilizado medios de transferencia como lipofección o electroporación, vectores de expresión como pcDNA3(+), pSGHV0, pNUT con marcadores de selección a antibióticos (G418, puromicina) entre otros sistemas de integración dirigida (RMCE, integrasas Φ C31); siendo las líneas celulares CHO y HEK293 los hospederos más utilizados para la expresión de proteínas recombinantes (Büssow, 2015).

Tabla No. 2: Proteínas de secreción, de membrana y citosólicas producidas por líneas celulares estables. La búsqueda se realizó en el Banco de datos de proteínas (PDB) donde fueron excluidos los anticuerpos. Tomado de Büsow, 2015.

	Crystallized protein	Host cell line ^a	Vector	Stable cell line generation ^b	PDB entry and Ref.
Cytosolic proteins	mTOR:LST8 complex	HEK293-F	pcDNA 3.1 (+)	Co-expression of mTORC subunits using different antibiotics	PDB: 4JSN [27]
Membrane proteins	Rhodopsin	HEK293 GnTI ⁻			PDB: 4BEY [54]
Secreted proteins	GABAA receptor	HEK293S GnTI ⁻			PDB: 4COF [55]
	5-HT3A receptor	T-REx-293	pcDNA5/TO		PDB: 4PIR [56]
	Prothrombin	BHK	pNUT	Lipofection, MTX	PDB: 4HZH [57]
	Aminopeptidase N	CHO Lec3.2.8.1	pBJ5-GS	MSX	PDB: 4F5C [22]
	Integrin α_4	CHO Lec3.2.8.1	pcDNA3.1/Hygro		PDB: 4IRZ [58]
	MHC class II HLA-DQ1: antigen:TCR complex	CHO Lec3.2.8.1	pEE13.1	MSX	PDB: 4GRL [21]
	CD200 receptor	CHO Lec3.2.8.1	pEE14		PDB: 4BFE [59]
	DC-LAMP	CHO Lec3.2.8.1	pFS-sigHis	Electroporation, RMCE, G418	PDB: 4AKM [39]
	Neuroigin-1	CHO Lec3.2.8.1	pSGHV0	Electroporation, puromycin	PDB: 3VKF [60]
	HLA-DM	CHO Lec3.2.8.1			PDB: 4FOX [61]
	ICAM-5	CHO Lec3.2.8.1		MSX	PDB: 4OI9 [20]
	Tyrosine kinase receptor RET	CHO Lec8	pcDNA3	Lipofection (Effectene), G418	PDB: 4UX8 [62]
	Insulin receptor	CHO Lec8	pEE14	Lipofection (Lipofectamine 2000), MSX	PDB: 3W11 [23]
	Cholesteryl ester transfer protein	CHO DG44			PDB: 4F2A [63]
	Receptor tyrosine-kinase erbB-4	CHO Lec1	pSGHV0	Lipofection (Fugene), pcDNA3.1 co-transfection, G418	PDB: 3U7U [64]
Folate receptor α	CHO duk ⁻ (kifu.)	pSGHV0	Electroporation, MTX	PDB: 4KM6 [14]	
Acetylcholinesterase	CHO-K1	pGS	jetPEI, MSX	PDB: 4BDT [24]	
LIMP-2	HEK293S GnTI ⁻	pNeoSec	Φ C31 integrase (stable cell pool)	PDB: 4Q4B [42]	
Glutamate receptor 4	HEK293 GnTI ⁻	pHLsec		PDB: 4GPA [65]	
Tumor antigen 5T4/WAIF1	HEK293 GnTI ⁻	pURD	Φ C31 integrase, puromycin	PDB: 4CNC [48]	
Transcobalamin-1	HEK293 GnTI ⁻		Lipofection (lipofectamine)	PDB: 4KKI [66]	
Integrin $\alpha_x\beta_2$ heterodimer	HEK293S GnTI ⁻	ET1 (pIRES2-EGFP), pEF1-puro	Ca-phosphate, FACS, puromycin, G418	PDB: 4NEH [29]	

3.5 Línea celular HEK293.

Son células epiteliales proveniente de riñón embrionario humano, *in vitro*, se caracterizan por crecer en monocapa en forma adherente utilizando medios basales como: MEM o DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium F12) suplementados con 10% de suero fetal bovino. Es una línea celular humana hipotriploide con 64 cromosomas, siendo la primera en ser transformada utilizando fragmentos de ADN de adenovirus serotipo 5, a través de la técnica de transfección con calcio desarrollada por *Graham y Van Der Eb*. El número 293 fue designado de acuerdo al hábito de *Graham* de enumerar sus experimentos. Desde entonces, ha habido diversas variantes de la línea original, como por ejemplo la 293N3S y la línea 293S; donde ésta última ha sido adaptada para crecer en condiciones libres de suero (Bandaranayake y Almo, 2014).

Esta línea celular se utiliza para producir virus, vacunas, vectores virales y proteínas recombinantes, lo cual resulta ser una herramienta atractiva para producir proteínas de

expresión transitoria y estable debido a su capacidad de generar modificaciones postraduccionales complejas como la glicosilación obtenido así proteínas iguales a las que se producen de manera natural endógena por lo que su inmunogenicidad se verá reducida. Hasta la fecha se han aprobado por la FDA algunos agentes terapéuticos producidos en células HEK293 para su uso en la medicina clínica como son: Drotrecogina alfa (XIGRIS®, Eli Lilly Corporation, Indianápolis, IN), proteína de fusión recombinante factor IX Fc (rFIXFc, Biogen, Cambridge, MA), proteína de fusión recombinante factor VIII Fc (rFVIII Fc, Biogen, Cambridge, MA), línea celular humana factor VIII recombinante (human-cl rhFVIII; NUWIQ®; Octapharma, Lachen, Suiza) y Dulaglutida (TRULICITY®; Eli Lilly, Indianápolis, IN) (Dumont, J. *et al.* 2016; Sosa García, 2018).

Las principales ventajas que ofrece el uso de las células HEK293 son:

- Su susceptibilidad a varios métodos de transfección por lo que presentan una alta eficacia y se consideran buenos hospederos para la expresión génica.
- Los cultivos celulares son fácilmente propagables y escalables, para la producción de proteínas recombinantes.
- Se pueden cultivar y adaptar en suspensión en medios químicamente definidos libres de suero permitiendo densidades más altas que sí se encuentran en monocapa. Pero presentando un Td más lento ~30-34 h.
- Debido a su capacidad de crecimiento en medios sin SFB asegura la pureza de los productos, ya que el suero contiene contaminantes como endotoxinas, virus, etc. Siendo más fácilmente su posterior purificación, con rendimientos más altos.
- Rapidez de subcultivos en suspensión, ya que solamente se realiza por diluciones (Dumont, J. *et al.* 2016).

IV. JUSTIFICACIÓN

El Interferón gamma (tipo II) es una citocina pleiotrópica con funciones biológicas del tipo antiviral, antiproliferativa, antitumoral, inmunoestimuladora, etc., actuando tanto en la inmunidad innata como adaptiva, lo cual representa de interés farmacéutico para generarse de manera recombinante. A pesar de que existe rhIFN- γ comercial producido en *E. coli* se han buscado nuevas alternativas para producirlo con mejor calidad y potencial terapéutico; dado que éste es un monómero no glicosilado con una vida media más corta en comparación a la forma glicosilada, además, de su alto costo. Por otro lado, las líneas celulares de mamífero se han convertido en los hospederos más adecuados para producir proteínas recombinantes complejas ya que son capaces de generar modificaciones postraduccionales (glicosilación), plegamiento correcto de la proteína y secretar el producto al medio de cultivo, siendo la línea celular HEK293 la más utilizada y aprobada por la FDA dada a su capacidad de generar proteínas recombinantes glicosiladas iguales a las proteínas humanas endógenas resultando ser menos inmunogénicas. Además, la generación de líneas celulares de mamífero con expresión estable se está convirtiendo en sistemas esenciales para estudiar y caracterizar mejor la función y estructura de las proteínas a pesar de los protocolos de transfección transitoria altamente eficientes ya que sobreexpresan la proteína de interés de manera uniforme e indefinida, logrando producir altas concentraciones para dichos fines.

Por esta razón, el presente trabajo plantea desarrollar líneas celulares HEK293 con el vector recombinante pcDNA3+/IFN- γ para que expresen de manera estable el Interferón gamma humano con la finalidad de obtener mayores productividades en comparación con el sistema de expresión transitorio (Ad5/IFN- γ).

V. HIPÓTESIS

Las líneas celulares HEK293 recombinantes son capaces de expresar de manera estable el Interferón gamma humano en mayor concentración comparado con el sistema de expresión transitorio Ad5/IFN- γ .

VI. OBJETIVOS

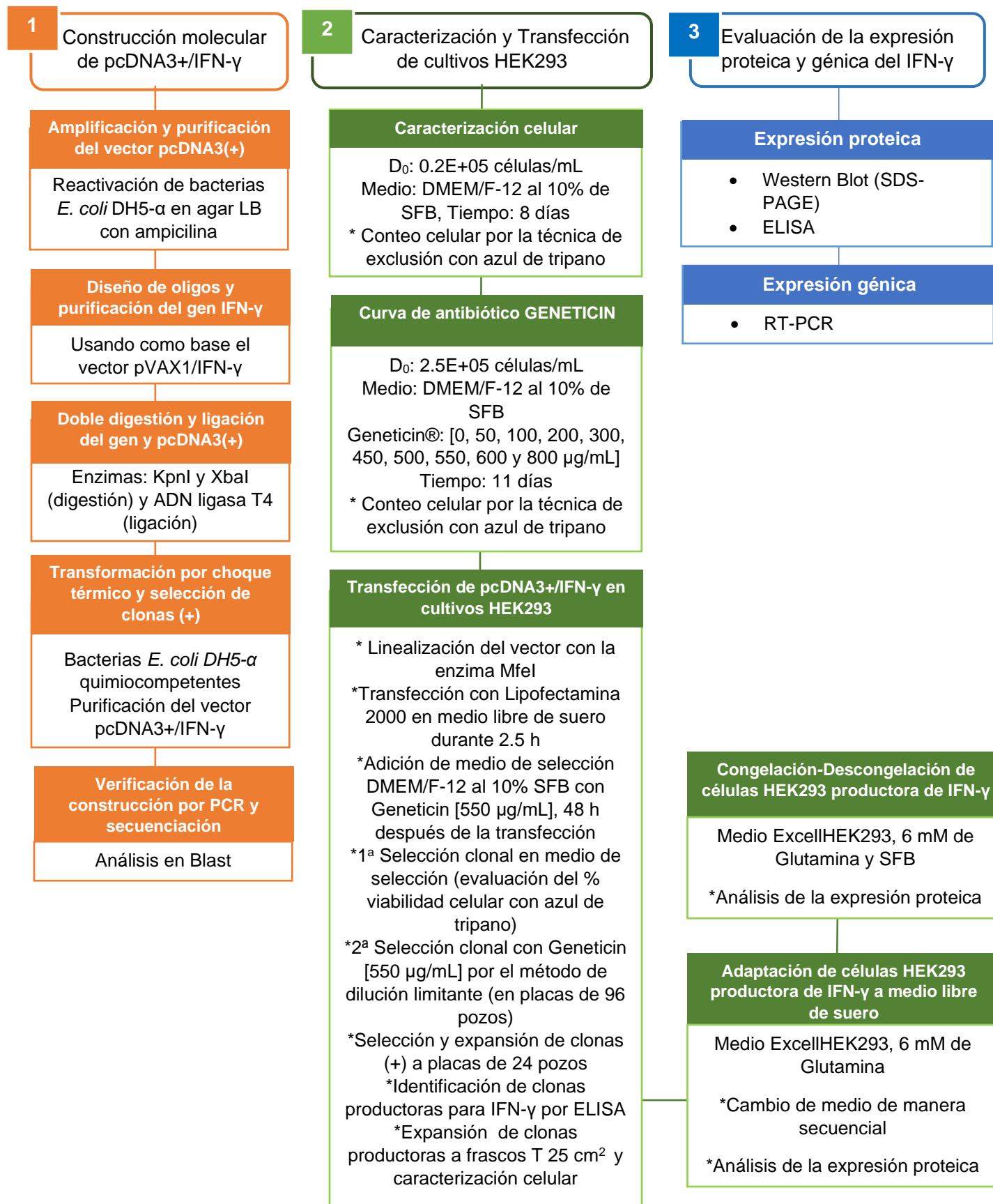
6.1 OBJETIVO GENERAL:

Desarrollar líneas celulares HEK293 que expresan de manera estable la proteína de Interferón gamma humano para obtener mayores productividades comparado con un sistema de expresión transitorio Ad5/IFN- γ .

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Realizar la construcción y amplificación molecular del vector pcDNA3(+) que exprese el transgén del Interferón gamma humano para ser clonado de manera estable en la línea celular HEK293.
- Desarrollar líneas celulares HEK293 que contengan el vector pcDNA3+/IFN- γ , así como seleccionar y caracterizar las clonas más productoras de Interferón gamma humano para comparar con la expresión transitoria.
- Evaluar la expresión génica y proteica del Interferón gamma humano mediante técnicas moleculares, inmunoenzimáticas y analíticas para evaluar la estabilidad de dicha molécula.

VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Vector plasmídico pcDNA3(+).

Es un vector de expresión de mamífero de la compañía Invitrogen (ver Figura No. 7), el cual contiene un promotor de citomegalovirus (CMV), un origen de replicación episomal SV40, una señal poli A del gen de la hormona de crecimiento bovino (BGH) y una secuencia de finalización de la transcripción para una mayor estabilidad de ARNm, así como un promotor T7 para la expresión de genes en bacterias, Sp6 y genes de resistencia a antibióticos (ampicilina, para la selección en bacterias por ejemplo *E. coli*; y neomicina para células de mamífero). Presenta un tamaño alrededor de 5.4 kb y en su sitio múltiple de clonación contiene sitios de reconocimiento para las enzimas KpnI y XbaI (Invitrogen, 2010). El vector fue proporcionado amablemente por el Dr. Oscar Peralta Zaragoza del CISEI-INSP.

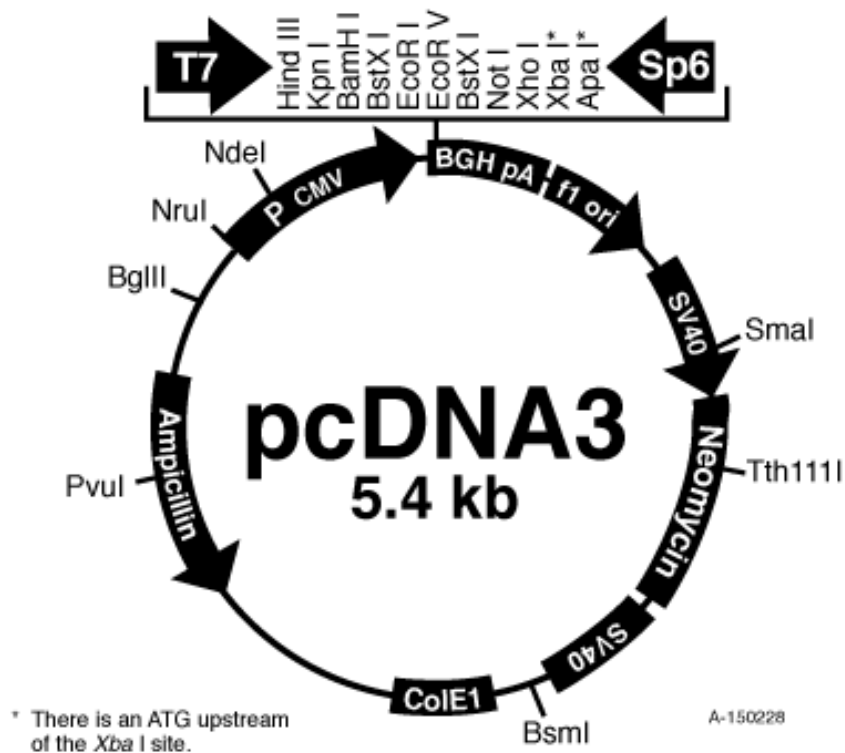


Figura No. 7: Vector pcDNA3(+). Características principales del vector, el cual contiene un sitio múltiple de clonación, un origen de replicación episomal SV40, un promotor de citomegalovirus (CMV), genes de resistencia a antibióticos como ampicilina y neomicina, este último para células de mamífero; presentando un tamaño de 5.4 kb. Tomado de Invitrogen, 2010.

8.1.1 Reactivación de bacterias *Escherichia coli* DH5- α con el vector plasmídico pcDNA3(+).

Con la finalidad de tener suficiente cantidad de plásmido para experimentos subsecuentes, se reactivaron células *Escherichia coli* DH5- α (Las cuales fueron proporcionadas por el Dr. Adelfo Escalante Lozada, IBT-UNAM) las cuales contienen el plásmido pcDNA3(+) integrado, creciéndolas en medio de cultivo LB (Luria Bertani) mediante el siguiente protocolo:

- a) Se agregaron 100 μ L de bacterias *Escherichia coli* DH5- α con el plásmido pcDNA3(+) a cajas Petri con medio LB con ampicilina 100 μ g/mL.
- b) Para obtener colonias aisladas transformadas con el plásmido mencionado, se utilizó el método de siembra por estría por agotamiento.
- c) Finalmente, se almacenaron los cultivos en condiciones de crecimiento en la incubadora MRC ORBITAL SHAKER INCUBATOR a 37°C durante 12 h.
- d) Al término del tiempo de incubación se realizó una segunda selección de colonias positivas, estriando la colonia en otra caja con medio LB y antibiótico como en los pasos anteriores.
- e) Se monitoreó el crecimiento de las colonias positivas para su posterior amplificación y purificación en medio LB líquido y Miniprep (No. de Catálogo: #K0503, No. de Lote: 00138812), así mismo se guardaron las placas a 4°C hasta su uso.

8.2 Bacterias *E. coli* DH5- α /pcDNA3(+) en medio LB líquido.

Después de la reactivación del plásmido se eligieron colonias aisladas del segundo crecimiento; obtenidas de la sección Materiales y métodos 8.1.1, para pasarlas a medio LB líquido con antibiótico con el fin de que continúen en crecimiento y realizar su posterior purificación. Brevemente el método de purificación bajo condiciones estériles fue el siguiente:

- a) Se marcaron para su análisis, las colonias aisladas de la segunda selección.
- b) A través de una punta de 1000 μ L estéril, se recogió cada colonia (del paso a) y se colocó en un tubo con medio LB líquido más antibiótico (100 μ g/mL), resuspendiendo correctamente. Nota: Se incubaron las colonias a 37°C en el equipo MRC ORBITAL SHAKER INCUBATOR, durante 12 h a 200 rpm.
- c) Acabado el tiempo de incubación, se purificaron las colonias a través del kit Miniprep (ver protocolo más adelante).

8.2.1 Purificación del vector plasmídico pcDNA3(+) a través del kit Miniprep.

Se utilizó el kit GeneJET Plasmid Miniprep de la compañía Thermo Fisher Scientific (No. de Catálogo: #K0503, No. de Lote: 00138812), para purificar el plásmido de estudio. Este tipo de material permite recuperar hasta 20 µg de ADN plasmídico a través de columnas giratorias GeneJET con membranas de base de sílice; a partir de cultivos recombinantes de *E. coli* en medios líquidos. La metodología que se llevó a cabo fue la siguiente:

- a) Se retiró la punta de 1000 mL del tubo con medio (anterior metodología) y se centrifugó a 8000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente.
- b) Se desechó el sobrenadante y se agregaron 250 µL de Solución de resuspensión para resuspender adecuadamente el pellet celular.
- c) Posteriormente, se transfirió la solución a tubos Eppendorf de 1.5 mL estériles y se agregaron 250 µL de Solución de lisis. Se mezclaron por inversión los tubos de 4-6 veces y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 min.
- d) Se agregaron 350 µL de Solución de neutralización frío y se mezclaron los tubos inmediatamente por inversión de 4-6 veces.
- e) Se centrifugaron los tubos durante 5 min a 14000 rpm y temperatura ambiente; y se transfirieron los sobrenadantes a columnas Spin GeneJET.
- f) Las columnas se centrifugaron a 14000 rpm durante 1 min y a temperatura ambiente, para que el ADN del plásmido quedara impregnado en la membrana.
- g) Posteriormente, se agregaron 500 µL de Solución de lavado y se centrifugaron las columnas a 14000 rpm durante 30-60 s a temperatura ambiente (Nota: Se repitió el lavado).
- h) Se desechó el sobrenadante y se centrifugó la columna una vez más a 14000 rpm durante 1 min.
- i) Se transfirió la columna GeneJET a un tubo Eppendorf y se añadieron 50 µL de Buffer de elución. Nota: Evitar tocar la membrana de la columna.
- j) Se descartó la columna, y, se etiquetó y cuantificó el ADN plasmídico en el equipo NanoDrop 2000 (ver protocolo en la sección de anexos 15.6).
- k) Finalmente, se almacenaron las muestras a -20°C hasta su uso.

8.3 Digestión de pcDNA3(+).

Una vez purificado el ADN plasmídico y para verificar que se obtuviera el plásmido pcDNA3(+), se procedió a realizar una digestión con la enzima FastDigest BamHI 10 U/ μ L, Thermo Scientific (No. de Catálogo: #FD0058, No. de Lote: 00136112) de acuerdo a las condiciones de reacción que se detallan en el manual de la enzima. Por lo tanto, se llevó a cabo la siguiente metodología:

- a) En tubos Eppendorf se colocó 1 μ L de la enzima FastDigest BamHI, 2 μ L de Buffer 10X FastDigest Green (Concentración final 1X, Thermo Scientific, No. de Lote: 00133213), 1 μ L de ADN purificado y 16 μ L de Agua libre de nucleasas (Thermo Scientific, No. de Catálogo: R0581, No. de Lote: 00114842). A continuación, se presenta los respectivos sitios de corte de la enzima BamHI:



- b) Se incubaron las reacciones a 37°C durante 5 min en el equipo ThermoBlock y se evaluó la digestión a través de un gel de agarosa al 1% bajo las siguientes condiciones: 80 Volts, 150 mA durante 1 h (ver preparación de geles de agarosa en la sección de Anexos No. 15.8). Nota: El Marcador de peso molecular utilizado fue O'Gene Ruler™ 1 kb ADN Ladder (No. de Catálogo: #SM1163, No. de Lote: 0079556).

8.4 Construcción del vector de expresión pcDNA3+/IFN- γ .

8.4.1 Vector plasmídico pVAX1/IFN- γ .

El vector pVAX1 es un vector de expresión en células animales el cual contiene un promotor de citomegalovirus (CMV), un sitio de replicación bacteriano (pUC ori), un gen de resistencia a Kanamicina, un sitio múltiple de clonación y un tamaño alrededor de 3.0 kb. Sin embargo, la construcción final del vector recombinante pVAX1/IFN- γ creado fue de 3.5 kb (ver Figura No. 8) (Romero Martínez, 2014).

No. 9, se puede observar la secuencia de IFN- γ con el diseño de las secuencias de las enzimas:

(EnzimaKpnI)GGTACCATGAAATATACAAGTTATATCTTGGCTTTTCAGCTCTGCATCGT
TTTGGGTTCTCTTGGCTGTTACTGCCAGGACCCATATGTAAAAGAAGCAGAAAACCTT
AAGAAATATTTTAATGCAGGTCATTAGATGTAGCGGATAATGGAAGCTTTTTCTTAGG
CATTTTGAAGAATTGGAAAGAGGAGAGTGACAGAAAAATAATGCAGAGCCAAATTGTC
TCCTTTTACTTCAAACCTTTTTAAAACTTTAAAGATGACCAGAGCATCCAAAAGAGTGT
GGAGACCATCAAGGAAGACATGAATGTCAAGTTTTTCAATAGCAACAAAAGAAACGA
GATGACTTCGAAAAGCTGACTAATTATTCGGTAACTGACTTGAATGTCCAACGCAAAG
CAATACATGAACTCATCCAAGTGATGGCTGAACTGTCGCCAGCAGCTAAAACAGGGA
AGCGAAAAGGAGTCAGATGCTGTTTCGAGGTCGAAGAGCATCCCAGTAATCTAGA(E
nzimaXbaI)

Figura No. 9: Secuencia del ADNc del gen IFN- γ . El ADNc de la proteína consta de 501 pb, en rojo se puede observar las secuencias de restricción de las enzimas KpnI y XbaI. Secuencia de IFN- γ tomada de Romero Martínez, 2014.

Se mandaron a sintetizar los oligonucleótidos diseñados en el programa SnapGene al Laboratorio especializado de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA) del IBT-UNAM. En la Tabla No. 3, se puede observar las secuencias y características principales de los oligonucleótidos finales.

Tabla No. 3: Secuencias de Oligonucleótidos sintetizados con una enzima de restricción. Se muestra la secuencia de los oligonucleótidos diseñados para amplificar los 501 pb del IFN- γ , así como su tamaño y características para amplificación.

Oligonucleótido	Secuencia (5' – 3')	Tamaño (pb)	Tm (°C)	% GC
Forward-IFN- γ -KpnI	CGC <u>GGTACC</u> GATGAAATATACAAGTTATATC	31	67.2	38.71
Reverse-IFN- γ -XbaI	CTA <u>TCTAGA</u> TTACTGGGATGCTCTTCGAC	29	69.12	44.83

Así mismo, se realizó un PCR gradiente para amplificar el gen de IFN- γ debido a que no se conocía la temperatura de alineamiento para amplificar el fragmento denominado KpnI-IFN- γ -XbaI, a partir del vector pVAX1/IFN- γ . Por lo tanto, se llevó a cabo la siguiente metodología:

- Bajo condiciones estériles se prepararon los oligonucleótidos a una concentración de 2.5 μ M, de acuerdo al reporte de síntesis de los oligonucleótidos proporcionado por la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT-UNAM.
- Posteriormente, en tubos Eppendorf se colocaron las siguientes cantidades (Volumen de cada reacción: 10 μ L):

Reactivo	Cantidad (8 reacciones totales)
Dream Taq Polimerasa (5 µL)	40 µL
Oligo Fwd-IFN-γ-KpnI (2.5 µM, 0.2 µL)	1.6 µL
Oligo Rev-IFN-γ-XbaI (2.5 µM, 0.2 µL)	1.6 µL
ADN pVax/IFN-γ (273 ng/µL, 1 µL)	8 µL
H ₂ O libre de nucleasas (3.6 µL)	28.8 µL

- c) Una vez preparadas todas las reacciones, los tubos fueron colocados en el equipo Termociclador en gradiente, en donde se utilizó el programa NRGRA dejándolas en un tiempo alrededor de 3 h. A continuación, en la Tabla No. 4 se describe el programa de PCR gradiente utilizado:

Tabla No. 4: Programa de PCR gradiente. Condiciones de PCR gradiente utilizándose temperaturas de alineamiento entre 53-66°C.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	10 min	1
Desnaturalización	95	1 min	30
Alineamiento	53-66	1 min	30
Extensión	72	1 min	30
Extensión Final	72	10 min	1
Hold	4		

- d) Finalmente, para analizar el resultado obtenido del PCR gradiente; se preparó un gel de agarosa al 1% donde se cargaron las muestras y se corrió a 80 Volts, 150 mA durante 1 h.

8.4.3.1 PCR para amplificación del gen IFN-γ a partir de geles de agarosa.

Una vez obtenida la temperatura ideal de alineamiento con los oligonucleótidos nuevos, se realizó un PCR con la finalidad de amplificar el gen IFN-γ a partir del vector pVAX1/IFN-γ. Por lo tanto, se llevó a cabo la siguiente metodología bajo condiciones estériles:

- a) En tubos para PCR se preparó una mezcla para un total de 16 reacciones, para colocar posteriormente a cada tubo un volumen final de 10 µL. Los componentes y cantidades que se ocuparon se muestran a continuación:

Reactivo	Cantidad (16 reacciones totales)
Dream Taq Polimerasa (5 µL)	80 µL
Oligo Fwd-IFN-γ-KpnI (2.5 µM, 0.2 µL)	3.2 µL
Oligo Rev-IFN-γ-XbaI (2.5 µM, 0.2 µL)	3.2 µL
ADN pVax/IFN-γ (273 ng/µL, 1 µL)	16 µL
H ₂ O libre de nucleasas (3.6 µL)	57.6 µL

- b) Posteriormente, los tubos de PCR fueron colocados en el equipo PikoReal 24 Thermo Scientific y se programó el PCR bajo las siguientes condiciones (ver Tabla No. 5):

Tabla No. 5: Programa de PCR para la amplificación del gen IFN-γ. Se muestran las condiciones necesarias para amplificar el gen, a una temperatura de alineamiento de 64°C y un total de 40 ciclos.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	30 s	40
Alineamiento	64	30 s	40
Extensión	72	50 s	40
Extensión Final	72	5 min	1
Hold	4		

- c) Acabado el tiempo del PCR, se realizó un gel de agarosa al 1% para electroforesis, donde se corrieron las muestras a 80 Volts, 150 mA durante 1 h.
- d) Posteriormente, el gel se reveló en el equipo ChemiDoc y se observó directamente a la luz UV para cortar los fragmentos del IFN-γ (520 pb) con ayuda de un scraper estéril. (Nota: Fue necesario hacer dos gels para colocar todas las muestras).
- e) Los fragmentos del gel de agarosa fueron colocados en tubos Eppendorf estériles para su posterior purificación a través del kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery de la compañía ZYMO RESEARCH. Nota: el protocolo que se utilizó se describe en la sección de anexos 15.9.
- f) Finalmente, una vez purificado el IFN-γ se cuantificó la concentración de ADN obtenido, se etiquetó y se almacenó a -20°C hasta su uso.

8.4.4 Reacción de doble digestión del pcDNA3(+) y del fragmento de IFN-γ.

Para poder realizar la ligación del vector plasmídico pcDNA3(+) con el fragmento de IFN-γ, fue necesario realizar una doble digestión enzimática. En el vector pcDNA3(+) dentro de su sitio múltiple de clonación se encuentran las enzimas de restricción KpnI y XbaI, las cuales también se encuentran integradas en los extremos 5' (KpnI) y 3' (XbaI) del IFN-γ. Por lo tanto, se realizó la siguiente metodología:

- a) En tubos Eppendorf, se colocaron los componentes de acuerdo a la Tabla No. 6.

Tabla No. 6: Condiciones para la doble digestión con las enzimas KpnI y XbaI.

Tubos etiquetados con KpnI	Tubos etiquetados con XbaI
ADN (10 µL de IFN-γ; y en diferente tubo 1 µL de pcDNA3(+))	ADN (10 µL de IFN-γ; y en diferente tubo 1 µL de pcDNA3(+))
10x Buffer KpnI (2 µL)	Buffer Tango (2 µL)
Enzima KpnI (2 µL)	Enzima XbaI (2 µL)
H ₂ O libre de nucleasas [6 µL para el tubo que contiene IFN-γ y 15 µL para el tubo con pcDNA3(+)]	H ₂ O libre de nucleasas [6 µL para el tubo que contiene IFN-γ y 15 µL para el tubo con pcDNA3(+)]

- b) Una vez preparados todos los tubos, se incubaron a 37°C durante 4 h en el equipo ThermoBlock. Acabado el tiempo de incubación, se tomaron alícuotas de 4 µL de cada tubo y el producto se verificó en un gel de agarosa al 1%. Además, se adicionó a cada tubo la misma cantidad de la siguiente enzima y Buffer.
- c) Los tubos se incubaron nuevamente durante 4 h a 37°C, con el fin de que ambas enzimas reaccionaran de manera individual en el mismo tubo de reacción.
- d) Finalmente, se corrió un gel de agarosa al 1% con el producto final de reacción y las muestras se guardaron a -20°C hasta su uso.

8.4.5 Ligación del vector pcDNA3(+) con IFN-γ.

Una vez realizada la reacción de doble digestión, se colocaron los siguientes componentes en tubos Eppendorf de acuerdo a la Tabla No. 7; para la reacción de ligación entre el vector de pcDNA3(+) e IFN-γ.

Tabla No. 7: Condiciones para la reacción de ligación.

Componente	Cantidad
ADN Vector pcDNA3(+) lineal	1.5 µL
ADN inserto IFN-γ	6 µL
Buffer de la ligasa T4 10x	2 µL
Enzima ADN ligasaT4 5 U/µL	1 µL
H ₂ O libre de nucleasas	9.5 µL

- a) Para determinar la concentración de vector e inserto a ocupar en la reacción de ligación, se utilizó un software denominado “*BioMath Calculators Molar Ratio of Insert to Vector*” de Promega.

$$\frac{\text{Longitud de inserto (kb)}}{\text{Longitud de vector (kb)}} \times \text{ng de vector} = \text{ng de inserto para una relación 1:1}$$

(1)

- b) Una vez preparada la reacción, se incubaron los tubos a 4°C durante 12 h. Posteriormente, el producto de ligación (10 µL) se transformó en células *E. coli* DH5-α quimiocompetentes, utilizando los siguientes protocolos.

8.4.6 Células bacterianas *E. coli* DH5-α quimiocompetentes.

Existen varios métodos físico-químicos para la transformación de bacterias como: electroporación, con detergentes, con vesículas lipídicas, etc.; sin embargo, el método más sencillo y utilizado es el de cloruro de calcio. Resultados previos sugieren que el calcio facilita la adsorción del ADN sobre la superficie celular y el shock térmico permite la entrada del ADN adsorbido al citoplasma de la célula (Serrano-Rivero, Hernández-García y Fando-Calzada, 2013). Por lo tanto, se llevó a cabo el siguiente protocolo para generar células competentes para su posterior transformación:

- a) Las bacterias *E. coli* DH5-α en glicerol se reactivaron en agar LB sin antibiótico, mediante la técnica de estriado por agotamiento y se incubaron a 37°C durante 12 h para su crecimiento.
- b) Posteriormente, se seleccionaron colonias aisladas y se traspasaron a un tubo estéril con 5 mL de medio LB líquido para su incubación a 37°C por 12 h a 200 rpm.
- c) Transcurrido el tiempo de incubación, se colocó un preinóculo de 500 µL de bacterias *E. coli* DH5-α a un matraz con 50 mL de medio LB líquido. Nota: Se incubó el matraz a 37°C y en agitación constante a 200 rpm; para monitorear el cultivo hasta obtener una densidad $D_{0,600}$: 0.4-0.6.
- d) Una vez alcanzada la $D_{0,600}$, el cultivo se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min y a 4°C.
- e) Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se le adicionó al pellet celular 20 mL de CaCl₂ 10 mM frío. Nota: Se homogeneizó bien el pellet celular y se incubó a 4°C durante 90 min.
- f) Acabado el tiempo de incubación, el cultivo se centrifugó durante 10 min a 4°C.
- g) Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se agregaron 2 mL de CaCl₂ frío y 1 mL de Glicerol estéril al 50%.
- h) Finalmente, se realizaron alícuotas de células quimiocompetentes; agregando 100 µL en tubos Eppendorf y almacenándolas a -70°C hasta su uso.

8.4.7 Transformación bacteriana para la amplificación del vector pcDNA3+/IFN- γ .

La transformación genética es un proceso mediante el cual la célula capta moléculas de ADN libre y las mantiene en su interior en forma de replicón extracromosómico o las incorpora a su genoma por recombinación homóloga; por lo tanto, con el objetivo de amplificar el plásmido de interés para su posterior manejo, se utilizó la técnica de transformación en bacterias *E. coli* DH5- α quimiocompetentes las cuales fueron previamente tratadas con CaCl₂. El protocolo que se llevó a cabo fue el siguiente (Serrano-Rivero, Hernández-García and Fando-Calzada, 2013):

- a) A 100 μ L de células bacterianas DH5- α quimiocompetentes se les agregaron 2 μ L del plásmido y se incubó la mezcla en hielo durante 20 min.
- b) Acabado el tiempo de incubación la mezcla sufrió un choque térmico a 42°C por 60 s y se incubó inmediatamente en hielo durante 4 min.
- c) Posteriormente, se añadieron 200 μ L de medio de cultivo LB sin antibiótico y se incubó a 37°C durante 1 h y a 150 rpm.
- d) Acabado el tiempo de incubación, el cultivo se distribuyó en cajas Petri con medio LB sólido y ampicilina 100 μ g/mL; y se incubaron a 37°C durante 24 h. (Nota: Dispersar la mezcla con perlas estériles).
- e) Al día siguiente, se observó si había crecimiento bacteriano y se realizó una segunda selección de colonias positivas. Las cajas de la segunda selección se incubaron a 37°C durante 10-12 h, y posteriormente fueron almacenadas a 4°C hasta su uso.

8.4.8 PCR de colonias positivas pcDNA3+/IFN- γ .

Se realizó un PCR de las colonias obtenidas en la sección Materiales y métodos 8.4.7; con el fin de identificar el plásmido recombinante pcDNA3+/IFN- γ . Para esto, se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- a) En tubos para PCR se colocaron los siguientes componentes a un volumen final de 10 μ L.

Reactivo	Cantidad (6 reacciones totales)
Dream Taq Polimerasa (5 μ L)	30 μ L
Oligo Fwd-IFN- γ -KpnI (2.5 μ M, 0.2 μ L)	1.2 μ L
Oligo Rev-IFN- γ -XbaI (2.5 μ M, 0.2 μ L)	1.2 μ L
ADN de colonias positivas	-
H ₂ O libre de nucleasas (4.6 μ L)	27.6 μ L

- b) Una vez preparada la mezcla, a cada tubo de PCR se le agregó una colonia positiva de las placas LB sólido más antibiótico. Nota: Se evitó la generación de burbujas y se utilizó el programa descrito en la sección Materiales y métodos 8.4.3.1.
- c) Finalmente, el producto de PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1% bajo condiciones de 80 Volts, 150 mA durante 1 h.

8.4.9 Preparación de gliceroles de colonias positivas.

Con la finalidad de criopreservar las colonias positivas que integraron el vector pcDNA3+/IFN- γ , se realizó un banco celular utilizando glicerol. Para esto, se llevó a cabo el siguiente protocolo:

- a) Se realizó la selección de colonias positivas y se traspasaron a tubos que contenían 5 mL de medio LB líquido y antibiótico; para su posterior incubación a 37°C, 200 rpm durante 12 h.
- b) Pasado el tiempo de incubación se realizaron alícuotas en tubos Eppendorf con 100 μ L de bacterias + 100 μ L de glicerol estéril 50% frío. Nota: Se etiquetaron y almacenaron a -70°C hasta su uso.

8.4.10 PCR del ADN plasmídico purificado pcDNA3+/IFN- γ .

Para obtener ADN plasmídico recombinante, fue necesario amplificar las colonias positivas en medio LB líquido más antibiótico para realizar su posterior purificación. Una vez obtenido al ADN de la construcción, se realizó un PCR punto final para verificar que efectivamente se contenga el gen de IFN- γ ; por lo tanto, se llevó a cabo el siguiente protocolo:

- a) En tubos para PCR se colocaron los siguientes componentes a un volumen final de 10 μ L.

Reactivo	Cantidad (4 reacciones totales)
Dream Taq Polimerasa (5 μ L)	20 μ L
Oligo Fwd-IFN- γ -KpnI (2.5 μ M, 0.2 μ L)	0.8 μ L
Oligo Rev-IFN- γ -XbaI (2.5 μ M, 0.2 μ L)	0.8 μ L
ADN pcDNA3+/IFN- γ (1 μ L)	-
H ₂ O libre de nucleasas (3.6 μ L)	14.4 μ L

- b) Una vez preparada la mezcla, a cada tubo de PCR se le agregó 1 μ L de ADN de cada tubo obtenido de la purificación (Colonias No. 3, 5, 8 y 9); y se colocaron las reacciones en el equipo PikoReal utilizando el programa descrito en la sección Materiales y métodos 9.4.3.1.

- c) Posteriormente, el producto de PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1% bajo condiciones de 80 Volts, 150 mA durante 1 h. Como control positivo se utilizó el pVAX1/IFN- γ , ya que se sabe que éste efectivamente contiene el gen de interés.
- d) Finalmente, se verificó el ADN mediante ensayos de restricción con la enzima KpnI incubando las reacciones a 37°C durante 5 h. El producto de digestión se visualizó en un gel de agarosa al 2%; condiciones: 50 Volts, 150 mA durante 2 h.

8.4.11 Secuenciación.

Se mandaron las muestras del ADN recombinante para secuenciación al departamento USSDNA del IBT-UNAM tomando requerimientos importantes. Checar información en la página del IBT.

La mezcla ADN/Oligo se entregó en un volumen final de 16 μ L en un tubo Eppendorf de 0.2 mL. La mezcla contuvo 10 pmol del oligonucleótido elegido (Oligo Fwd-IFN- γ , diseñado por el Laboratorio) para secuenciar y 500 ng de plásmido (1.54 μ L de ADN plasmídico a una concentración de 323.4 ng/ μ L). Los resultados proporcionados por el departamento USSDNA, fueron analizados en BLAST: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

8.5 Línea celular.

Para la realización de este proyecto se utilizó la línea celular HEK293 (ATCC® CRL-1573™) proveniente de células embrionarias de riñón humano. En la sección de Anexos No. 15.10 se observa el procedimiento para su mantenimiento en congelación y descongelación.

8.5.1 Medio de cultivo.

Para mantener las células HEK293 en crecimiento se utilizó el medio nutritivo DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) Gibco® suplementado al 10% de Suero Fetal Bovino. Este medio nutritivo contiene L-Glutamina, Clorhidrato de Piridoxina y carece de HEPES, así como de Bicarbonato de Sodio, por lo que se tienen que agregar estos reactivos al momento de preparar el medio. El Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco™, Lote: FBS 17001) utilizado fue inactivado previamente en Baño María a 56°C durante 30 min para después realizar alícuotas de 45 mL y así conservarlas a -20°C hasta su uso.

8.6 Cultivo de células HEK293.

Las células HEK293 se caracterizan por crecer en monocapa, por lo que éstas fueron mantenidas en frascos T (Corning® Flask de 25 cm²) con un volumen de 5 mL de medio DMEM/F-12 al 10% de SFB. Cuando había una confluencia mayor del 90% se realizaban los subcultivos, utilizando tripsina (0.25% tripsina-EDTA, Gibco™ Lote: 1896970) para

despegar las células del sustrato. Las células se mantuvieron en condiciones de crecimiento en la Incubadora Eppendorf New Brunswick S41i (Modelo: S41I-120-0100) a 37°C y 5% de CO₂.

8.6.1 Subcultivo de células adherentes HEK293 en frascos T 25 cm².

Bajo condiciones estériles se descongeló un vial pase 2 de células HEK293 en medio DMEM/F-12 suplementado al 10% de SFB y 4 mM de L-Glutamina (ver sección de Anexos No. 15.10); manteniéndose en condiciones de crecimiento a 37°C y 5% CO₂.

- a) Para el subcultivo celular se retiraron los frascos T 25 cm² de la incubadora Eppendorf New Brunswick S41i para su manejo.
- b) Se retiró el medio de cultivo agotado (5 mL) al frasco de desechos y se lavaron las células con 2 mL de PBS estéril de 2 a 3 veces.
- c) Posteriormente, se desechó el PBS y se agregaron 2 mL de 0.25% tripsina-EDTA estéril; para su incubación durante 3-5 min.
- d) Acabado el tiempo de incubación, sin quitar la tripsina se agregaron al frasco 2 mL de medio para destripsinizar y así poder detener la reacción.
- e) Se homogeneizó el cultivo y se colocaron los 4 mL totales a un tubo estéril para su centrifugación a 900 rpm durante 5 min.
- f) Acabado el tiempo de centrifugación, se desechó el sobrenadante para la obtención del pellet celular y se le agregó medio fresco DMEM/F-12 al 10% de SFB.
- g) Finalmente, se colocaron alrededor de 10⁵ células a la caja T 25 cm² y se almacenó nuevamente en la incubadora para su crecimiento. Nota: Se realizó el subcultivo cada 3^{er} día.

8.7 Cinética de crecimiento de células HEK293.

Se realizó una cinética de crecimiento para caracterizar la línea celular y observar la evolución de los cultivos a lo largo del tiempo. Para esto, se montó una placa de 24 pozos (Corning Incorporated Costar) con 1 mL total de medio DMEM/F-12 al 10% de SFB a una densidad celular inicial de 20000 células/mL. La placa se mantuvo en condiciones de crecimiento a 37°C y 5% de CO₂ en la incubadora Eppendorf New Brunswick S41i durante 8 días. Cada 24 h, se recolectó el pellet celular para realizar el conteo celular con la ayuda de la cámara de Neubauer y determinar la viabilidad a través de la técnica de exclusión con azul de tripano. La siguiente metodología se llevó a cabo para el montaje de la placa:

8.7.1 Montaje de células HEK293 en placa Corning Costar (24 pozos).

- a) Bajo condiciones estériles se realizó el subcultivo normal de las células HEK293 hasta la obtención del pellet celular.
- b) Al pellet celular se le agregaron 3 mL de medio fresco DMEM/F-12 al 10% SFB y se tomó una alícuota de 500 μ L para realizar el conteo celular a una dilución 1:10.
- c) Acabado el conteo, se realizaron los cálculos adecuados para hacer una dilución final de células a un volumen de 24 mL y así colocar en cada pozo una densidad inicial de 20000 células/mL.
- d) Para realizar la dilución celular final se utilizó medio fresco DMEM/F-12 al 10% de SFB, completando de medio hasta el volumen final requerido.
- e) Posteriormente, en la placa Corning se colocó 1 mL de la suspensión anterior en cada pozo (24) y se dejó incubar en condiciones de crecimiento a 37°C y 5% CO₂.
- f) Cada 24 h se recolectaron las muestras durante 8 días (3 veces por día) para determinar la concentración celular y poder establecer los parámetros cinéticos (Td y μ) mediante las técnicas de conteo y exclusión con azul de tripano. Nota: El conteo celular se realizó por triplicado.

8.8 Recolección de muestras biológicas.

Es necesario llevar a cabo correctamente la recolección de muestras biológicas como son el sobrenadante y pellet celular para las diversas técnicas de análisis. Realizando la siguiente metodología de cosecha bajo condiciones estériles:

- a) Se recolectaron los respectivos sobrenadantes de los pozos y se colocaron en tubos Eppendorf estériles. Posteriormente, se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min para eliminar los restos celulares (células muertas).
- b) Posteriormente, se colocó el sobrenadante a otro tubo Eppendorf para ser guardado a -80°C hasta su análisis.
- c) Por otro lado, para la obtención del pellet celular se lavaron los pozos con 500 μ L de PBS estéril y se agregaron 500 μ L de 0.25% tripsina-EDTA incubando durante 3-5 min.
- d) Para inactivar la tripsina, se agregaron 500 μ L de medio de cultivo con SFB y se colocó la suspensión al tubo Eppendorf que contenía las células muertas del inciso a).
- e) Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 1200 rpm durante 5 min, se eliminó la tripsina y se obtuvo el pellet celular para su conteo correspondiente.

8.9 Técnicas de análisis.

8.9.1 Conteo celular y técnica de exclusión con azul de tripano.

- a) Se colocó la cámara de Neubauer sobre un papel absorbente y en una superficie plana; y se lavó adecuadamente con agua destilada y etanol al 70%.
- b) Bajo condiciones estériles se preparó la solución de azul de tripano al 10% (1 mL de azul de tripano + 9 mL de PBS estéril).
- c) Posteriormente, en un tubo Eppendorf se colocó la cantidad necesaria de azul de tripano y suspensión celular de acuerdo a la dilución requerida.
- d) Se mezcló correctamente la solución anterior evitando la generación de burbujas y colocaron 10 μ L de la solución en cada lado del cubreobjetos de la cámara de Neubauer.
- e) La cámara de Neubauer se colocó en el microscopio óptico (Micro Axiostar) y se enfocó a 10x hasta observar los cuadrantes requeridos para el conteo celular.
- f) Se contaron las células viables y muertas de los cuadrantes extremos y central de la cámara de Neubauer (~10 campos).
- g) Finalmente, se realizó el conteo celular por triplicado para determinar la concentración celular y el % de viabilidad de las muestras.

Fórmulas utilizadas para determinar *No. de células viables/mL*,

No. de células totales/mL y % viabilidad celular:

$$\text{No. de células totales/mL: } \left(\frac{\text{No. de células totales}}{\text{No. de cuadrantes}} \times 1 \times 10^4 \right) \times \text{Factor de dilución} \quad (1)$$

$$\text{No. de células viables/mL: } \left(\frac{\text{No. de células viables}}{\text{No. de cuadrantes}} \times 1 \times 10^4 \right) \times \text{Factor de dilución} \quad (2)$$

$$\% \text{ Viabilidad celular: } \left(\frac{\text{No. de células viables/mL}}{\text{No. de células totales/mL}} \right) \times 100 \quad (3)$$

8.10 Curva de muerte de células HEK293 con Geneticin®.

La curva de muerte es un experimento de respuesta a la dosis; en el cual se determina la concentración mínima de antibiótico requerida para matar a toda la población celular. Este es un paso crucial para desarrollar líneas celulares estables, ya que nos permitirá matar aquellas células que no fueron transfectadas correctamente bajo presión selectiva con el antibiótico. El antibiótico de selección utilizado para este fin fue el Geneticin, ya que el vector pcDNA3(+) contiene dicho gen a neomicina. El G418 (Geneticin) es un antibiótico aminoglucósido de estructura similar a la gentamicina B1, producido por *Micromonospora rhodorangea*, el cual bloquea la síntesis de polipéptidos mediante la inhibición de la etapa de elongación en células procariontas y eucariotas. La resistencia a G418 se debe por el gen Neo de Tn5 que codifica un aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (Invitrogen, 2010). Por lo tanto, se llevó a cabo la siguiente metodología:

- a) Bajo condiciones estériles se realizó el subcultivo normal de células HEK293 hasta la obtención del pellet celular.
- b) Al pellet celular se le agregaron 3 mL de medio fresco DMEM/F-12 al 10% de SFB y se tomó una alícuota de 500 μ L para realizar el conteo celular.
- c) Se montaron las placas a una densidad celular inicial de 2.5×10^5 células/mL y se incubaron las células en condiciones de crecimiento a 37°C y 5% CO₂.
- d) Después de 24 h, se colocaron por triplicado las siguientes concentraciones de antibiótico de Geneticin® 0, 50, 100, 200, 300, 450, 500, 550, 600 y 800 μ g/mL en medio DMEM/F-12 al 10% de SFB.
- e) Posteriormente, las placas se incubaron en condiciones de crecimiento y se les cambió el medio al 4^{to}, 7^{mo} y 11^{vo} día de cultivo.
- f) Al 4^{to} y 7^{mo} día de cultivo se tomaron alícuotas de 50 μ L de la suspensión de cada concentración utilizada y se realizó el conteo celular para observar la evolución del cultivo.
- g) Al 11^{vo} día con antibiótico se recolectaron todas las células de cada pozo para realizar el conteo celular (por duplicado), se interpretaron resultados y se determinó la Dosis Letal.

8.11 Transfección de células HEK293 con el plásmido recombinante.

Los cultivos HEK293 fueron transfectados con el vector recombinante pcDNA3+/IFN- γ para desarrollar líneas celulares que expresen establemente dicha proteína. Para poder realizar la transfección es indispensable tener en cuenta ciertos factores: (1) purificar el ADN plasmídico mediante kits para que esté libre de contaminantes; (2) utilizar un método de transferencia físico-químico que permita altos niveles de eficacia de transfección a la célula hospedera; en este caso se usó la Lipofectamina 2000; y (3) linealizar el vector recombinante antes de la transfección para que se integre eficazmente al genoma del hospedero (Invitrogen, 2010). Por lo tanto, con base a estos criterios se llevaron a cabo las siguientes metodologías:

8.11.1 Linealización del vector pcDNA3+/IFN- γ .

La linearización del vector pcDNA3+/IFN- γ se llevó a cabo con la enzima MfeI, de acuerdo a la información proporcionada en el manual INVITROGEN del vector a utilizar mediante la siguiente metodología:

- a) En tubos Eppendorf estériles se colocó 1 μ L de la enzima MfeI, 2 μ L de Buffer G, 10 μ L de ADN purificado (Concentración final: 1.5 μ g) y 7 μ L de agua libre de nucleasas (Thermo Scientific, No. de Catálogo: R0581, No. de Lote: 00114842). A continuación, se presenta los respectivos sitios de corte de la enzima MfeI (Scientific™, 2018).

5'...C \wedge A A T T G..3'

3'...G T T A A \wedge C..5'

- b) Posteriormente, se incubaron las reacciones a 37°C durante toda la noche en el equipo ThermoBlock y se evaluó la digestión a través de un gel de agarosa al 1% bajo las siguientes condiciones: 80 Volts, 150 mA durante 1 h para verificar el tamaño del vector.
- c) Así mismo, se determinó la concentración del plásmido por el equipo Nanodrop 2000 y se almacenó a -20°C hasta su uso.

8.11.2 Montaje de células HEK293 en placa Corning Costar (6 pozos) para su transfección.

- a) En condiciones estériles se realizó el subcultivo normal de células HEK293 en adherencia hasta la obtención del pellet celular.
- b) Se resuspendió el pellet celular con 3 mL de medio DMEM/F-12 al 10% de SFB y se tomó una alícuota de 500 μ L para realizar el conteo celular.
- c) Se montó una placa de 6 pozos a una densidad inicial de 0.1×10^6 células/mL y se incubaron las células en condiciones de crecimiento para su posterior transfección (ver protocolo más adelante). Nota: Se ocuparon 2 pozos para la transfección, 1 pozo como Control Negativo (células HEK293 sin transfectar) y por último 1 pozo como Control Negativo con antibiótico (células HEK293 sin transfectar con antibiótico Geneticin a 550 μ g/mL).

8.11.3 Transfección de cultivos HEK293 con Lipofectamina 2000.

Los cultivos HEK293 montados anteriormente en placa fueron transfectados con el vector recombinante cuando presentaban una confluencia $>80\%$. Nota: Fue necesario transfectar los cultivos en fase exponencial (2-3 días después de montar las células en la placa) en medio libre de suero para evitar que el suero interfiera con la transferencia del ADN plasmídico a las células; además de que las células se encuentran en fase de crecimiento constante. Por lo tanto, se prosiguió con la siguiente metodología:

- a) Se mezclaron en un tubo Eppendorf estéril, 8 μ g (110 μ L) de ADN plasmídico en 390 μ L de medio DMEM/F-12 para obtener un volumen final de 500 μ L. Nota: Se transfectaron 2 pozos, donde cada uno contenía una concentración final de ADN de 4 μ g.
- b) En otro tubo estéril, se mezclaron cuidadosamente 20 μ L de Lipofectamina 2000 en 480 μ L de medio DMEM/F-12 (Volumen final 500 μ L, donde cada pozo a transfectar deberá contener 10 μ L de Lipofectamina).
- c) Posteriormente, se incubaron los complejos del inciso a) y b) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- d) Acabado el tiempo de incubación, se combinaron ambos complejos ADN-Medio: Lipofectamina 2000-Medio y se volvieron a incubar durante 20 minutos (Volumen final 1 mL).
- e) Mientras se esperaba el tiempo de incubación del paso anterior, se lavaron las células con 500 μ L de PBS estéril de 2 a 3 veces y se colocaron por goteo 500 μ L

del complejo del inciso d). Nota: Se llevaron los pozos a un volumen final de 2 mL con medio libre de suero. A los pozos correspondientes como Control Negativo (células sin transfectar), se añadieron 2 mL de medio fresco DMEM/F-12 al 10% de SFB con y sin antibiótico.

- f) Posteriormente, se incubó la placa durante 3 h y, acabado el tiempo, se desechó el medio de los pozos y se agregaron 2 mL de medio fresco. Nota: Se incubó nuevamente la placa en condiciones de crecimiento a 37°C y 5% de CO₂ hasta su uso para colocar el medio de selección con antibiótico (ver más adelante).

8.12 Selección de células HEK293 transfectadas con Geneticin®.

- a) Después de 48 h de transfección, se dividieron los 2 pozos (4 pozos totales) y se les agregó medio fresco de selección con la concentración establecida de antibiótico (550 µg/mL) Geneticin® (50 mg/mL GIBCO by life technologies, Referencia: 10131-035, No. de Lote: 1913489).
- b) A las 96 h con antibiótico, se tomó una alícuota de 70 µL por pozo y se determinó el % viabilidad celular. Nota: Se alimentaron los cultivos con medio selectivo cada 3^{er} o 4^{to} día y se determinó la viabilidad celular hasta identificar los focos resistentes a Geneticin. A la par se mantuvieron los controles: Negativo, con y sin antibiótico para determinar la viabilidad celular y observar la evolución de los cultivos a lo largo del tiempo.
- c) Posteriormente, se monitorearon los cultivos para poder realizar una segunda selección clonal cuando estos alcanzarán una viabilidad >80%. Nota: Se realizó la selección mediante dilución limitante en placa de 96 pozos (ver más adelante).

8.13 1ra evaluación de la expresión del IFN-γ en células HEK293 transfectadas.

Para determinar si las células HEK293 fueron eficazmente transfectadas con el vector recombinante es necesario evaluar la expresión del gen de interés; por lo tanto, se realizó RT-PCR para verificar si hay presencia de transcritos (ARNm) específicos para Interferón gamma, así como ELISA para cuantificar su producción. Para llevar a cabo el RT-PCR fue necesario extraer el ARN total de los pools clonales (#1-4) así como del Ctl negativo sin transfectar cuando estas presentaban una viabilidad >90%. A continuación, se llevó a cabo la siguiente metodología en condiciones frías y estériles:

8.13.1 Procedimiento de RT-PCR y extracción de ARN total en células HEK293.

- a) Se retiró y desechó el sobrenadante (DMEM/F-12 al 10% de SFB) de las células y se lavó con 1 mL de PBS estéril frío evitando su desprendimiento.
- b) Posteriormente, se agregaron 500 μ L de Trizol y se despegaron todas las células con la ayuda de un scrapper.
- c) Una vez despegadas, la suspensión celular se colocó en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL, se homogeneizó de 20 a 30 s a baja y media velocidad y se incubaron los tubos durante 5 min a 4°C.
- d) Posteriormente, se añadieron 100-150 μ L de Cloroformo frío y se resuspendió adecuadamente hasta observar una coloración rosa lechosa.
- e) Los tubos se vortexearon 30 s a velocidad baja y de ahí a 50 s a velocidad media y se incubaron nuevamente durante 5 min.
- f) Acabado el tiempo de incubación, los tubos se centrifugaron durante 18 min a 12000 rpm y 4°C y se separó la fase acuosa.
- g) Se colocó el mismo volumen de isopropanol frío de acuerdo al volumen que se separó del paso anterior, así como 1 μ L de Glicógeno y 25 μ L de acetato de calcio.
Nota: Los tubos se guardaron inmediatamente a -20°C durante toda la noche.
- h) Al día siguiente, los tubos se centrifugaron a 12000 rpm durante 18 min y 4°C para desechar el sobrenadante y observar la presencia de un pellet.
- i) Posteriormente, el pellet obtenido se lavó con 500 μ L de etanol frío al 75% y se centrifugó a 12000 rpm, 18 min y 4°C. Nota: El lavado se repitió de 2 a 3 veces.
- j) Se decantó el sobrenadante después del segundo lavado y se incubaron los tubos durante 5 min para secar mejor los pellets finales.
- k) Finalmente, se agregaron 25 μ L de agua DEPC estéril y se resuspendió el pellet adecuadamente. Nota: Se tomó una alícuota de 5 μ L para cuantificar el ARN total en el Nanodrop 2000 y así poder realizar los cálculos necesarios para su tratamiento con DNAsas.

8.13.1.1 Eliminación de ADN genómico a partir del ARN.

Con el objetivo de obtener ARNm libre de ADN se realizó un tratamiento con la enzima ADNsa I. Para ello, se cuantificó la concentración de ARN en el equipo Nanodrop 2000 para hacer la relación y aplicar a los tubos que serían tratados 1 μ g de muestra total. Posteriormente, a cada tubo con ARN se le agregaron los siguientes reactivos (ver Tabla No. 8):

Tabla No. 8: Componentes para la eliminación de ADN genómico del ARN.

Reactivo	Cantidad
ARN	1 µg
Buffer de reacción 10X con MgCl ₂	1 µL
DNAsa I, libre de ARNasa 1 U	1 µL
Agua tratada con DEPC (#R0601)	Llevar a un volumen final de 10 µL

- Una vez colocados todos los compuestos correctamente en cada tubo, se incubaron las reacciones a 37°C durante 30 min.
- Acabado el tiempo de incubación, se le agregó a cada tubo 1 µL de EDTA e inmediatamente se incubaron a 65°C durante 10 min, con el fin de detener la reacción.
- Finalmente, se tomó una alícuota de 8 µL de cada reacción (ARN del control negativo de células HEK293 sin transfectar, ARN de las 4 clonas transfectadas) y se colocó en otro tubo nuevo para sintetizar la cadena de ADNc. Nota: El ARN sobrante se almacenó a -80°C.

8.13.1.2 Síntesis de la primera cadena de ADNc.

Para poder llevar a cabo la síntesis de la cadena de ADNc se utilizó el kit RevertAid H Minus First Strand ADNc Synthesis de Thermo Scientific (No. de Cat. K1632, No. Lote: 00350156), en el que cada reactivo fue centrifugado y colocado en hielo hasta su uso. Por lo tanto, a cada tubo del paso anterior que contenía 8 µL de ARN se le colocaron los siguientes reactivos para un volumen final de 20 µL (ver Tabla No. 9):

Tabla No. 9: Componentes para la síntesis de la primera cadena de ADNc.

Reactivo	Cantidad
Oligo (dT) ₁₈ primer (100 µM, 0.5 µg/µL; 25 µL)	1 µL
Buffer de reacción 5X (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl ₂ y 50 mM DTT; 150 µL)	4 µL
Inhibidor RiboLock RNAsa (20 U/µL; 25 µL)	1 µL
10 mM dNTP Mix (50 µL)	2 µL
RevertAid H Minus M-Mul V Reverse Transcriptase (200 U/µL; 25 µL)	1 µL
H ₂ O	3 µL
ADNc	8 µL

- Una vez mezclados todos los componentes con el ARN, se incubaron los tubos a 42°C durante 60 min.
- Finalmente, para terminar la reacción se volvieron a incubar los tubos durante 5 min, pero a 70°C. El ADNc ahora construido se almacenó a -20°C para la reacción de PCR.

8.13.1.3 Reacción de la síntesis de la cadena de ADNc del control positivo GAPDH.

Se sintetizó la cadena de ADNc del control positivo GAPDH de acuerdo al protocolo del kit. Para esto, se centrifugaron los reactivos antes de ser usados y se colocaron en hielo. Posteriormente, en un tubo estéril se colocaron los siguientes reactivos (ver Tabla No. 10):

Tabla No. 10: Componentes para la síntesis de ADNc del control positivo GAPDH.

Reactivo	Cantidad
Control GAPDH ARN (50 ng/μL; 20 μL)	2 μL
Oligo (dT)18 primer (100 μM, 0.5 μg/μL; 25 μL)	1 μL
Buffer de reacción 5X (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl ₂ y 50 mM DTT; 150 μL)	4 μL
Inhibidor RiboLock RNAsa (20 U/μL; 25 μL)	1 μL
10 mM dNTP Mix (50 μL)	2 μL
RevertAid H Minus M-Mul V Reverse Transcriptase (200 U/μL; 25 μL)	1 μL
Agua, libre de nucleasas	9 μL Vf: 20 μL

- Posteriormente, el tubo se incubó durante 60 min a 42°C. Y para finalizar la reacción se incubó de nuevo a 70°C durante 5 min, se centrifugó brevemente y se procedió a realizar el PCR para observar la amplificación.

8.13.1.4 PCR de muestras transfectadas con el vector pcDNA3+/IFN-γ y control GAPDH.

Se realizaron reacciones de PCR para las muestras del ADNc de las clonas transfectadas con los primers específicos para el gen IFN-γ, así como el PCR para la amplificación del control constitutivo GAPDH. En el caso del PCR de IFN-γ se colocaron en tubos los siguientes componentes (ver Tabla No. 11):

Tabla No. 11: Componentes para la reacción de PCR del IFN- γ en muestras de células HEK293 transfectadas.

Reactivo	Cantidad
Dream Taq polimerasa	5 μ L
Primer Fwd IFN- γ (2.5 μ M)	0.3 μ L
Primer Rev IFN- γ (2.5 μ M)	0.3 μ L
ADNc de las 4 clonas HEK293 transfectadas y Ctl Negativo sin transfectar	2 μ L
H ₂ O	2.4 μ L

- Se utilizaron dos controles negativos, el control de reacción de PCR y el ADNc de células HEK293 sin transfectar. Al tubo de control de PCR se colocaron los componentes a excepción del ADNc; mientras que en el otro se colocaron 2 μ L de ADNc de células HEK293 sin transfectar. Así mismo, se utilizó un control positivo pVAX1/IFN- γ para tener como referencia la amplificación del gen colocando 2 μ L de muestra.
- Los oligos que se utilizaron fueron los mismos que en la sección de la construcción molecular, amplificando el segmento completo a ~520 pb.
- Una vez mezclados todos los componentes para un total de 7 reacciones, se colocaron los tubos de PCR en el equipo PIKOREAL y se utilizó el mismo programa que en la sección de materiales y métodos No. 8.4.3.1.
- Finalizado el tiempo de reacción de PCR, los productos fueron visualizados en geles de agarosa por medio de la técnica de electroforesis. Condiciones: 0.375 g de agarosa, 100 V, 150 mA, 45 min.

Por otro lado, para el PCR del control GAPDH se colocaron también en tubos los siguientes reactivos (ver Tabla No. 12):

Tabla No. 12: Componentes para la reacción de PCR del control GAPDH en muestras de células HEK293 transfectadas.

Reactivo	Cantidad
Dream Taq polimerasa	5 μ L
Primer Fwd GAPDH (10 μ M)	0.3 μ L
Primer Rev GAPDH (10 μ M)	0.3 μ L
ADNc de las 4 clonas HEK293 transfectadas, Ctl Negativo sin transfectar y Ctl (+) GAPDH 1:1000	1-2 μ L
H ₂ O	2.4 μ L

- Nota: Para amplificar el control positivo GAPDH por PCR, se realizó primeramente una dilución 1:1000 en agua libre de nucleasas del producto de la síntesis de la cadena de ADNc.
- Una vez mezclados todos los componentes para un total de 7 reacciones, se colocaron los tubos de PCR en el equipo PIKOREAL y se utilizó el mismo programa que en la sección de materiales y métodos 9.4.3.1 (T_m de 64°C).
- Finalizado el tiempo de reacción de PCR, los productos fueron visualizados en geles de agarosa por medio de la técnica de electroforesis. Condiciones: 0.375 g de agarosa, 100 V, 150 mA, 45 min.

8.13.2 Cuantificación de IFN- γ por ELISA en SN de células HEK293 transfectadas.

Se analizó el SN de los pools clonales (#1-4) para determinar la concentración del Interferón gamma humano y seguir con su manejo. El ensayo de ELISA utilizado fue del tipo Sándwich, mediante el kit Human IFN-gamma Platinum, (Referencia: BMS228, eBioscience®) el cual tiene una sensibilidad de 0.99 pg/mL y un rango de la curva: 1.6 a 100 pg/mL. Nota: Los SN a analizar contenían inhibidores de proteasas.

8.13.2.1 Procedimiento de la técnica de ELISA.

Para montar la placa fue necesario determinar previamente el número de muestras totales para asignar los pozos de trabajo. Nota: Las muestras se colocaron por duplicado.

- a) Primero que nada, el estándar de IFN- γ se reconstituyó en 180 μ L con agua destilada estéril durante 10-30 min, teniendo una concentración inicial de 200 ng/mL, para realizar una curva de calibración mediante diluciones seriadas.
- b) Se realizó una dilución (D1) 1:10 a una concentración de 20 ng/mL, la cual se preparó en otro tubo Eppendorf con 100 μ L del estándar IFN- γ humano concentrado + 900 μ L de Buffer de ensayo. Posteriormente, de la dilución anterior se preparó una segunda dilución (D2) a 1:1000 (200 pg/mL), 10 μ L de la D1 + 990 de Buffer de ensayo.
- c) Para realizar las diluciones seriadas para la curva de calibración, se colocaron en 7 tubos 225 μ L de solución diluyente.
- d) Posteriormente, al tubo #1 se le agregaron 225 μ L de la (D2), se homogeneizó y se traspasaron 225 μ L al tubo #2; y así sucesivamente hasta llegar al tubo #7 (Nota: Se descartaron 225 μ L del tubo #7).

- e) A la par, se lavó la placa de 96 pozos de 2 a 3 veces con 300 μL de Buffer de lavado entre 10 a 15 s.
- f) Se colocaron 100 μL de las diluciones seriadas estándar por duplicado en los pozos designados para la curva de calibración; y se añadieron 100 μL del reactivo diluyente de la muestra por duplicado en los pozos designados “blancos”.
- g) Posteriormente, se colocaron 50 μL del diluyente de la muestra a todos los pozos designados “muestra” y se agregaron 50 μL del sobrenadante de las muestras problema (por duplicado).
- h) A la par, se preparó la biotina conjugada en un tubo estéril realizando una dilución 1:100 de la solución de biotina-conjugada concentrada (60 μL) con Buffer de ensayo (5.94 mL). En este caso, la biotina es un ligando y la conjugación del anticuerpo de detección con la biotina permite que éste sea detectado en un paso posterior con la estreptavidina-HRP, el cual degrada un sustrato específico y posibilita la detección del antígeno en bajas concentraciones. Nota: Se utilizó la biotina dentro de los primeros 30 min.
- i) Una vez preparada la biotina, se añadieron 50 μL de esta a todos los pozos de la placa; posteriormente, se cubrió con papel adherible y se dejó incubar por 2 h a temperatura ambiente (18-25°C) y 200 rpm.
- j) Terminado el tiempo de incubación se preparó la estreptavidina-HRP (120 μL) a una dilución 1:100 de una solución concentrada con Buffer de ensayo (11.88 mL). La peroxidasa puede catalizar la oxidación del 4-cloronaftol en presencia de un 1% de peróxido de H⁺. Nota: Se utilizó la estreptavidina dentro de los 30 min.
- k) A la par, se vació con cuidado la biotina de la placa y se lavó 2-3 veces con 300 μL de Buffer de lavado.
- l) Posteriormente, se añadieron 100 μL de la estreptavidina-HRP a todos los pozos de la placa, se cubrió nuevamente con papel adherible y se dejó incubar durante 1 h a temperatura ambiente, 200 rpm.
- m) Terminado el tiempo de incubación, se vació la estreptavidina-HRP y se lavó la placa de nuevo 2-3 veces con 300 μL de Buffer de lavado.
- n) Una vez lavada la placa, se añadieron 100 μL de la solución sustrato TMB a todos los pozos y se dejó incubar durante 10 min evitando la luz intensa. Nota: Se mantuvo la placa en total oscuridad.

- o) Se leyeron las D.O. de las muestras a 450 o 600 nm hasta obtener una D.O. de 0.9 en la concentración más alta de la curva de calibración. Y finalmente, la reacción se detuvo al añadir 100 μ L de la solución de paro a todos los pozos de la placa.
- p) Se realizó el análisis de las D.O. para determinar la concentración de Interferón gamma, multiplicando la concentración obtenida por 2 debido a la dilución realizada al inicio del experimento.

8.14 Segunda selección clonal a través de la estrategia de dilución limitante.

Es necesario realizar una segunda selección clonal de las células transfectadas a través de un método fácil y que requiera una menor manipulación como, por ejemplo: dilución limitada, ya que permite la obtención de clonas resistentes y homogéneas a partir de una célula. Por lo tanto, se llevó a cabo la siguiente metodología:

8.14.1 Montaje de células transfectadas en placa de 96 pozos.

- a) Bajo condiciones estériles se obtuvo el pellet celular de todas las clonas HEK293 transfectadas (4 pools clonales).
- b) Posteriormente, se resuspendió el pellet celular en 1 mL de medio fresco DMEM/F-12 al 10% SFB y se tomó una alícuota de 50 μ L para realizar el conteo celular a través de la técnica de exclusión con azul de tripano.
- c) Debido a que las células estaban en confluencia >90% por pozo, se realizó una dilución 1:10 (100 μ L de células en 900 μ L de medio fresco DMEM/F-12 al 10% SFB); con el objetivo de colocar ~ 1 célula/pozo (\leq 5 células) en un volumen final de 100 μ L.
- d) Una vez realizado el conteo celular y los cálculos necesarios para colocar una célula/pozo (\leq 5 células/pozo), se realizó la dilución final de cada clona a un volumen de 10 mL.
- e) Posteriormente, a través de un multicanal se colocaron 100 μ L de la suspensión celular en cada pozo de una placa de 96 y se dejaron incubar en condiciones de crecimiento a 37°C y 5% CO₂ durante 3 días.
- f) Al 3^{er} día de cultivo se observó si había crecimiento celular y se cambió el medio por medio de selección con 550 μ g/mL de Geneticin®.
- g) Se dejaron incubar las placas en condiciones de crecimiento cambiando el medio de selección cada 4-5 días. Nota: Los cultivos se mantuvieron hasta alcanzar una confluencia \geq 50%.

h) Finalmente, se realizó una inspección visual del tamaño de las colonias para ser seleccionadas y expandidas a placas de 24 pozos.

8.14.2 Expansión de clonas individuales a placas Corning® de 24 pozos.

Las células individuales del paso anterior (8.14.1) fueron incubadas en condiciones de crecimiento a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, cuando estas alcanzaron una confluencia ≥50% fueron seleccionadas para ser expandidas a placas Corning de 24 pozos. De las 4 placas de 96 pozos, se seleccionaron 12 pozos individuales de células (48 clonas individuales totales) a una confluencia del 50 y 100 % para ser traspasadas a placas de 24 pozos. Posteriormente, estas células se dejaron incubar en condiciones de crecimiento durante 15 días o hasta alcanzar confluencias superiores al 80%.

Una vez que las células se expandieron en las placas de 24 pozos, se seleccionaron 10 clonas individuales de cada pool clonal para realizar un ELISA (analizar SN a las 168 h de cultivo) y determinar la concentración de IFN-γ; con la finalidad de seleccionar aquellas clonas productoras y seguir con su manejo. Nota: Las células productoras para Interferón gamma fueron crio preservadas en 10% DMSO (crioviales de 1.8 mL) y almacenadas en Nitrógeno líquido hasta su uso.

8.15 Selección y mantenimiento de clonas productoras de IFN-γ.

Las clonas productoras fueron seleccionadas de acuerdo al resultado por ELISA, de las cuales se escogieron 2 clonas con producción de IFN-γ alta, 1 clona con producción media y 1 clona de producción baja; esto con la finalidad de realizar cinéticas de crecimiento para evaluar y encontrar diferencias entre clonas productoras. Las clonas individuales a analizar fueron denominadas: 1.2 (producción alta), 1.3 (producción baja), 3.1 (producción alta) y 3.2 (producción media); las cuales son derivadas de los pools iniciales 1 y 3.

8.15.1 Montaje de clonas HEK293 productoras en placas de 24 pozos para su caracterización celular.

Las clonas productoras de IFN-γ fueron expandidas en frascos T 25 cm² para obtener más concentración celular y realizar sus correspondientes cinéticas de crecimiento. Por lo tanto, para observar la evolución de los cultivos con respecto al tiempo se montaron en placas de 24 pozos densidades iniciales de 50000 células/mL de cada clona en 1 mL de medio DMEM/F12 al 10% de SFB y en presencia de Geneticin® (275 µg/mL). Posteriormente, las placas se mantuvieron en condiciones de crecimiento a 37°C y 5% de CO₂, en la incubadora Eppendorf New Brunswick S41i durante 8 días; donde cada 24 h se recolectó el

sobrenadante para determinar la expresión de la proteína por Western Blot y su cuantificación por ELISA. Así mismo, se recolectó el pellet celular para realizar el conteo celular y determinar % viabilidad a través de la técnica de exclusión con azul de tripano; con la finalidad de obtener sus correspondientes velocidades de crecimiento y tiempo de duplicación. Nota: Las metodologías llevadas a cabo se realizaron de acuerdo a la sección de materiales y métodos No. 8.7.1.

8.15.2 Evaluación de la expresión génica y proteica del IFN- γ en clonas productoras.

Una vez realizadas las cinéticas de crecimiento de las clonas productoras fue necesario verificar que aún se esté expresando la proteína de interés; por lo tanto, se llevó a cabo nuevamente la extracción de ARN total de cada clona (en frascos T 25 cm² y de acuerdo a la sección 8.13.1) para el RT-PCR y poder determinar los transcritos específicos para el IFN- γ . Así mismo, se evaluó si la proteína se sigue secretando al medio de cultivo a través de un Western Blot SDS-PAGE y su cuantificación por ELISA (de acuerdo a la sección 8.13.2.1).

8.15.2.1 Western Blot SDS-PAGE de células HEK293 transfectadas.

La técnica de Western Blot nos brinda información acerca del peso molecular de una proteína específica y su concentración relativa contenida en una muestra cuando son separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida. Para esto, se utilizaron los SN de las clonas: 1.2, 1.3, 3.1 y 3.2; recolectados de las cinéticas de crecimiento a las 168 h de cultivo. Como controles se utilizó un control positivo estándar de IFN- γ (No. Lote: SRP3058, Sigma) expresado en *E. coli* (~13 kDa) y un control negativo del SN de células HEK293 sin transfectar. La preparación de los reactivos a utilizar se muestra en la sección de Anexos No. 15.11.

8.15.2.1.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida y Electrotransferencia en cámara húmeda.

La separación de proteínas se realizó a través de un SDS-PAGE de acuerdo a su movilidad electroforética, la cual consiste en utilizar electroforesis con geles de poliacrilamida en presencia de SDS (reactivo que desnaturaliza y confiere carga negativa a las proteínas).

- a) Debido a que el IFN- γ tiene un peso molecular entre 40-60 kDa, se decidió preparar geles de poliacrilamida al 12.5% (gel separador) con un gel concentrador al 4% utilizando el equipo BIO-RAD Mini-PROTEAN® Tetra Cell, 2-Gel System (No. de Cat.: 1658005). Nota: Ver preparación de geles en la sección de Anexos No. 15.11.

- b) Posteriormente, las muestras para análisis se prepararon con β -mercaptoetanol y se incubaron a 95°C durante 5 min. Para el control positivo de IFN- γ se utilizó 3 μ L (30 μ g/mL) + 3 μ L de β -mercaptoetanol; y para las muestras a análisis 20 μ L del SN + 20 μ L de β -mercaptoetanol.
- c) Una vez preparadas las muestras éstas fueron cargadas en los pozos correspondientes en el gel de acrilamida para su electroforesis mediante las siguientes condiciones: 100 V, 250 mA, 2 h.
- d) Acabada la electroforesis, las proteínas del gel de acrilamida se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para su inmovilización.
- e) Para realizar la electrotransferencia fue necesario realizar un Sándwich sobre el cassette en el siguiente orden: esponjas, papel filtro, gel, membrana, otro papel filtro y esponja, de tal manera de no generar burbujas que impidan la transferencia. Las condiciones utilizadas fueron: 200 V, 398 mA, 1 h.
- f) Acabado el tiempo de transferencia, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau al 0.1% entre 10 a 15 min para observar efectivamente la transferencia de proteínas. Posteriormente, se lavó con Buffer TBST 1x hasta quitar la coloración rojiza para poder realizar el bloqueo de la membrana con leche, así como la incubación con anticuerpos.

8.15.2.1.2 Bloqueo de la membrana e incubación con anticuerpos.

- a) Una vez desteñida la membrana, se bloqueó con leche Svelty (Lote: 63280206A2) al 5% para reducir los lugares de unión que han quedado libres tras la transferencia. Para esto se pesaron 0.2 g de leche y se disolvieron en 40 mL con TBST 1x.
- b) Acabado el tiempo de incubación, se le agregó a la membrana el anticuerpo primario diluido 1:1500 (anti-IFN- γ ABCAM No. Cat: AB9657) y se dejó incubar durante toda la noche. Preparación: 4 μ L de anticuerpo + 6 mL de Buffer TBST 1x al 0.5% de leche Svelty.
- c) Al día siguiente, se retiró el anticuerpo primario y lavó la membrana 3 veces durante 10 min con 10 mL de Buffer TBST 1x.
- d) Posteriormente, se incubó la membrana con el segundo anticuerpo Rabbit IgG (H+L) antibody (HRP) GT X85304 Lote: 32428 durante 1 h en agitación constante. El anticuerpo se preparó con 6 mL de TBST 1x al 0.5% de Leche y 2.4 μ L del anticuerpo (Dilución final 1:2500).

- e) Acabado el tiempo de incubación, se desechó nuevamente la solución con el segundo anticuerpo y lavó la membrana 4 veces con 10 mL de Buffer TBST 1x durante 15 min.
- f) Finalmente, la membrana se reveló con los reactivos del kit Clarity™ and Clarity Max Western ECL Blotting Substrates de BIO-RAD. Para esto se preparó una solución con 1 mL de cada reactivo, se vació a la membrana y se incubaron durante 3 min.
- g) Transcurrido el tiempo con los reactivos de revelado, la membrana se reveló en el equipo ChemiDoc XRS BIO-RAD Laboratories.

8.16 Adaptación de clonas productoras de IFN- γ a medio libre de suero.

Un punto crítico para llevar a cabo la escala de los cultivos y la posterior purificación de la proteína de interés, es que está se encuentre en suspensión en medios libre de suero (medios químicamente definidos) para así evitar interferencias, contaminación y agregación con otras proteínas contenidas en el SFB; además, de que está establecido así su manejo en la regulación para la producción de proteínas bioterapéuticas. Por lo tanto, las clonas con producción alta (#1.2 y 3.1) se adaptaron en medio libre de suero para su preservación, así como para analizar su estabilidad. Para dichos fines se utilizó el medio ExcellHEK293 llevando a cabo la siguiente metodología:

- a) Bajo condiciones estériles se realizó el subcultivo de células HEK293 hasta la obtención del pellet celular. Posteriormente, se agregó 1 mL de medio DMEM/F-12 al 10% de SFB y se resuspendió el pellet adecuadamente.
- b) Por otro lado, al frasco T 25 cm² se colocó medio fresco de DMEM/F-12 y ExcellHEK293 a una proporción del 75 y 25%, respectivamente (V_f: 5 mL).
- c) Se colocaron nuevamente las células al frasco T 25 cm² que fueron recolectadas del inciso a) y se incubaron en condiciones de crecimiento a 37°C y 5% CO₂.
- d) La adaptación se llevó a cabo de manera secuencial con la finalidad de que no haya un cambio brusco en el metabolismo celular. Por lo tanto, al realizar los subcultivos se cambió el % de medio (DMEM/F12:ExcellHEK293, 75:25, 50:50, 25:75 y a 100% total de medio libre de suero y en ausencia de antibiótico).
- e) Finalmente, se observó la evolución de los cultivos con respecto al cambio de medio y se analizó la expresión de la proteína por ELISA y SDS-PAGE; una vez que los cultivos estuvieran al 100% libre de suero.

8.17 Descongelación de células HEK293 transfectadas y análisis proteico.

Se descongeló en frascos T 25 cm² la clona #3.1 (con producción alta) según lo establecido en la sección de anexos No. 15.10.1 utilizando medio ExcellHEK293 al 6 mM de Glutamina, 20% SFB y en ausencia de antibiótico. Por lo tanto, se mantuvieron las células en condiciones de crecimiento a 37°C y 5% CO₂ para la recolección del SN (168 h) y se realizó su análisis por SDS-PAGE y ELISA (ver protocolos correspondientes). El objetivo de este paso fue determinar si la clona productora sigue expresando la proteína de interés aún con el proceso de congelación-descongelación, lo cual podría determinar también la estabilidad de la clona.

IX. RESULTADOS

9.1 Amplificación y digestión del plásmido pcDNA3(+).

Se realizó la amplificación del vector pcDNA3(+) con la finalidad de obtener suficiente concentración de plásmido base y poder llevar a cabo la reacción de ligación. Pasadas las 12 h de incubación se observó que sí hubo crecimiento de colonias positivas, por lo que se procedió a purificar el ADN plasmídico. Posteriormente, se realizó una digestión y linealizado del vector con la enzima BamHI (cuya secuencia de restricción se encuentra solo una vez en el ADN del plásmido) para comprobar su tamaño (>5.4 kb). La Figura No. 10 muestra el gel de agarosa que se realizó para verificar la amplificación y digestión con la enzima BamHI, el carril No. 2 representa el vector pcDNA3(+) sin digerir observándose las bandas correspondientes a las conformaciones moleculares que lo integran. Sin embargo, en los carriles No. 3-7 se observa la digestión del plásmido de 5 colonias seleccionadas, las cuales poseen el mismo tamaño molecular en su forma lineal (~5428 pb); esto nos indicó que fueron correctamente transformadas siendo capaces de amplificarlo.

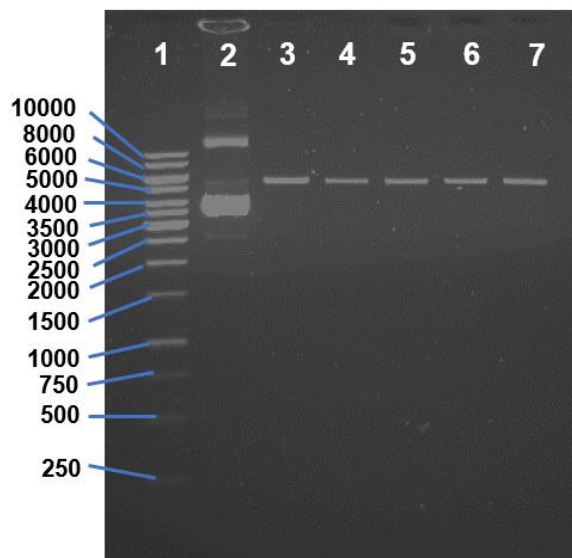


Figura No. 10: Gel de agarosa de la digestión del vector pcDNA3(+). El carril No. 1 representa el MPM O'Gene Ruler™ 1 Kb, carril No. 2: control negativo pcDNA3(+) sin digerir, carriles No. 3-7: linealización de 5 colonias seleccionadas, las cuales fueron positivas a la transformación del vector base teniendo un tamaño ~5428 pb.

9.2 Construcción molecular del vector pcDNA3+/IFN- γ .

9.2.1 Diseño de Oligos y amplificación del gen KpnI-IFN- γ -XbaI.

La construcción del vector recombinante pcDNA3+/IFN- γ se realizó con la finalidad de contar con un sistema de expresión para desarrollar líneas celulares que expresen dicha proteína. Para esto, fue indispensable amplificar el segmento de IFN- γ mediante PCR a partir del vector pVAX1/IFN- γ ; empleándose los Oligos con los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción KpnI 5' y XbaI 3' (descritos en la sección No. 8.4.3). La Figura No. 11, representa el resultado de las dos temperaturas de alineamiento seleccionadas; determinándose que ambas son favorables para amplificar el segmento KpnI-IFN- γ -XbaI a un tamaño de ~520 pb.

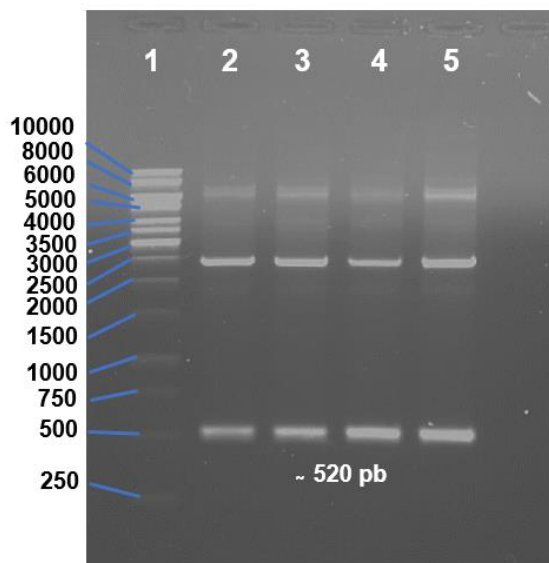


Figura No. 11: Gel de agarosa de la amplificación del IFN- γ a dos Tm de alineamiento. El carril No. 1 representa el MPM O'Gene Ruler™ 1 Kb, carriles No. 2 y 3: pVAX1/IFN- γ a Tm de 53°C, carriles No. 4 y 5: pVAX1/IFN- γ a una Tm de 64°C. Este último Tm es ideal para amplificar el gen ya que se observan bandas más definidas.

Una vez determinada, la temperatura de alineamiento ideal (64°C); se realizó un PCR convencional para la obtención de cantidades suficientes de IFN- γ a partir de su purificación mediante geles de agarosa. La Figura No. 12, representa el producto del PCR revelado en el equipo ChemiDoc, donde se observó que efectivamente el IFN- γ es amplificado a los ~520 pb; por lo que se prosiguió a cortar dichos segmentos para su posterior purificación de acuerdo a la sección de Anexos No. 15.9.

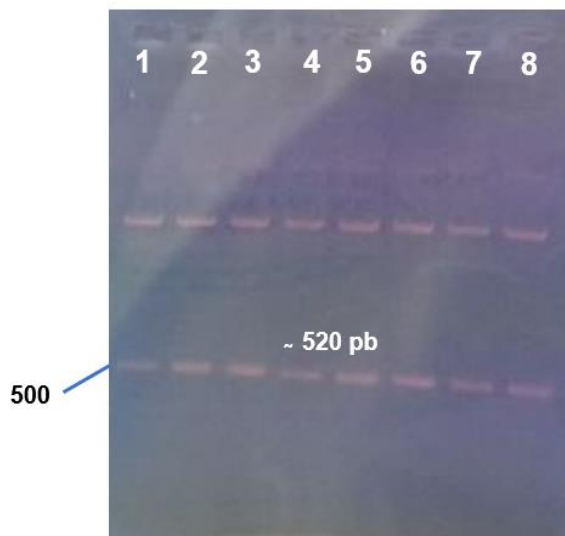


Figura No. 12: Gel de agarosa de la amplificación del IFN- γ por PCR a partir del vector pVAX1/IFN- γ . El gen fue revelado directamente en luz UV, observando que en todos los carriles (carriles No. 1-8) se amplifica el gen a ~520 pb.

9.2.2 Doble digestión del vector pcDNA3(+) e IFN- γ .

Por otro lado, una vez purificado el gen de IFN- γ se realizó una reacción de doble digestión tanto del gen como del vector vacío pcDNA3(+) para continuar con la ligación. Las enzimas utilizadas fueron KpnI / XbaI y el resultado de dicha digestión se observa en la Figura No. 13, en la cual mostró que el vector se digirió adecuadamente ya que en los carriles No. 5 y 6 se observan bandas alrededor de los ~5428 pb (correspondiente al tamaño del vector vacío linealizado) en comparación con el control negativo (carril No. 2, pcDNA3(+) sin digerir); mientras que en los carriles No. 3 y 4 se muestran las bandas del fragmento a ~520 pb correspondientes al tamaño del IFN- γ .

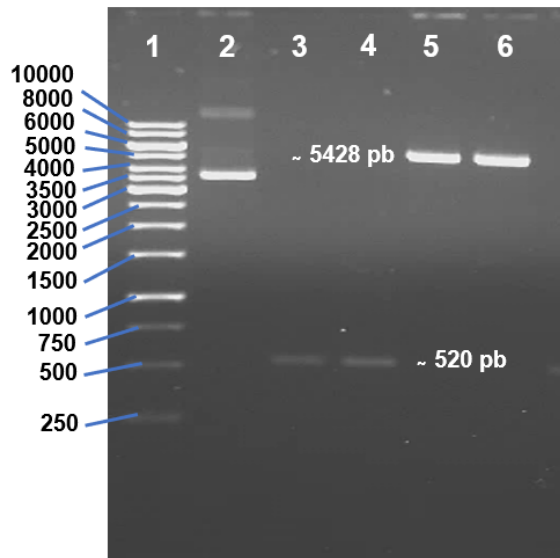


Figura No. 13: Gel de agarosa de la doble digestión del vector pcDNA3(+) e IFN- γ con las enzimas KpnI y XbaI. El carril No. 1 corresponde al MPM, el carril No. 2: control negativo pcDNA3(+) sin digerir, carriles No. 3 y 4: doble digestión del IFN- γ (520 pb), carriles No. 5 y 6: doble digestión de pcDNA3(+) (5428 pb).

9.2.3 Reacción de ligación entre pcDNA3(+) e IFN- γ .

Una vez que se realizó la doble digestión con las enzimas de restricción KpnI y XbaI se procedió a hacer la reacción de ligación entre el IFN- γ y el vector pcDNA3(+). Como podemos ver en la Figura No. 14, los carriles No. 2 y 3, representan los fragmentos de IFN- γ y pcDNA3(+) digeridos a un tamaño de ~520 y ~5428 pb respectivamente; con base a esto se confirmó que efectivamente tanto el vector como el gen fueron ligados por la enzima ADN ligasa dando un tamaño alrededor de las ~5948 pb (ver carril No. 4).

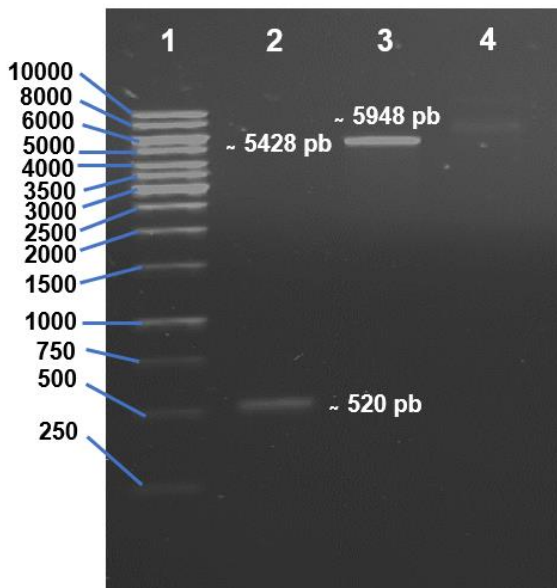


Figura No. 14: Gel de agarosa de la reacción de ligación pcDNA3(+) e IFN- γ . El carril No. 1: representa el MPM, carril No. 2: fragmento de IFN- γ a ~520 pb, carril No. 3: pcDNA3(+) a ~5428 pb y carril No. 4: producto de la ligación con la enzima ADN ligasa T4, a un tamaño aproximado de ~5948 pb.

9.2.4 Transformación de bacteriana y PCR de colonias positivas.

El producto de la ligación se utilizó para transformar bacterias *E. coli* DH5- α quimiocompetentes en placas LB agar más antibiótico. Transcurridas las 12 h de incubación de acuerdo a la sección Materiales y Métodos No. 8.4.7, se determinó que si hubo crecimiento de colonias pequeñas resistentes a ampicilina tal como se observa en la Figura No. 15.

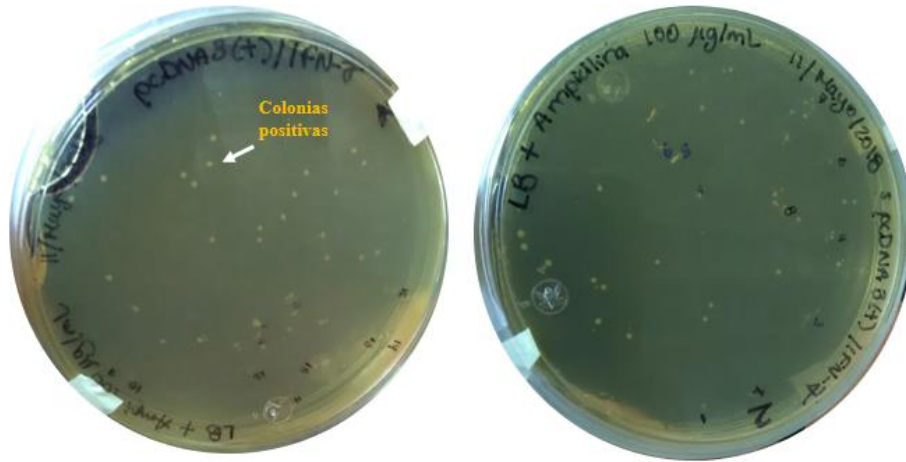


Figura No. 15: Crecimiento de colonias positivas después de su transformación en medio LB agar con antibiótico.

Posteriormente, a las colonias positivas seleccionadas se les realizó un análisis directo por PCR. Dicho resultado se presenta en la Figura No. 16, donde se observó al comparar con el control positivo (carril No. 2, pVAX1/IFN- γ) que en todas las colonias seleccionadas se amplifica el gen de interés a un tamaño de 520 pb; lo que indicó que fueron capaz de captar la construcción deseada (pcDNA3+/IFN- γ).

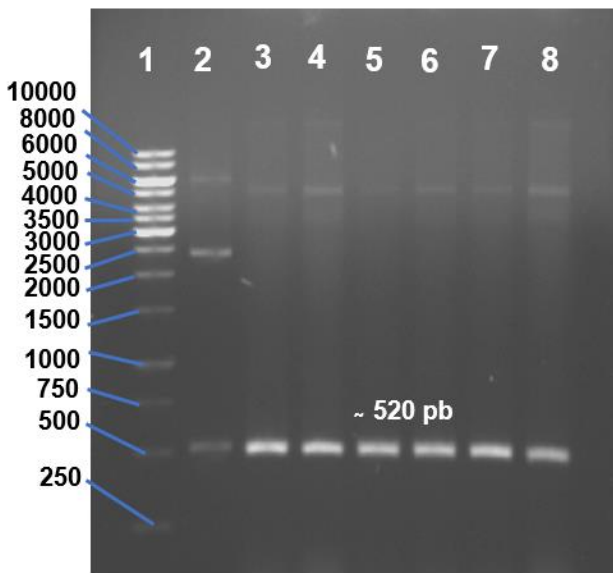


Figura No. 16: Gel de agarosa del PCR de colonias positivas a pcDNA3+/IFN- γ . El carril No. 1 representa el MPM, carril No. 2: control positivo pVAX1/IFN- γ para observar el tamaño del inserto y los carriles No. 3-8: representan diversas colonias positivas (1-6) de la transformación donde se presenta la banda característica de ~520 pb igual al control positivo.

9.2.5 PCR y digestión del ADN plasmídico purificado (pcDNA3+/IFN- γ).

Se realizó la purificación de 4 colonias positivas para su análisis por PCR y digestión con la enzima KpnI. La Figura No. 17 representa el producto del PCR, en el cual se confirmó la amplificación del fragmento IFN- γ (~520 pb) en las colonias purificadas 3, 5, 8 y 9 (carriles No. 3-6); ya que se observaron bandas iguales al control positivo pVAX1/IFN- γ (carril No. 2).

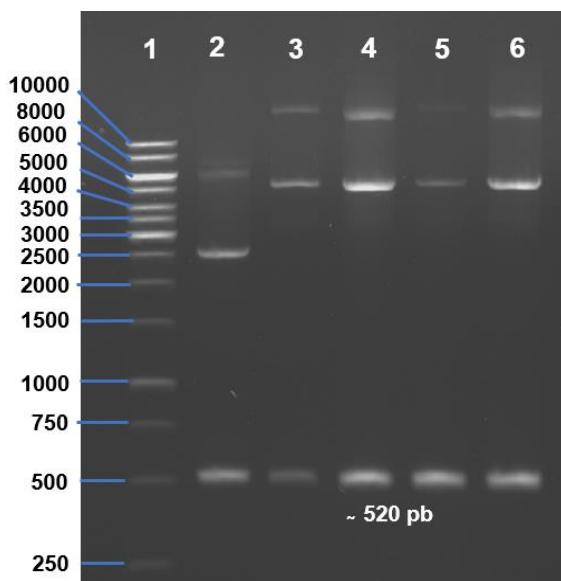


Figura No. 17: Gel de agarosa del PCR de colonias positivas purificadas a pcDNA3+/IFN- γ . El carril No. 1 representa el MPM, el carril No. 2: control positivo pVAX1/IFN- γ (~520 pb), carriles No. 3-6 representan muestras de ADN plasmídico pcDNA3+/IFN- γ purificado a partir de las colonias 3, 5, 8 y 9, respectivamente.

Posteriormente, la Figura No. 18 representa el resultado de la digestión con la enzima de restricción KpnI, en el cual se observan bandas a un tamaño mayor de ~5948 pb en los carriles No. 4-6 correspondiente a las colonias purificadas 3, 5 y 9; en comparación al control Negativo pcDNA3(+) vació (carril No. 3, tamaño ~5428 pb). Dicho tamaño era el esperado para la construcción final pcDNA3+/IFN- γ ; por lo que se prosiguió a realizar su secuenciación.

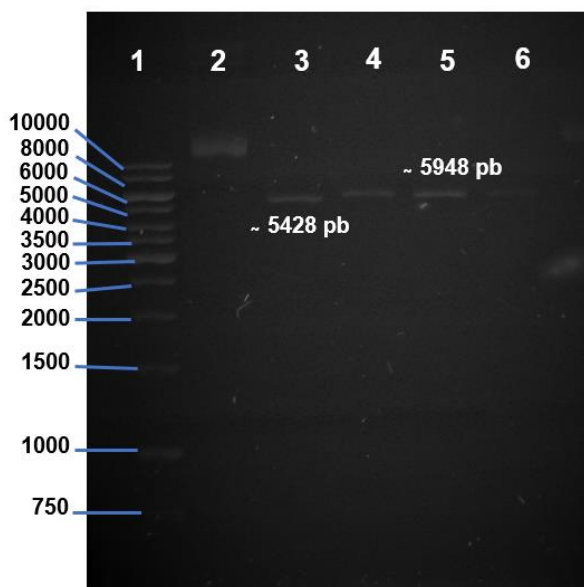


Figura No. 18: Gel de agarosa de la digestión de pcDNA3+/IFN- γ con la enzima KpnI. El carril No. 1: representa el MPM, carril No. 2: pcDNA3(+) sin digerir, carril No. 3: pcDNA3(+) digerido con KpnI y carriles No. 4-6: muestras de ADN plasmídico de pcDNA3+/IFN- γ digeridas con KpnI; las cuales presentaron un tamaño de ~5948 pb.

9.3 Análisis BLAST de la secuencia de IFN- γ .

BLAST es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ARN, ADN o proteínas, el cual compara secuencias problemas con secuencias que se encuentran en bases de datos y calcula la significación estadística.

A continuación, se muestra el resultado de la secuenciación mandada por el departamento USSDNA del IBT-UNAM:

```
CTGCATCGTTTTGGGTTCTCTTGGCTGTTACTGCCAGGACCCATATGTAAAAGAAGCAGAAAAC
CTTAGGAAATATTTAATGCAGGTCATTCAGATGTAGCGGATAATGGAACCTTTTTCTTAGGCAT
TTTGAAGAATTGGAAAGAGGAGAGTGACAGAAAAATAATGCAGAGCCAAATTGTCTCCTTTTAC
TTCAAACTTTTTAAAACTTTAAAGATGACCAGAGCATCCAAAAGAGTGTGGAGACCATCAAGG
AAGACATGAATGTCAAGTTTTTCAATAGCAACAAAAAGAAACGAGATGACTTCGAAAAGCTGAC
TAATTATTCGGTAACTGACTTGAATGTCCAACGCAAAGCAATACATGAACTCATCCAAGTGATG
GCTGAACTGTCGCCAGCAGCTAAAACAGGGGAAGCGAAAAAGGAGTCAGATGCTGTTTCGAGG
TCGAAGAGCATCCCAGTAATCTAGAGGGCCCTATTCTATAGTGTACCTAAATGCTAGAGCTC
GCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGC
CTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATC
GCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGG
AGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCG
GAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCG
CGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGC
TCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCCCCG
```

Dicha secuencia se analizó en la página de BLAST, link: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome; en la sección de BlastX. Este apartado se caracteriza en traducir la secuencia de nucleótidos a sus posibles marcos de lectura, comparando estas secuencias contra una base de datos de proteínas.

La Figura No. 19 representa el resultado final de dicho análisis, donde se observa que efectivamente el vector pcDNA3+/IFN- γ contiene la secuencia del gen Interferón gamma humano sin alteraciones (100% identidad) dando un total de 166 aminoácidos.

interferon gamma precursor [Homo sapiens]

Sequence ID: [NP_000610.2](#) Length: 166 Number of Matches: 1

[See 12 more title\(s\)](#) ▾

Range 1: 1 to 166 [GenPept](#) [Graphics](#)

▾ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
344 bits(883)	1e-119	Compositional matrix adjust.	166/166(100%)	166/166(100%)	0/166(0%)	+2
Query 8		MKYTSYILAFQLCIVLGS LGCYCQDPYVKEAENLK KYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWK				187
Sbjct 1		MKYTSYILAFQLCIVLGS LGCYCQDPYVKEAENLK KYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWK				60
Query 188		EESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKRDDFEKLTN				367
Sbjct 61		EESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKRDDFEKLTN				120
Query 368		YSVTDLNVQRKAIHEL IQVMAELSPA AKTGKRKRSQMLFRGRRASQ		505		
Sbjct 121		YSVTDLNVQRKAIHEL IQVMAELSPA AKTGKRKRSQMLFRGRRASQ		166		

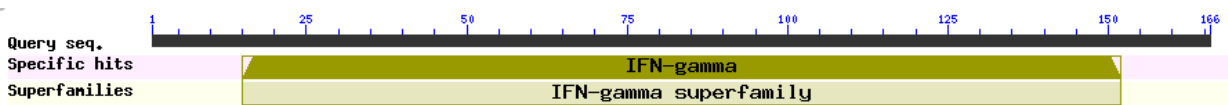


Figura No. 19: Análisis BLAST de la secuencia de IFN- γ . El resultado obtenido muestra una identidad de similitud del 100% para el gen de IFN- γ humano.

9.4 Caracterización morfológica de la línea celular HEK293.

La caracterización celular se realizó primeramente observando la morfología que presentan estas células bajo microscopio. De acuerdo a la ATCC las células HEK293 se caracterizan por crecer en adherencia presentando una morfología epitelial y fusiforme (ver Figura No. 20); generalmente crecen bien en medios como MEM o DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) suplementados al 10% de Suero Fetal Bovino y con un tiempo de duplicación de 24-30 h (Tavira Montalván, 2014).

ATCC Number: **CRL-1573**
Designation: **293**

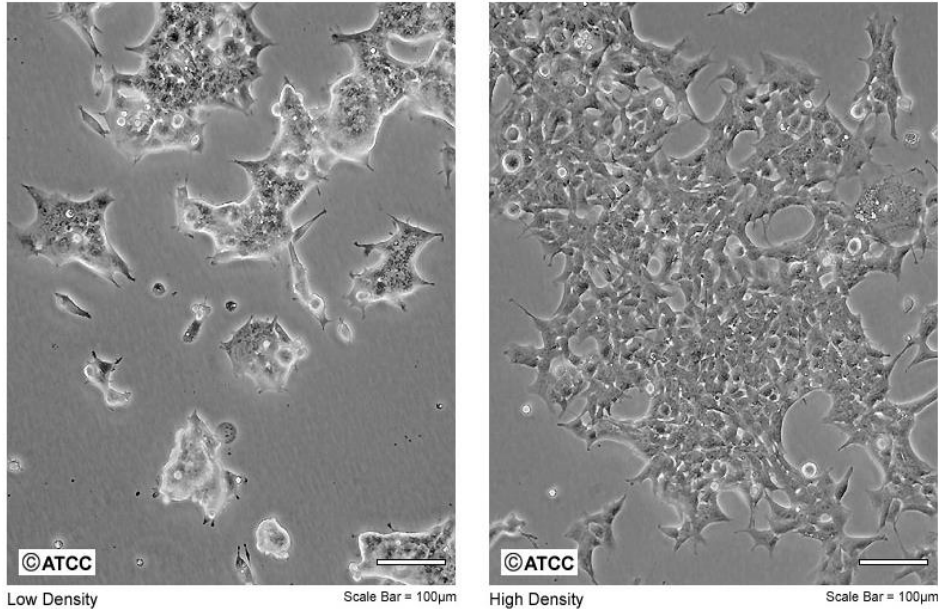


Figura No. 20: Células embrionarias de riñón humano (ATCC CLR-1573). Las células presentan una morfología epitelial y crecen adherentemente en monocapa (Tomada de <https://www.atcc.org/~media/Attachments/Micrographs/Cell/CRL-1573.ashx>).

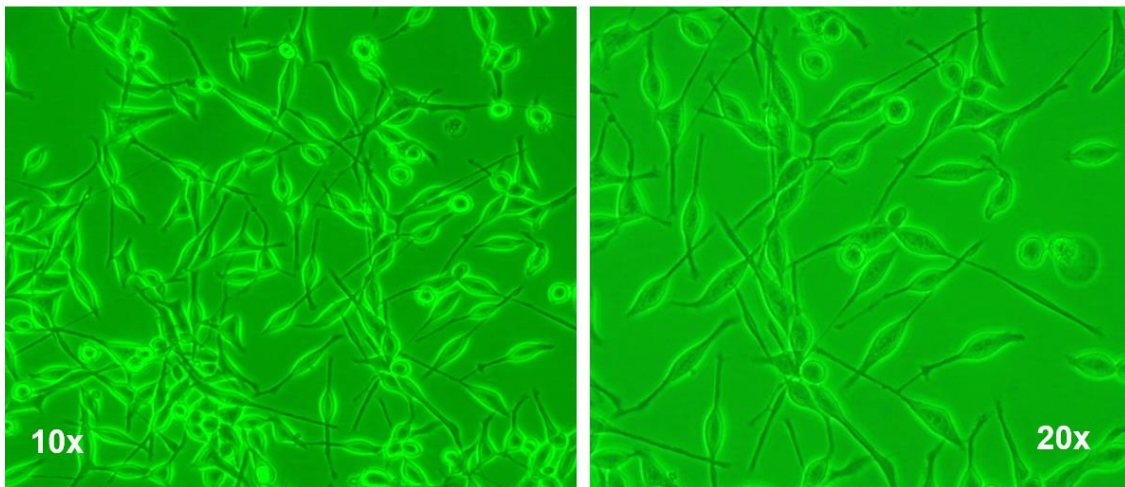


Figura No. 21: Células HEK293 en medio DMEM/F-12 al 10% SFB. Las células se encuentran en frascos T 25 cm² vistas a 10x y 20x en campo claro; las cuales presentan una morfología fusiforme y en adherencia. Imagen realizada por Yoanna García, 2018.

En la Figura No. 21 se puede observar cómo las células presentan una morfología fusiforme, adhiriéndose en monocapa y ocupando la mayoría de la superficie del sustrato. Esto se debe a que las células contienen moléculas de adhesión permitiendo la unión célula-célula, célula-sustrato, a través de la matriz extracelular. Así mismo, el uso de medios con suero favorece este mecanismo ya que contiene factores de adhesión como la

Fibronectina (Beltrán V. y González de la Rosa, 2016). Por lo tanto, se realizó una cinética de crecimiento en placa de 24 pozos de los cultivos en adherencia para observar su evolución a lo largo del tiempo. En la Figura No. 22 se observan 3 diferentes fases características de una curva de crecimiento celular; la cual inició a una densidad de 20000 células/mL. A continuación, se muestra la gráfica de crecimiento.

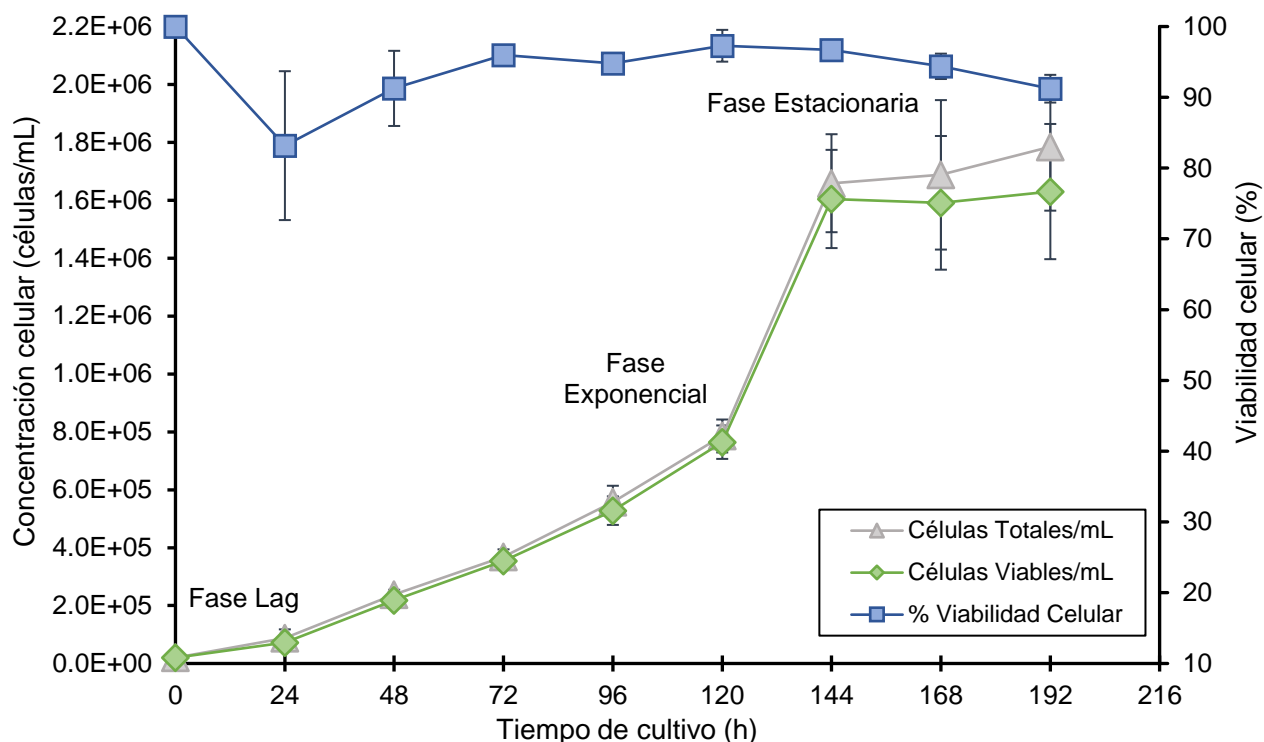


Figura No. 22: Cinética de crecimiento de cultivos HEK293. Medio utilizado DMEM/F-12 al 10% de SFB, densidad celular inicial 20000 células/mL. Se observan 3 fases de una curva de crecimiento: fase de latencia, fase exponencial y una fase estacionaria. La desviación estándar es de tres repeticiones por punto.

La fase de latencia (Fase Lag) duró aproximadamente 24 h, donde no se aprecia crecimiento celular considerado debido a que las células están en adaptación después de sufrir estrés por el subcultivo. Después de las 24 h se observó una fase exponencial con crecimiento logarítmico alcanzando una concentración máxima de 1.60×10^6 células/mL a las 144 h de cultivo y viabilidades celulares $>90\%$. Finalmente, se observó una fase estacionaria después de las 144 h donde se mantuvo la viabilidad celular $>90\%$; esto fue aceptable gracias a que se cuenta con un cultivo confluyente y adaptado a las condiciones de estudio.

Una vez determinada la etapa exponencial, se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ) mediante la ecuación de la línea recta, la cual fue de 0.0234 h^{-1} arrojando

un tiempo de duplicación (Td) de 29.6 h. Posteriormente, este valor se comparó con lo reportado en las páginas de Expasy y CLS Cell Lines Service el cual indican un Td ~24-30 h (Link: https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0045, CLS Cell Lines Service, página actualizada 2017); concluyendo así que las células se encuentran efectivamente dentro del rango de duplicación y que el medio utilizado es favorable para el desarrollo del cultivo. En la sección de Anexos No. 15.12 se muestra la evolución de los cultivos HEK293 en crecimiento.

9.5 Curva de muerte de cultivos HEK293 con Geneticin®.

El primer paso crítico para el desarrollo de líneas celulares estables es determinar la concentración óptima de antibiótico para eliminar aquellas células que no fueron transfectadas correctamente y así poder seleccionar clonas resistentes. Por lo tanto, dado que cada línea celular de mamífero difiere en la sensibilidad a los antibióticos se recomienda realizar una curva de muerte por separado. El antibiótico utilizado fue el G418 ya que el vector pcDNA3(+) contiene el gen de resistencia Neo como marcador de selección; por lo tanto, las células HEK293 en adherencia fueron expuestas en un rango de concentración establecido de 0-800 µg/mL.

La Figura No. 23 representa la curva de muerte celular donde se aprecia que la dosis mínima requerida para matar a la mayoría de la población es de 550 µg/mL alcanzando un 3% de viabilidad celular (dicha concentración será utilizada más adelante para la selección clonal). Así mismo, en la Figura No. 24 se puede observar cómo las células HEK293 a medida que va aumentando la concentración de antibiótico van cambiando su morfología, de una concentración 0 a 100 µg/mL se aprecia su morfología característica (fusiforme/epitelial); sin embargo, a partir de 200 a 800 µg/mL la morfología celular cambia notoriamente teniendo un aspecto irregular además de falta de adherencia y presencia de desechos celulares. Estos resultados eran de esperarse ya que las células aún no son transfectadas con el vector recombinante y son susceptibles al efecto citotóxico del antibiótico G418, el cual es capaz de unirse a la subunidad ribosómica 80S provocando la traducción errónea o la terminación prematura de la síntesis de proteínas. Además, autores como Geol Yoon y D. Koob, 2009 mencionan que a pesar de que el mecanismo de toxicidad de los aminoglucósidos en células eucariotas no se conoce bien, se ha postulado que se dirigen a los procesos intracelulares que incluyen el metabolismo de los lípidos, el citoesqueleto de actina y la función del lisosoma, la producción de ATP mitocondrial y la apoptosis.

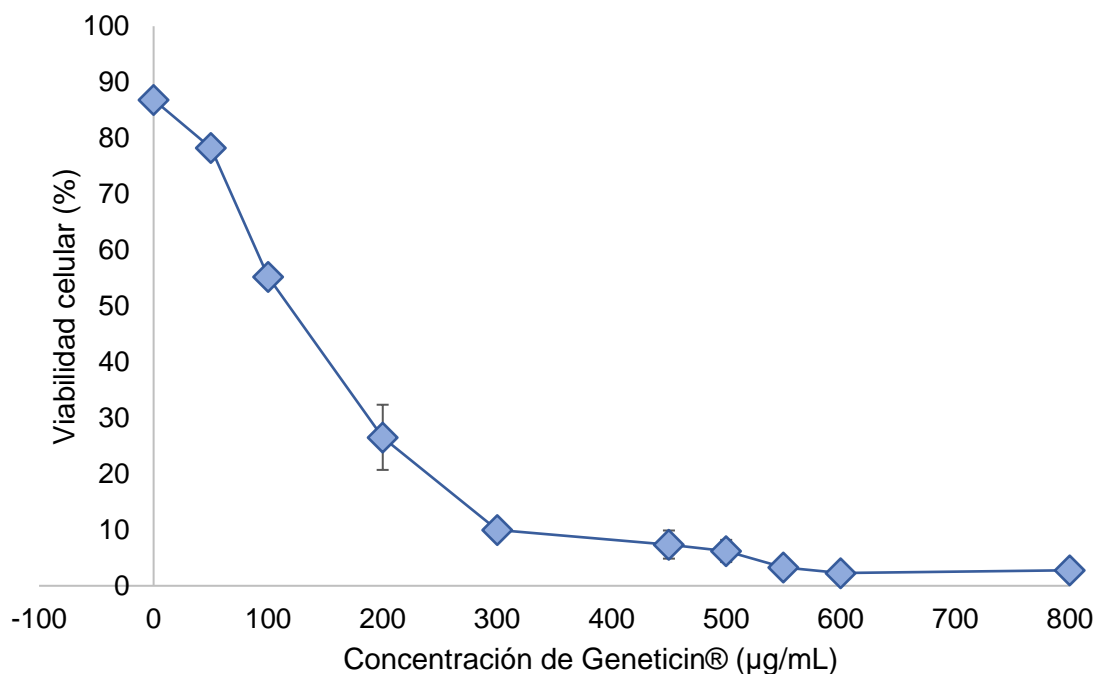


Figura No. 23: Curva de muerte de células HEK293 con Geneticin®. Se observa que la dosis óptima requerida para matar a la mayoría de la población celular es de 550 µg/mL. La desviación estándar es de tres repeticiones por punto.

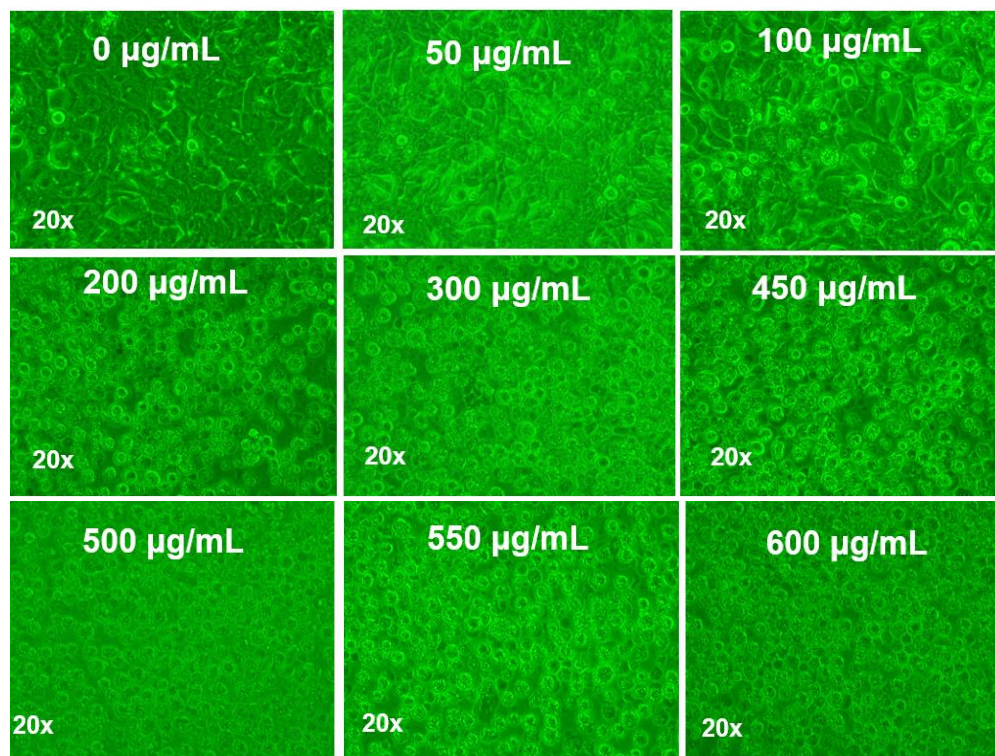


Figura No. 24: Morfología de células HEK293 con antibiótico Geneticin®. Se observó que a partir de 200-800 µg/mL las células cambian su morfología a rugosas e irregulares con desechos celulares en su entorno; debido a la acción del antibiótico. Células vistas al microscopio a 20x, campo claro.

9.6 Análisis del vector recombinante pcDNA3+/IFN- γ antes de transfectar cultivos HEK293.

Para verificar la presencia del gen de interés en el vector pcDNA3+/IFN- γ se realizó un PCR y digestión con la enzima de restricción KpnI. La Figura No. 25 representa el gel de agarosa del producto de PCR en muestras de ADN plasmídico purificado (denominadas M1 y M2), donde de acuerdo al control positivo (carril No. 2, pVAX1/IFN- γ) se confirma que sí se sigue amplificando el segmento del IFN- γ a las ~520 pb (carril No. 3 y 4) además de su tamaño total ~5948 pb (ver Figura No. 26, carriles No. 4 y 5).

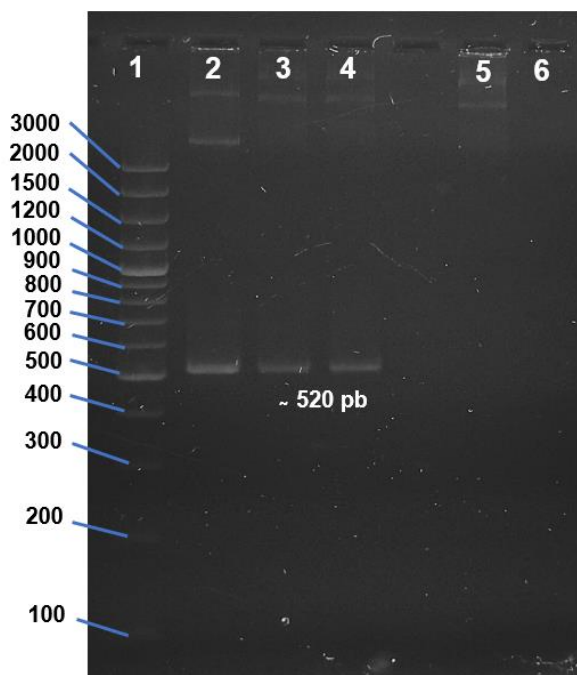


Figura No. 26: Gel de agarosa del PCR en muestras de ADN plasmídico purificado pcDNA3+/IFN- γ (Maxipred). Las muestras son denominadas M1 y M2 obtenidas de la purificación en Maxipred. El carril No. 1 representa el MPM; carril No. 2: control positivo pVAX1/IFN- γ ; carril No. 3 y 4: ADN plasmídico pcDNA3+/IFN- γ , M1 y M2; carril No. 5: control negativo, pcDNA3(+) y carril No. 6: control negativo de PCR.

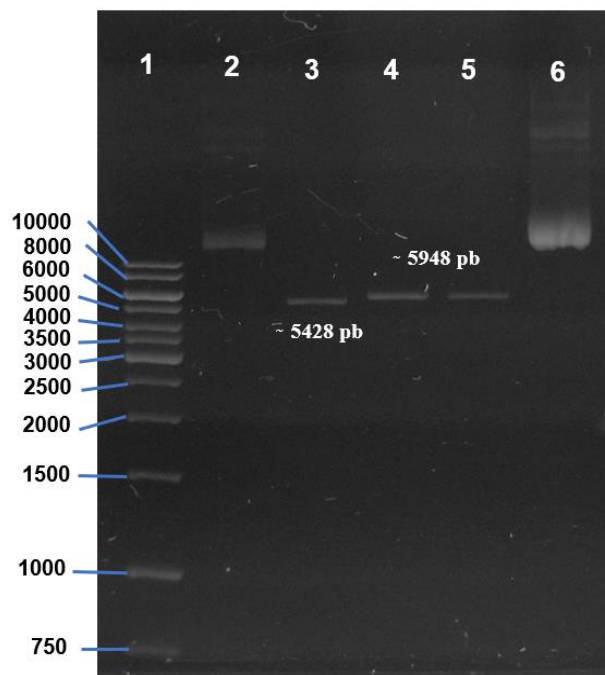


Figura No. 25: Gel de agarosa de la digestión del pcDNA3+/IFN- γ obtenido en Maxipred. El carril No. 1 representa el MPM; carril No. 2: Control negativo pcDNA3(+) sin digerir; carril No. 3: Control negativo pcDNA3(+) digerido con KpnI, carriles No. 4 y 5: ADN plasmídico pcDNA3+/IFN- γ , M1 y M2 digerido con KpnI; carril No. 6: Control negativo, pcDNA3+/IFN- γ M1 sin digerir.

Gracias a estos resultados se linealizó el vector recombinante con la enzima MfeI y se transfectaron los cultivos HEK293. La Figura No. 27, representa dicha linealización donde se puede observar la digestión de pcDNA3+/IFN- γ en el carril No. 2 a un tamaño de ~5948 pb. La relevancia de linealizarlo es que puede disminuir la probabilidad de que este se integre en el genoma de una manera que interrumpa el gen de interés u otros elementos

necesarios para la expresión en las células de mamíferos; ya que al estar de forma lineal es más probable que se integre mejor al genoma de la célula hospedera.

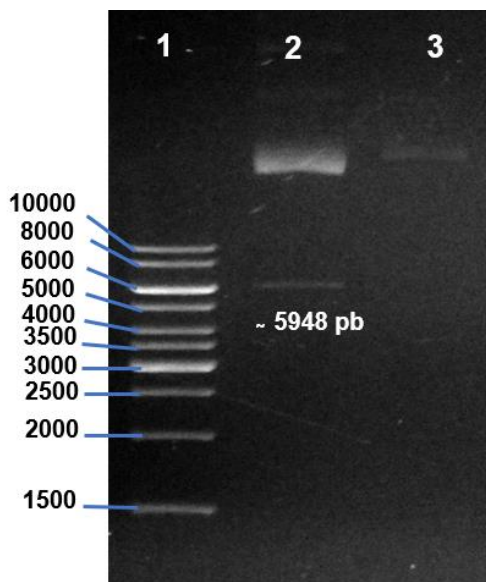


Figura No. 27: Gel de agarosa de la linealización de pcDNA3/IFN- γ con la enzima MfeI. El carril No. 1 representa el MPM; carril No. 2: ADN plasmídico pcDNA3/IFN- γ digerido con MfeI y carril No. 3: ADN plasmídico pcDNA3/IFN- γ sin digerir.

9.7 Evolución de los cultivos HEK293 transfectados con pcDNA3/IFN- γ .

Se co-transfectó en células HEK293 el gen de interés (IFN- γ) con el marcador de selección (gen Neo) para generar una resistencia y su posterior selección clonal. Dicha selección se realizó en los 4 pools clonales obtenidos después de la transfección, a la dosis de 550 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Geneticin® (ver sección de resultados No. 9.5). La Figura No. 28, representa la evolución de los 4 pools clonales a medida del paso de tiempo en medio de selección; en el cual se fue analizando el % de viabilidad celular hasta obtener una sobrevivencia más elevada. El gráfico demostró que en los primeros 7 días en medio de selección la viabilidad celular de los 4 pools clonales disminuye $\leq 80\%$ en comparación al control negativo sin antibiótico (95%) obteniéndose viabilidades hasta un 60% en el pool #3 y 64% en el pool #4; dicha disminución y variabilidad era de esperarse ya que se están eliminando aquellas células que no se transfectaron eficientemente. Mientras que aquellas que sí lo hicieron generaron resistencia al antibiótico debido al gen Neo^r de Tn5 que codifica un aminoglucósido 3'-fosfotransferasa, APH 3'II (Invitrogen, 2010); lo que permitió su posterior crecimiento y sobrevivencia alcanzándose viabilidades celulares $>90\%$ al día 40 de cultivo. Por otro lado, en el control con antibiótico (células HEK293 sin transfectar) se puede

observar que la viabilidad celular decayó drásticamente a los 15 días a un 0% debido a la acción tóxica del antibiótico.

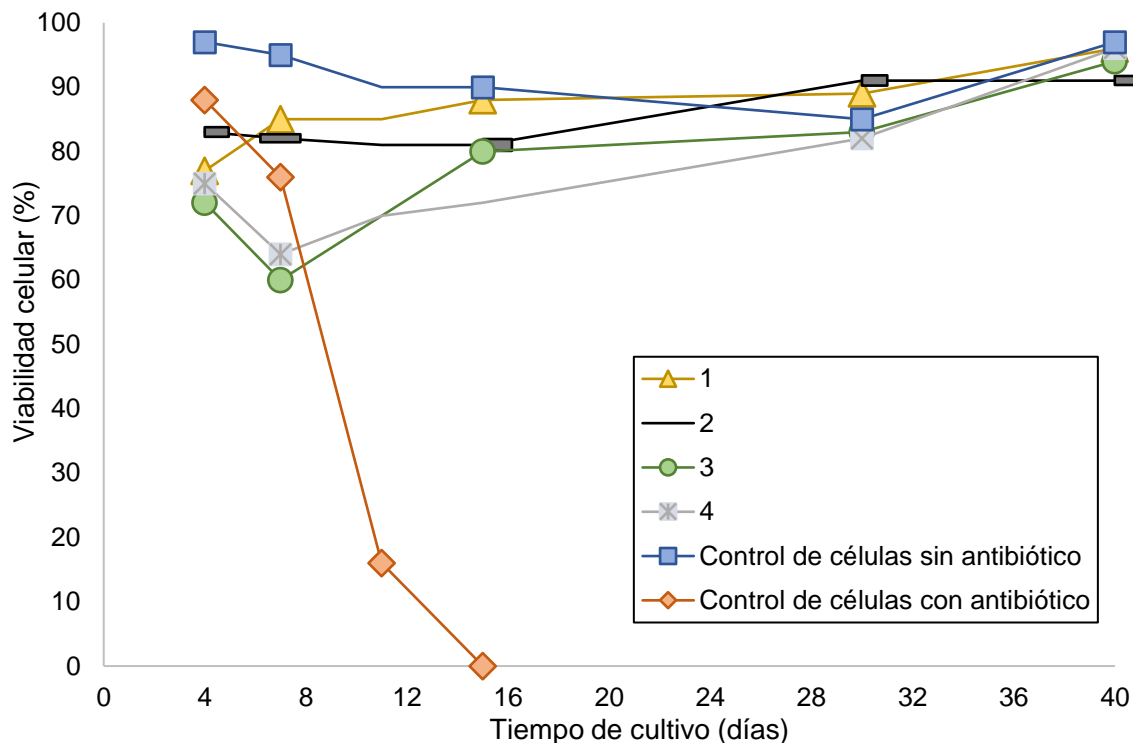


Figura No. 28: Viabilidad celular de pools clonales HEK293 transfectados en presencia de Geneticin®. Se observa que al día 40 los pools clonales tienen una mayor sobrevivencia en medio de selección alcanzándose viabilidades >90%.

9.8 Primera evaluación de la expresión génica y proteica del IFN- γ en los cultivos HEK293 transfectados.

Para observar si efectivamente el gen de interés se está expresando se realizó una primera evaluación génica mediante RT-PCR en los 4 pools clonales obtenidos (#1-4), así como un ELISA para cuantificar la concentración de proteína secretada. Para el RT-PCR se sintetizó el ADNc correspondiente mediante transcriptasa inversa amplificando el resultado mediante un PCR convencional. La Figura No. 29A representa el resultado del gel de agarosa del RT-PCR en el cual se determinó que sí hubo transcripción de los ARNm específicos para el IFN- γ en los 4 pools clonales (carriles No. 3-6) esto en comparación al control positivo (carril No. 2, pVax/IFN- γ) amplificándose el segmento a las ~520 pb. Así mismo, se utilizó como control positivo y constitutivo el gen GAPDH (ver Figura No. 29B), amplificándose el segmento a las ~496 pb en todas las muestras correspondientes del ADNc de pools clonales y células sin transfectar.

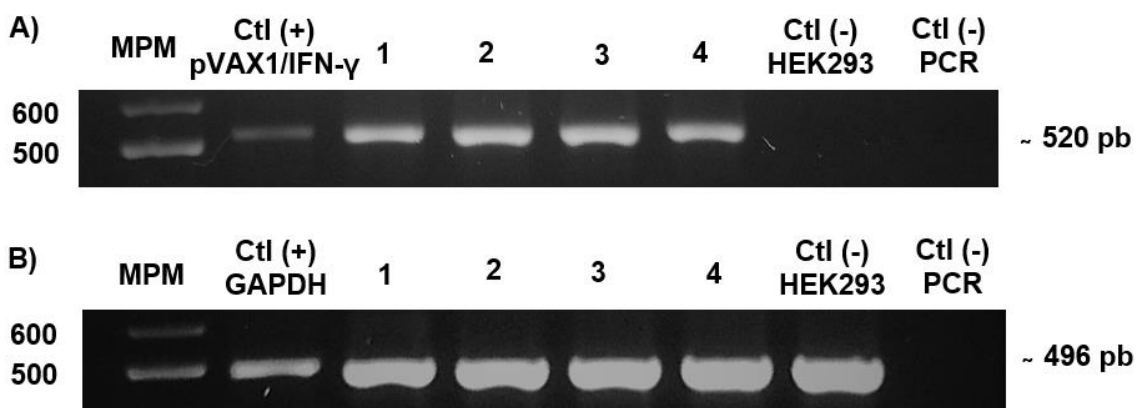


Figura No. 29: Gel de agarosa del RT-PCR de células HEK293 transfectadas. A) ARNm IFN- γ . Se observa que sí hubo amplificación del segmento correspondiente al IFN- γ a las ~520 pb en los 4 pools clonales (carriles No. 3-6). **B) Control GAPDH.** Amplificación del control constitutivo en todos los cultivos con y sin transfectar, ~ 496 pb.

Por otro lado, mediante análisis de ELISA de los SN correspondientes a los pools clonales se pudo corroborar que el Interferón gamma humano sí es secretado al medio de cultivo en concentraciones que varían de ~45 hasta 122 pg/mL (ver Figura No. 30). Estos datos preliminares pudieron determinar que el pool clonal #2 presenta mayor producción de la citocina en estudio; sin embargo, aún no se pueden considerar clonas estables por su corto tiempo de manejo. Por lo tanto, se les realizó una segunda selección clonal por el método de dilución limitante para obtener poblaciones más homogéneas y con mayor productividad.

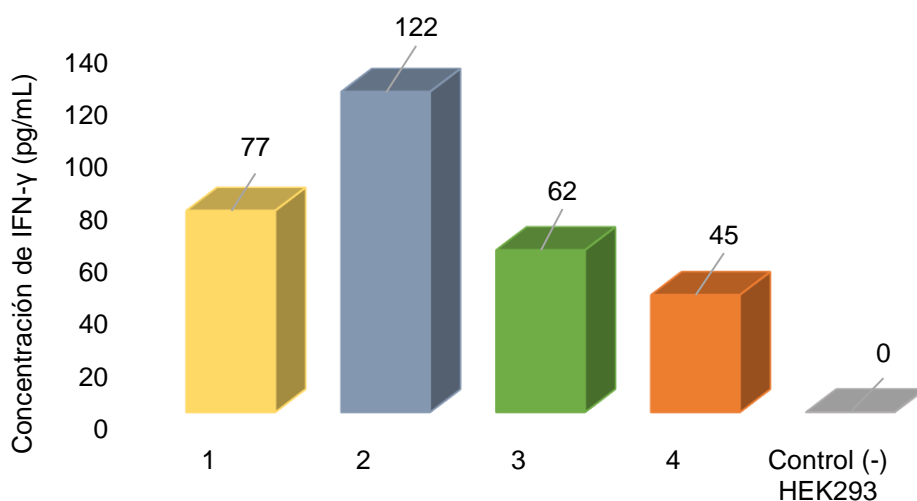


Figura No. 30: Cuantificación de IFN- γ en los SN de los pools clonales HEK293 transfectados. Las concentraciones se presentan en unidades de pg/mL de dos repeticiones.

9.9 Segunda selección clonal de pools clonales HEK293 transfectados.

Una vez que se observó que si hay transcritos de IFN- γ en los 4 pools clonales HEK293, se realizó una segunda selección clonal a través del método de dilución. Este método se escogió ya que varios autores como Kruif *et al.*, 2010; Seitz *et al.*, 2011; Zitzmann *et al.* 2018, entre otros; lo han utilizado para crear líneas celulares estables, el cual consiste en diluir células individuales a partir de aquellas que sobrevivieron al proceso de selección primario para su posterior expansión como población clonal. La dilución limitada es tediosa pero no requiere un equipo sofisticado permitiéndonos crear un grupo de células idénticas y homogéneas (Hunter *et al.*, 2018). La Figura No. 31 muestra como las células libres de antibiótico (≥ 5 cél/por pozo) y en condiciones limitadas de densidad celular son capaz de dividirse al 3er día de cultivo; determinando así que el uso de medios enriquecidos con suero facilitó nuestro método ya que se observó la adherencia celular y su posterior proliferación. Por lo tanto, las células individuales se sometieron nuevamente a presión selectiva con el antibiótico Geneticin® (550 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para determinar si son capaces de continuar con su crecimiento celular. La Figura No. 32 representa como las células al décimo día con antibiótico continuaron con un crecimiento celular favorable alcanzándose viabilidades $\geq 50\%$.

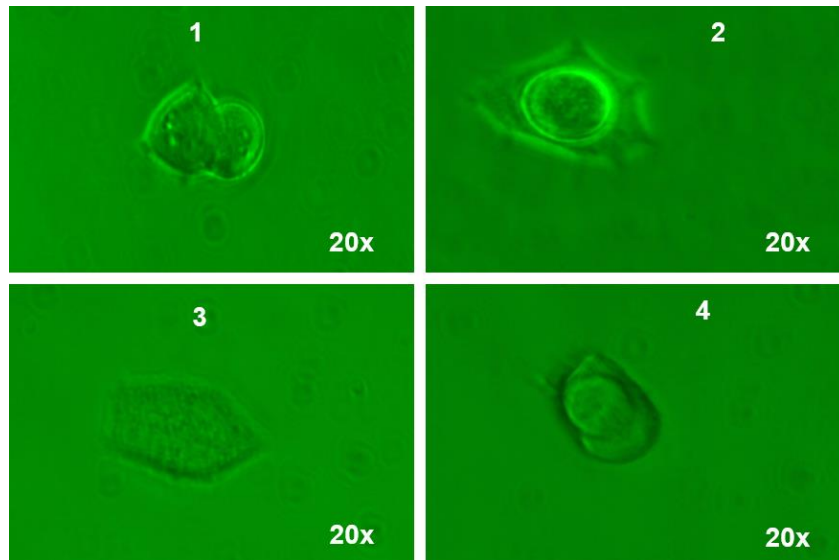


Figura No. 31: Crecimiento de clonas HEK293 individuales al 3er día de cultivo mediante dilución limitante. Se observa como las células se encuentran adheridas al sustrato y en estado de división en medio libre de antibiótico. Imágenes vistas a 20x, campo claro; de pozos seleccionados al azar.

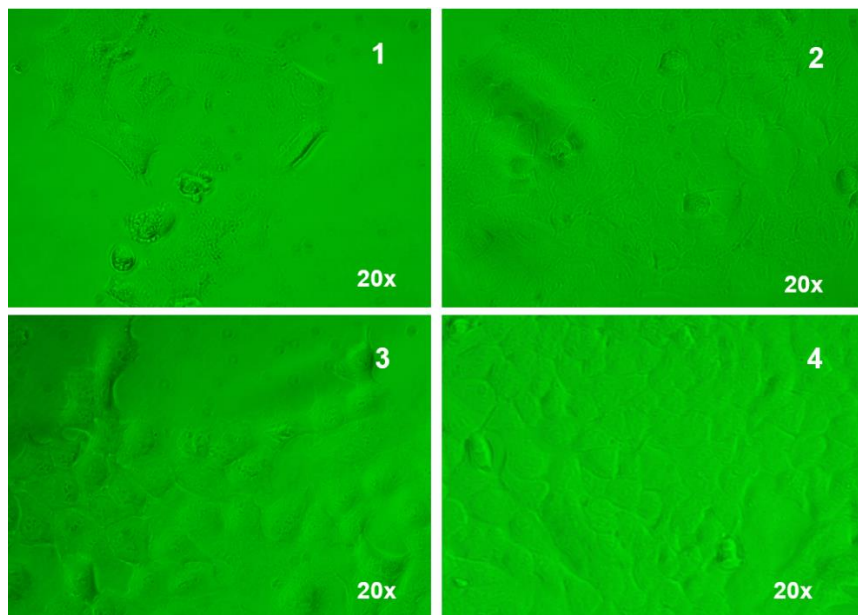


Figura No. 32: Clonas HEK293 individuales por dilución limitante al décimo día con antibiótico. Se observa como las células continúan su crecimiento en medio de selección (550 µg/mL). Imágenes vistas a 20x, campo claro.

Después de 15 días las clonas individuales en placas de 96 pozos presentaron una confluencia $\geq 50\%$; por lo que se escogieron al azar 12 clonas de cada pool clonal (#1-4) para ser traspasadas a una placa de 24 pozos y continuar con su crecimiento celular (# Total de clonas manejadas: 48). Una vez que estas clonas alcanzaron confluencias $\geq 80\%$, se escogieron 10 clonas de cada pool clonal para realizar un ELISA y determinar cuáles son productoras para IFN- γ (# Total de clonas manejadas: 40).

De acuerdo al análisis mediante la ecuación de la línea recta ($y = 0.0081x + 0.0286$) obtenida de la curva de calibración del estándar de IFN- γ (ver sección de Anexos No. 15.13); se logró determinar (ver Figura No. 33) que de las 40 clonas individuales analizadas sólo 25 fueron productoras para Interferón gamma humano obteniéndose un rendimiento del 65% y en concentraciones que van de ~ 13 a >400 pg/mL en un tiempo de cultivo de 168 h (ver Tabla No. 13 en la sección de Anexos No. 15.14).

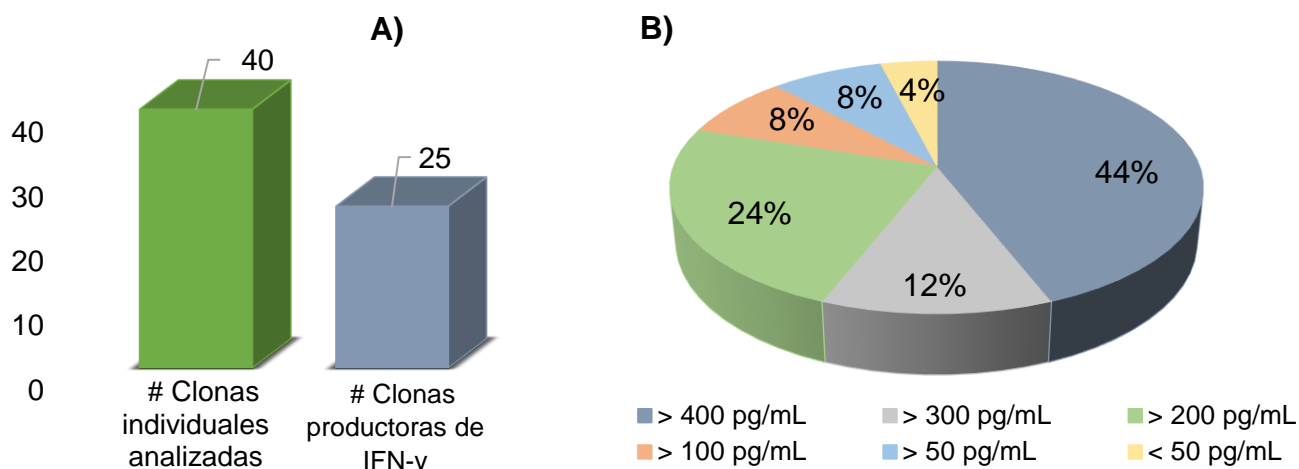


Figura No. 33: Cuantificación de IFN- γ en los SN de clonas HEK293 individuales. A) Clonas individuales HEK293 obtenidas por dilución limitada. Se analizaron los SN de 40 clonas (168 h de cultivo) determinando que sólo 25 fueron productoras para IFN- γ (rendimiento 65%). **B) Análisis de producción.** Se determinó que un 44% corresponde a clonas sobreproductoras alcanzándose concentraciones >400 pg/mL; siguiendo un 24% de clonas con producción media (>200 pg/mL).

9.10 Selección y caracterización celular de clonas productoras para IFN- γ .

De acuerdo a la sección anterior se seleccionaron 4 clonas productoras denominadas 1.2, 1.3, 3.1 y 3.2 derivadas de los pools clonales #1 y 3 (ver Tabla No. 13 en la sección de Anexos No. 15.14). Las clonas seleccionadas 1.2 y 3.1 presentaron una mayor producción (>400 pg/mL), mientras que 3.2 fue de producción media (>200 pg/mL) y 1.3 de producción baja (>50 pg/mL); esto con la finalidad de observar diferencias en cuanto a crecimiento celular en comparación al control negativo (células HEK293 sin transfectar).

En las Figuras No. 34-37, se puede observar la cinética de crecimiento de cada clona productora; donde se logró apreciar solo 2 fases características (Fase Lag y exponencial). La Fase Lag de las clonas 1.2, 3.1 y 3.2 (ver Figura No. 34, 35 y 36) fue ~48 h la cual se encuentra dentro del rango establecido (Tavira Montalván, 2014). Sin embargo, en comparación al control negativo (Fase Lag: 24 h en células HEK293 sin transfectar) se observó una diferencia con la clona de producción baja (#1.3) ya que la adaptación al sustrato fue más lenta (>72 h) después de sufrir estrés por el subcultivo.

Por otro lado, con los datos de la Fase exponencial se calcularon los parámetros cinéticos como velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación. En el caso de la clona #3.1 se obtuvo una μ de 0.0199 h⁻¹ y td: 34.8 h; la clona #1.2 arrojó una μ : 0.0188 h⁻¹ y td: 36.8 h, la clona #3.2 fue de μ : 0.0183 h⁻¹ y td: 37.8 h y finalmente en la clona #1.3 fue de μ : 0.0187 h⁻¹ y td: 37 h. Con base a estos resultados se determinó que hay una diferencia de

5-8 h en los tiempos de duplicación en comparación al control negativo (~30 h); este efecto se observa en líneas finitas en el cual al transcurrir el número de pase la velocidad específica de crecimiento disminuye aumentando los tiempos de duplicación (Tavira Montalván, 2014). Así mismo, se observó que las clonas sobreproductoras #1.2 y 3.1 alcanzaron altas densidades máximas de $2.77E+06$ y $2.60E+06$ células/mL; y conforme la producción disminuye, el td es mucho más retardado con densidades máximas reducidas de $2.29E+06$ células/mL para la clona #3.2 y $1.34E+06$ células/mL para la clona #1.3. En ésta última se aprecia notoriamente como su crecimiento celular es mucho más lento lo cual concuerda con su baja producción (menos células = baja producción = td tardío). Finalmente, en cuanto a viabilidad celular se observa que al final del cultivo todas las clonas presentaron >90%, lo cual es favorable dadas las condiciones del cultivo con antibiótico.

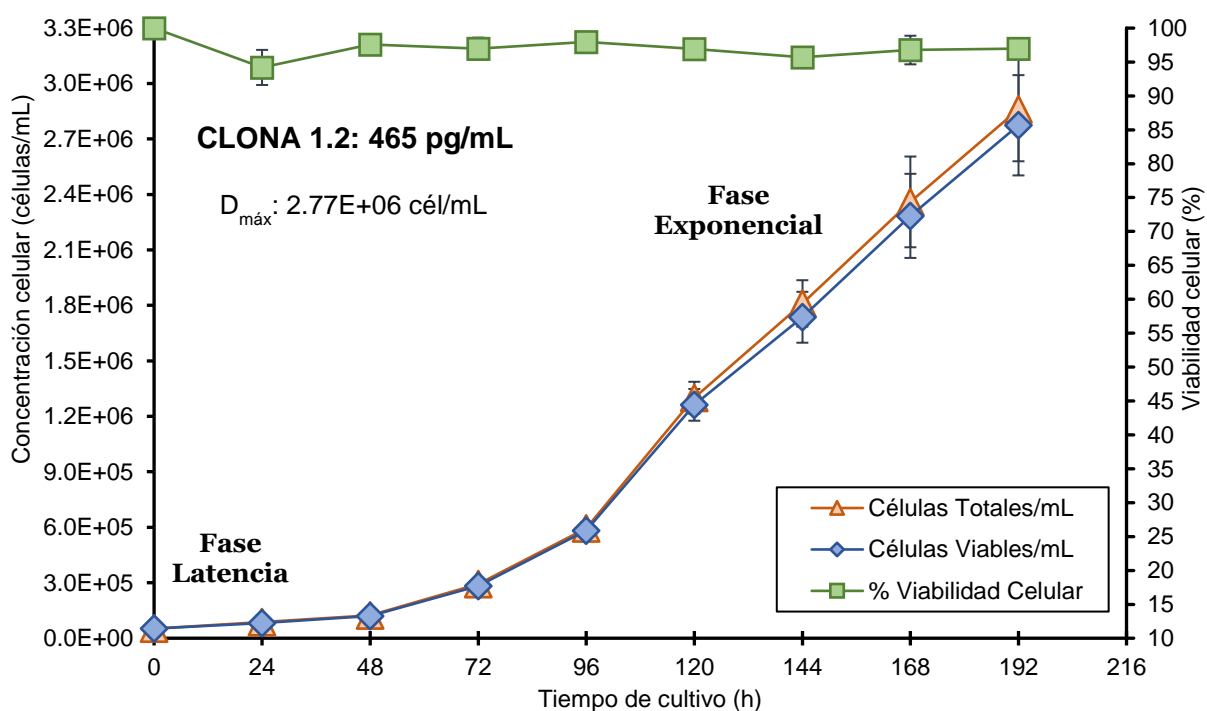


Figura No. 34: Cinética de crecimiento de clona #1.2, producción de IFN- γ ALTA. Medio de cultivo utilizado DMEM/F-12 al 10% SFB a una densidad celular de 50,000 células/mL. Td: 36.86 h, $\mu = 0.0188$ h⁻¹. La desviación estándar es de tres repeticiones por punto.

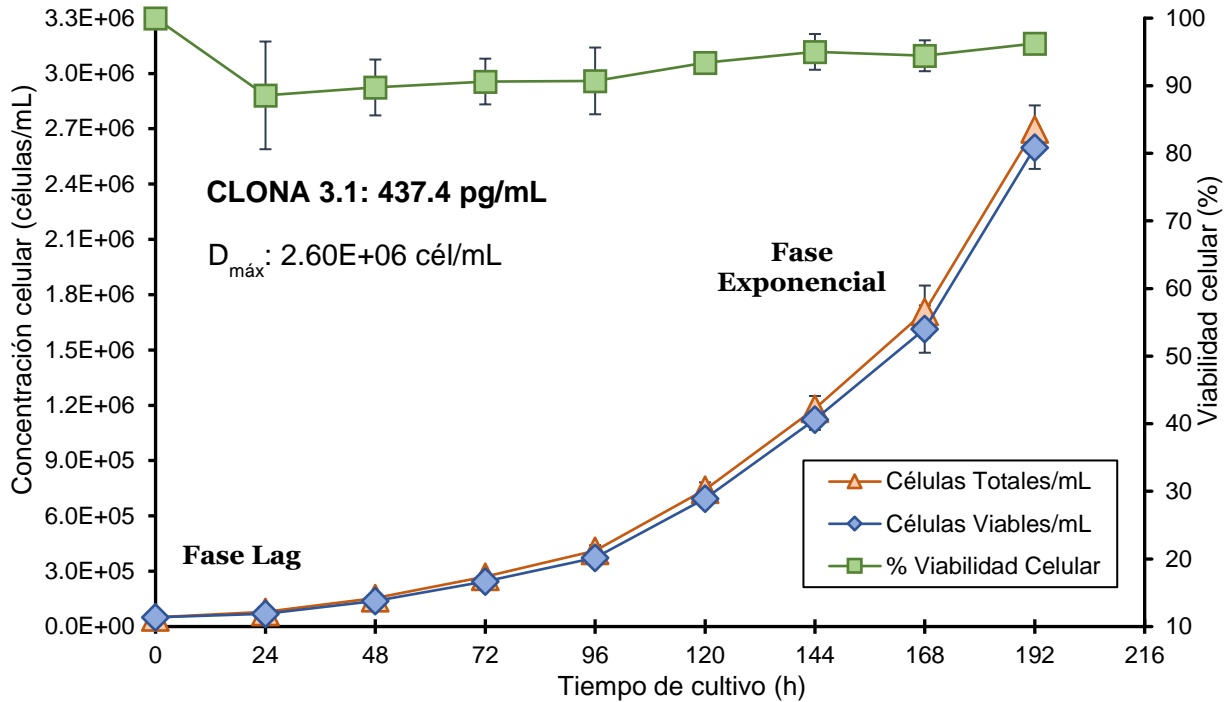


Figura No. 35: Cinética de crecimiento de clona #3.1, producción de IFN- γ ALTA. Medio de cultivo utilizado DMEM/F-12 al 10% SFB a una densidad celular de 50,000 células/mL. Td: 34.83 h, $\mu = 0.0199 \text{ h}^{-1}$. La desviación estándar es de tres repeticiones por punto.

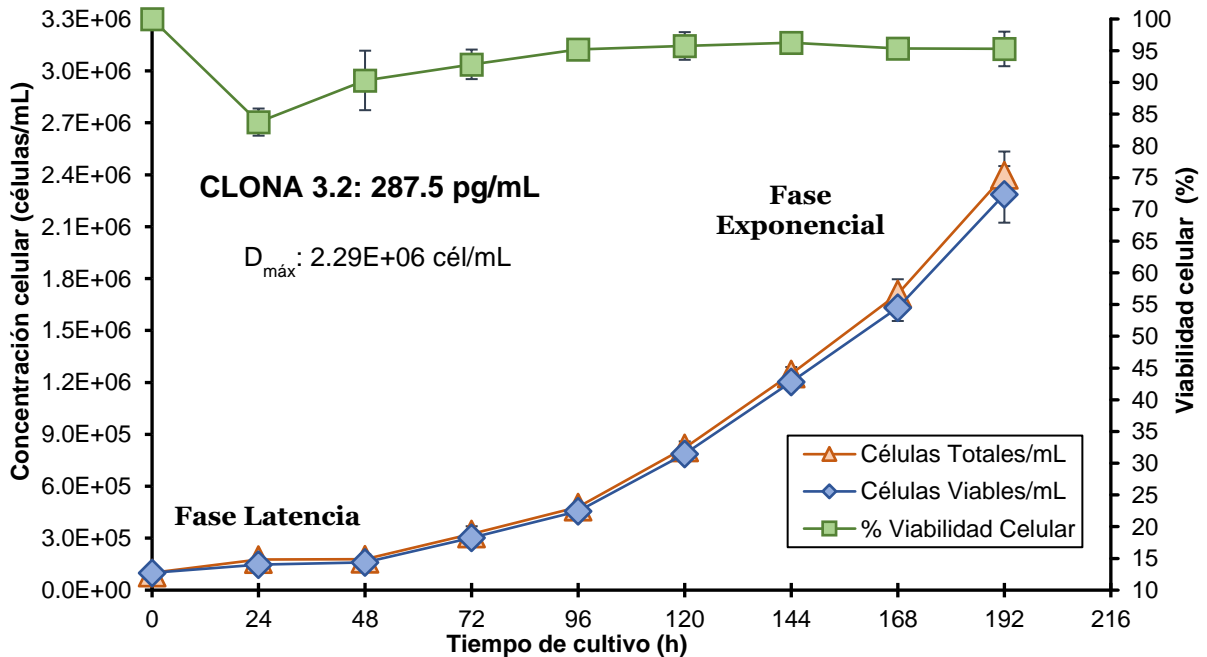


Figura No. 36: Cinética de crecimiento de clona #3.2, producción de IFN- γ MEDIA. Medio de cultivo utilizado DMEM/F-12 al 10% SFB a una densidad celular de 50,000 células/mL. Td: 37.87 h, $\mu = 0.0183 \text{ h}^{-1}$. La desviación estándar es de tres repeticiones por punto.

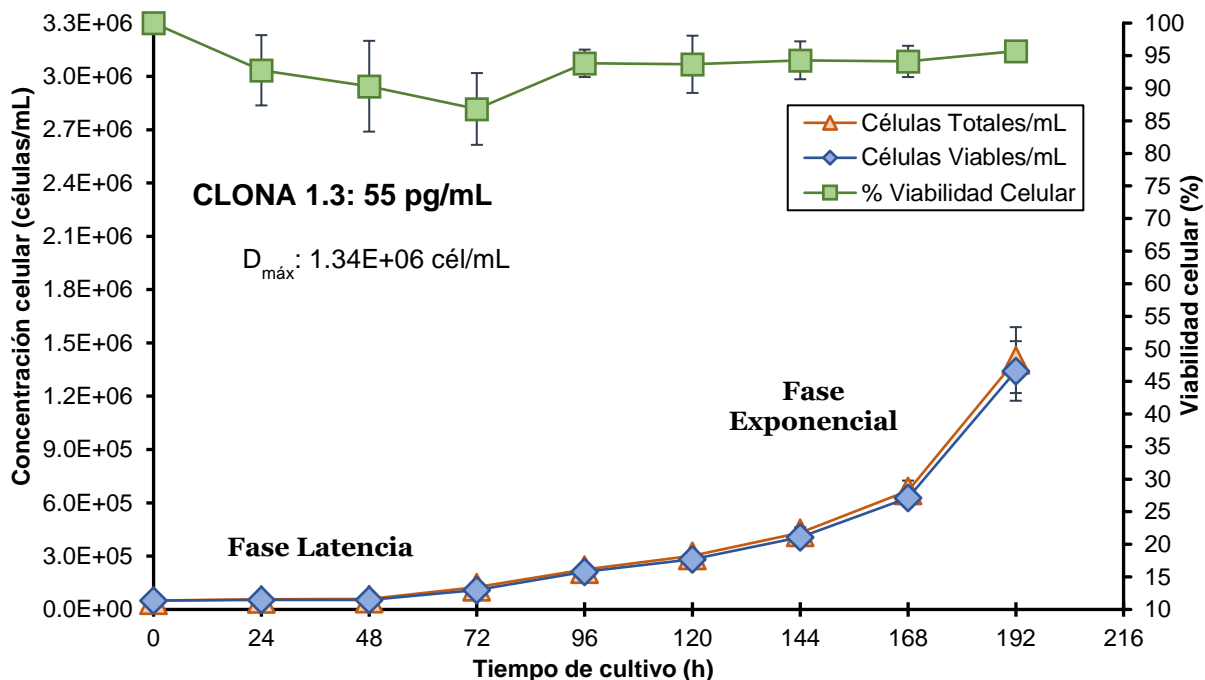


Figura No. 37: Cinética de crecimiento de clona #1.3, producción de IFN- γ BAJA. Medio de cultivo utilizado DMEM/F-12 al 10% SFB a una densidad celular de 50,000 células/mL. Td: 37.06 h, $\mu = 0.0187 \text{ h}^{-1}$. La desviación estándar es de tres repeticiones por punto.

Una vez que se determinaron los parámetros cinéticos de cada clona productora se evaluó nuevamente la presencia de ARNm específicos para IFN- γ , donde a través del RT-PCR (ver Figura No. 38) se comprobó que efectivamente las clonas con producción alta (#1.2 y #3.1) y media (#3.2) aún contienen los transcritos para dicho gen (carriles No. 3-5) amplificándose el segmento a las ~520 pb a excepción de la clona con producción baja (#1.3, carril No.6); lo cual pueda deberse a un posible silenciamiento génico ya que a pesar de que la clona continúa creciendo en presencia de medio de selección con antibiótico ya no se logra observar la expresión génica y proteica del IFN- γ (ver más adelante). Así mismo, en la Figura No. 38-B se corrobora la presencia del gen constitutivo en todos los cultivos HEK293 con y sin transfectar, amplificándose el segmento ~496 pb.

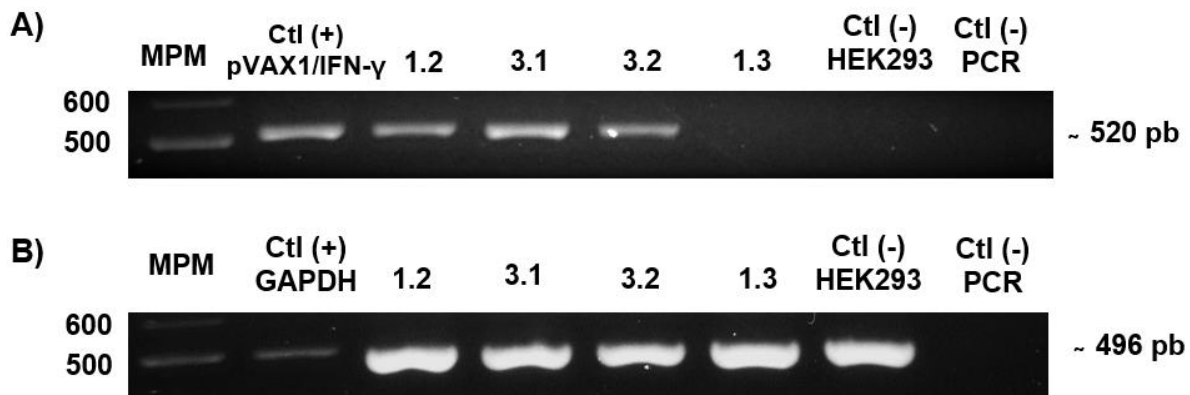


Figura No. 38: Gel de agarosa del RT-PCR de clonas HEK293 productoras de IFN- γ . A) ARNm IFN- γ . Se observa que sí hubo amplificación del segmento correspondiente al IFN- γ a las ~520 pb. B) Control GAPDH. Amplificación del control constitutivo en todos los cultivos con y sin transfectar, ~496 pb.

Con base al ELISA (ver Figura No. 39) se logró determinar que las clonas HEK293 #1.2, 3.1 y 3.2 siguen secretando la proteína de interés al medio de cultivo a concentraciones >400 pg/mL a un tiempo de 168 h (las muestras que se analizaron fueron las obtenidas de las cinéticas de crecimiento); sin embargo, ya no hay presencia de IFN- γ en las muestras correspondientes a la clona #1.3. Así mismo, se observó que la clona #3.2 la cual se consideraba de producción media produce igual que las clonas sobreproductoras (#1.2 y 3.1) lo cual fue debido a que como se inició a una densidad celular menor (50000 células/mL) generó células más homogéneas mejorando su producción.

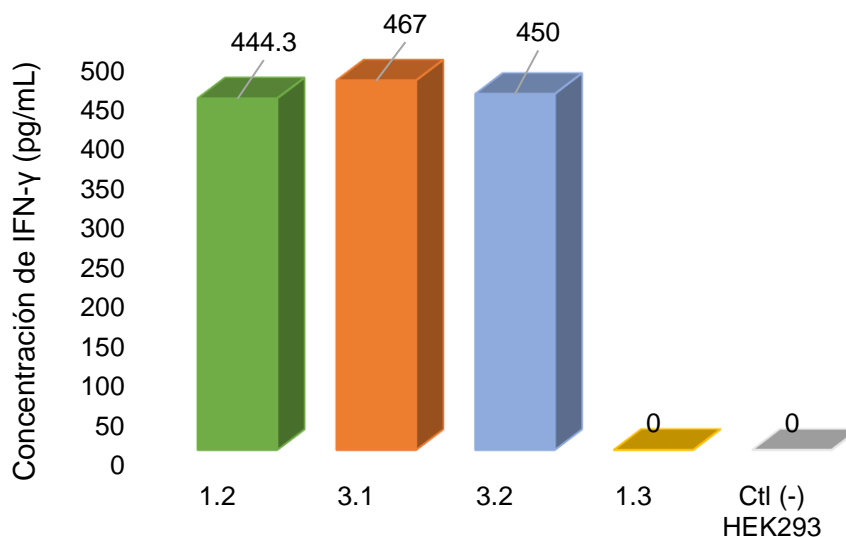


Figura No. 39: Cuantificación de IFN- γ de clonas HEK293 productoras. Se determinó la concentración de IFN- γ de los SN obtenidos de las cinéticas de crecimiento a las 168 h de cultivo, observando que las clonas 1.2, 3.1 y 3.2 siguen expresando la proteína de interés >400 pg/mL; sin embargo, ya no se detecta IFN- γ en la clona 1.3 debido a un silenciamiento génico.

Por otro lado, a través de un Western Blot SDS-PAGE se verificó la presencia de la proteína en el medio de cultivo. En la Figura No. 40 se puede observar en el carril No. 6 una banda alrededor de los 13 kDa correspondiente al estándar de Interferón gamma producido en *E. coli*; sin embargo, en las muestras de los SN de clonas productoras #3.2, 3.1 y 1.2 (carriles No. 3-5) se observan bandas a un peso molecular de ~20 kDa correspondiente al hIFN- γ glicosilado tipo II (Mata-Espinosa & Hernández-Pando, 2008). Así mismo, de acuerdo a los resultados anteriores (por RT-PCR y ELISA) se corrobora que no existe presencia de la proteína en el SN en la clona #1.3 (carril No. 2).

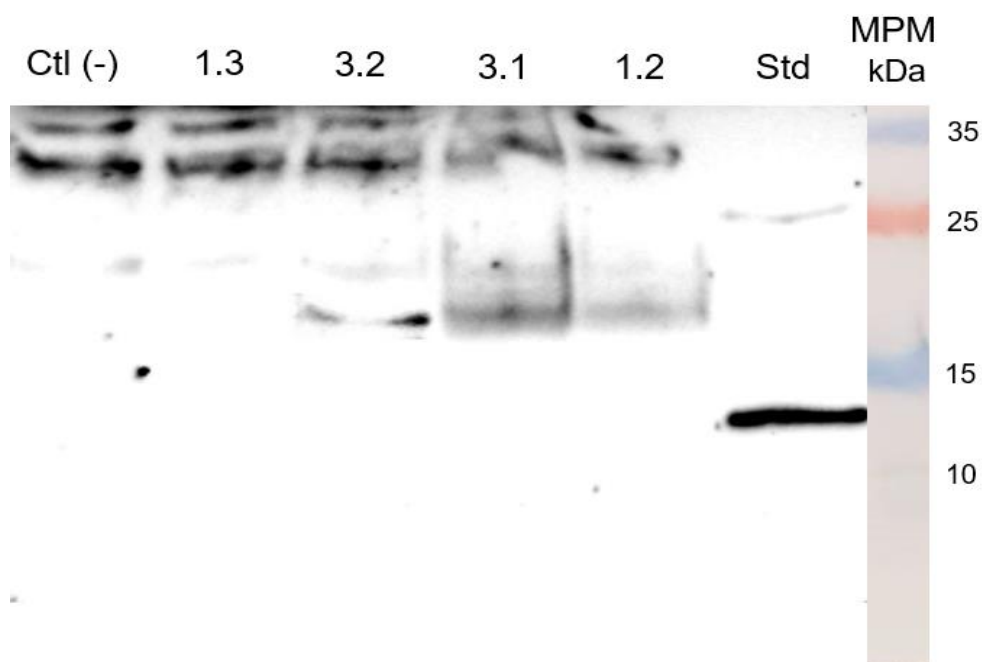


Figura No. 40: Análisis de la expresión proteica de IFN- γ por Western Blot SDS-PAGE en SN de clonas productoras. Se analizó los SN obtenidos de las cinéticas de crecimiento a las 168 h de cultivo; observándose mediante SDS-PAGE bandas a ~20 kDa en las clonas #3.2, 3.1 y 1.2 correspondiente a la proteína IFN- γ tipo II (glicosilado). En la sección de Anexos No. 15.15 (Figura No. 45) se muestra los duplicados del análisis.

9.11 Análisis de la expresión de IFN- γ en células HEK293 adaptadas a medio libre suero.

Se adaptaron las poblaciones sobreproductoras (#1.2 y 3.1) de manera secuencial a medio libre de suero (ExcellHEK293, 6 Mm Glutamina); sin embargo, las células de la clona #1.2 fueron más susceptibles al cambio de medio provocando su muerte celular (datos no mostrados). Por lo tanto, se continuaron los subcultivos solamente de la clona #3.1 observando (ver Figura No. 41) que al llegar al 100% de medio libre de suero las células adquieren una morfología esférica y flotando en el SN; aunque la mayoría de ellas aún

continúan en adherencia al sustrato (debido a que se encuentran en frascos de poliestireno los cuales son tratados para la adhesión celular).

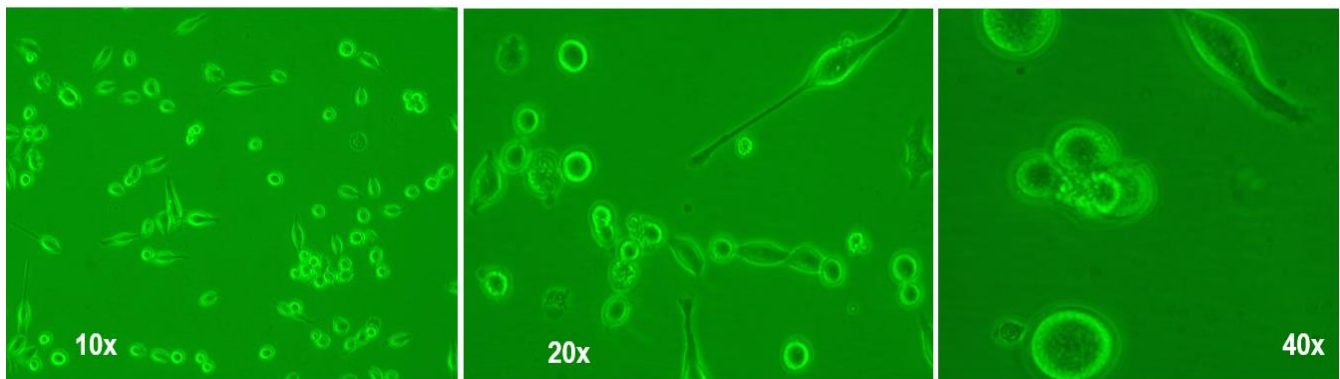


Figura No. 41: Morfología de células HEK293 en medio definido, provenientes de la clona #3.1. Se observó presencia de células con morfología esférica; sin embargo, la mayoría continúan en adherencia (morfología fusiforme). Vistas a 10, 20 y 40x, campo claro.

Así mismo, se determinó que la densidad celular disminuye ya que se observa aglomeración entre células con cambios irregulares en la morfología. SAFC Biosciences, Inc., 2005 menciona que es normal ver una caída en la viabilidad celular, así como un retraso en el crecimiento durante los dos primeros pases de la adaptación, por lo que recomiendan continuar de 5 a 6 pasajes cuando estén al 100% de medio EX-CELL™293 para que las células se adapten totalmente y así poder alcanzar viabilidades >95%.

Por otro lado, fue importante determinar también si la proteína en cuestión aún se sigue expresando con el cambio de medio y además con los subsecuentes pases; por lo que se analizó el SN de la población clonal #3.1 a las 144 h de cultivo a través de un ELISA y Western Blot SDS-PAGE. La Figura No. 42 representa el SDS-PAGE en cual se observaron bandas ~20 kDa en los carriles No. 3 y 4 correspondiente al peso del Interferón gamma humano tipo II glicosilado en concentraciones de 294.02 pg/mL; dichos resultados fueron favorables para determinar que efectivamente al pase #33 la citocina continúa expresándose. Finalmente, este cultivo se continuó adaptando para su criopreservación.

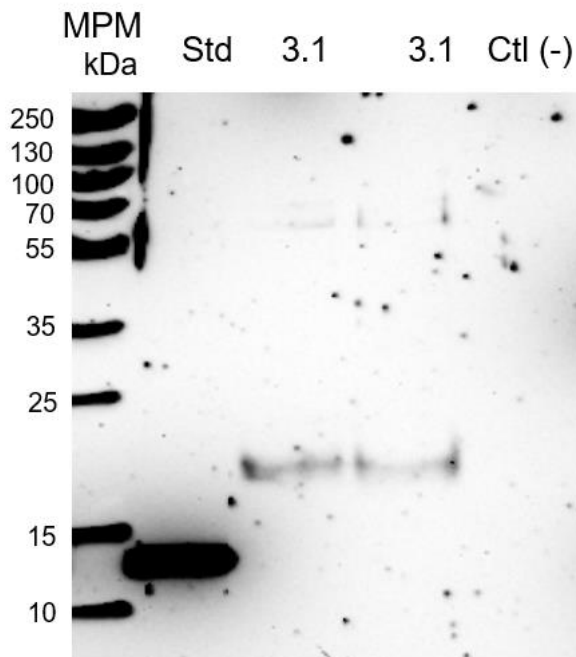


Figura No. 42: Análisis de la expresión proteica de IFN- γ por Western Blot SDS-PAGE en medio libre de suero, población clonal #3.1. Carril No. 1: MPM; carril No. 2: estándar de IFN- γ (*E. coli*, ~13 kDa); carril No. 3 y 4: SN de la población clonal #3.1, carril No. 5: medio EX-CELL™293. Se analizó el SN obtenido a las 144 h de cultivo en medio al 100% libre de suero. Se muestra el resultado SDS-PAGE de 2 repeticiones.

9.12 Análisis proteico del IFN- γ en células recombinantes HEK293 descongeladas.

Se analizó si las células HEK293 son estables después de su criopreservación por 3 meses. Por lo tanto, se descongeló en presencia de SFB la clona #3.1 al pase 24 (ya que de acuerdo a la sección anterior fue la que resistió mejor la adaptación a medios definidos) con el objetivo de continuar mejorando la adaptación celular para servir de base en futuros análisis. La Figura No. 43 muestra el resultado del SDS-PAGE realizado, donde se observó nuevamente la presencia de una banda ~20 kDa correspondiente al hIFN- γ tipo II. Con base a esto afirmamos que la proteína de interés sigue expresándose después de su criopreservación con DMSO lo cual es un resultado favorable para observar la estabilidad de la clona. Así mismo, se determinó que la proteína se encuentra en una concentración de 289.23 pg/mL.

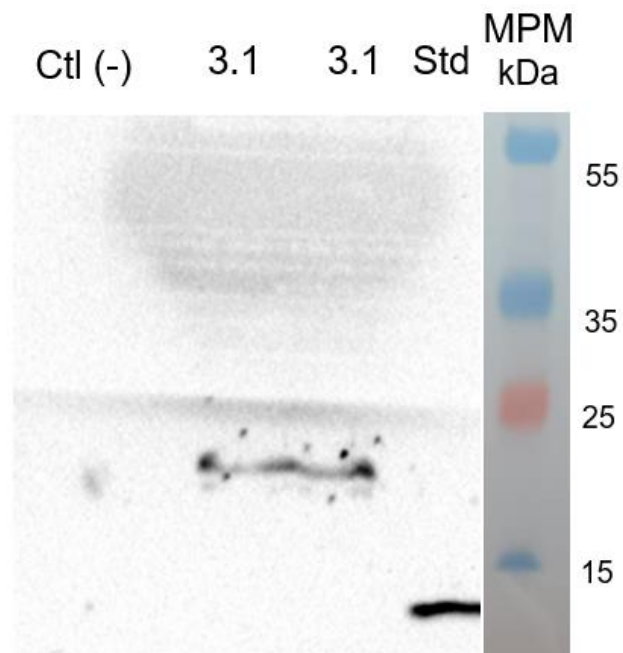


Figura No. 43: Análisis de la expresión proteica de IFN- γ por Western Blot SDS-PAGE del SN de la clona HEK293 #3.1 descongelada. Carril No. 1: medio EX-CELL™293; carril No. 2 y 3: SN de clona #3.1, carril No. 4: estándar de IFN- γ (E. coli, ~13 kDa); carril No. 5: MPM. Se analizó el SN obtenido a las 192 h de cultivo; donde se observó una banda a ~20 kDa en la clona 3.1 correspondiente al IFN- γ glicosilado tipo II. El SDS-PAGE muestra el resultado de 2 repeticiones.

X. DISCUSIÓN

Hasta ahora, las líneas celulares de mamíferos aprobadas para la fabricación de proteínas terapéuticas recombinantes incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón de hámster bebé (BHK), células de hibridoma murino Sp2/0, células de mieloma murino (NS0) y células de riñón embrionario humano 293 (HEK293). En particular, esta última ha ganado una importancia significativa en el campo Biofarmacéutico durante las dos últimas décadas para la producción de vectores adenovirales y proteínas recombinantes transitorias o estables debido a que cumplen con la cGMP, presentan una alta eficiencia de transfección, adaptabilidad a medios libres de suero y la obtención de proteínas menos inmunogénicas ya que no producen epítomos como Neu5Gc y α -Gal que se sabe que impiden la seguridad y la eficacia terapéutica (Liste-Calleja *et al.*, 2015; Chin *et al.*, 2019). Se ha informado sobre la productividad de miligramos de proteína por litro (50-80 mg/L) de cultivo generado por transfección transitoria, tanto para las células HEK293 como para CHO y >300 mg/L con productividades celulares de más de 50 pg/célula*día por expresión estable. La elección entre estos dos sistemas dependerá del rendimiento, la cantidad y calidad del producto requerido; sin embargo, los sistemas con expresión estable son los preferidos para la obtención de grandes cantidades de proteína (escalable) ya que proporcionan altos rendimientos con una calidad constante y en periodos más largos (meses); debido a que el ADNc del gen de interés se integra en el genoma del hospedero (Huang *et al.*, 2010; Liu C., Dalby, Chen, Kilzer y Chiou, 2008).

Por lo tanto, en el presente estudio se buscó desarrollar líneas celulares HEK293 que expresen establemente la proteína de Interferón gamma humano (citocina implicada en la inmunidad innata y adaptativa) para obtener mayores productividades que las alcanzadas por el sistema transitorio Ad5/IFN- γ construido previamente en el Laboratorio (19.2 pg/mL), lo que impidió evaluar la eficacia *in vitro* e *in vivo* de la molécula inmunoestimuladora.

El desarrollo para la obtención de líneas celulares estables abarca meses y consiste en seleccionar varios clones en busca de atributos de productividad y calidad. El enfoque más común implica la transfección con vectores que llevan el gen de interés y un marcador seleccionable para la integración cromosómica aleatoria; el aislamiento de células bajo presión selectiva para eliminar la población celular que tiene poca o ninguna expresión del transgén; la detección de clones de células individuales con niveles de expresión más altos a través del método por dilución limitada (clones genéticamente idénticos); así como la evaluación de la estabilidad de expresión durante los pases (Hunter, M. *et al.*, 2018).

Con base a los resultados obtenidos se realizó un análisis de la evolución de la selección clonal (ver Tabla No. 12) para la obtención de líneas celulares HEK293 estables. En el cual se obtuvieron 4 pools clonales (denominados #1-4) al inicio de la transfección con el vector recombinante pcDNA3+/IFN- γ siendo crio preservados como banco maestro. Posteriormente, a través del método de dilución limitada se obtuvieron 48 clonas individuales totales para su amplificación a placas de 24 pozos de las cuales sólo 40 clonas fueron seleccionadas para realizar el análisis proteico. A través del ELISA se determinó que sólo 25 clonas son productoras para Interferón gamma humano obteniéndose un rendimiento del 65% y concentraciones que varían desde los 13 a >400 pg/mL. Así mismo, se observó que se generaron más clonas productoras (#9 y 8) provenientes de los pools clonales #2 y 4; sin embargo, se seleccionaron las clonas 1.2, 3.1 provenientes de los pools clonales (#1 y 3) debido que presentan mayor productividad de la citocina, así como clonas de producción media y baja para evaluar cambios en el crecimiento versus productividad.

Tabla No. 13: Desarrollo de líneas HEK293 estables.

Pools clonales iniciales (~65 generaciones)	Dilución limitada	Selección de clonas individuales para amplificación	Selección de clonas individuales para análisis	Clonas productoras para IFN- γ (pase 18)	Selección de clonas productoras para amplificación y caracterización
1 (77 pg/mL)	96	12	10	4	1.2* (465 pg/mL) 1.3* (54.8 pg/mL)
2 (122 pg/mL)	96	12	10	9	
3 (62 pg/mL)	96	12	10	4	3.1* (437.4 pg/mL) 3.2* (287.5 pg/mL)
4 (45 pg/mL)	96	12	10	8	
Total: 4	384 ¹	48	40 ²	25 ³	

¹Se observaron colonias aisladas en la mayoría de los pozos de las placas de 96.

²Solo 40 clonas fueron seleccionadas para el análisis proteico porque no todas presentaban confluencias >90%.

³Las clonas productoras de IFN- γ se preservaron en nitrógeno líquido en caso de realizar futuros experimentos.

*Denominación de clonas productoras provenientes de los pools clonales #1 y 3.

La obtención de clonas productoras individuales por dilución limitada es variable entre lo reportado por otros autores que van desde <30 hasta >95 clonas obtenidas (Schiedner *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2014; Zitzmann *et al.*, 2018); por lo que no refleja malos resultados para seguir con su análisis.

El análisis al pase #18 (~95 generaciones) de las clonas HEK293 individuales demostró que las células son capaces de secretar al medio de cultivo el IFN- γ a pesar de la variabilidad en las concentraciones obtenidas. Se cree que la variabilidad en los niveles de

expresión depende del número de copias del gen dentro de la célula, así como la influencia de la estructura de la cromatina y/o la presencia de elementos reguladores en el sitio de integración en el genoma del hospedero, fenómeno denominado "efecto de posición" (Wilson *et al.*, 1990). Un enfoque simple y rápido para superar los efectos de posición sería utilizar elementos de cromatina que eviten que la cromatina vecina afecte la expresión génica mejorando así la productividad; ejemplo de ellos serían los elementos de límite (BE), andamios o regiones de unión a matriz (MAR, aumenta la integración transgénica en el genoma celular) y regiones de control de locus (LCR) (Zahn-Zabal *et al.*, 2001; Gorman *et al.*, 2009).

Por otro lado, la estabilidad de las líneas celulares HEK293 denominadas 1.2, 1.3, 3.1 y 3.2 se evaluó mediante el número de pases, caracterización celular y expresión génica-proteica. En la Tabla No. 13 se resumen los resultados obtenidos, en el cual se determinó que el Td entre las clonas con respecto al control negativo cambia con respecto al número de pase (de un pase #8 a 22) con una diferencia de 5-8 h; sin embargo, no es preocupante ya que los tiempos no son altos. Este efecto se puede observar en líneas finitas donde a medida que transcurre el número de pase la velocidad específica de crecimiento disminuye aumentando así el tiempo de duplicación; a >60 pases el td aumenta >43 h (Tavira Montalván, 2014).

Tabla No. 14: Parámetros cinéticos y productividad de IFN- γ . Pase 22-25, generaciones ~95.

Clonas individuales	Td (h)	Densidad celular máxima (cél/mL)	Concentración de IFN- γ (pg/mL)	Rendimiento (pg/cél)
1.2	37	2.77x10 ⁶	444	1.95x10 ⁻⁴
3.1	35	2.60x10 ⁶	467	2.9x10 ⁻⁴
3.2	38	2.29x10 ⁶	450	2.72x10 ⁻⁴
1.3	37	1.34x10 ⁶	0	0
Control negativo	30*	1.60x10 ⁶	0	0

*Cinética de crecimiento a pase #8.

Se determinó que la productividad de la citocina también depende de la densidad celular en el cual se obtuvieron densidades >2x10⁶ células/mL en las clonas con producción a >400 pg/mL y rendimientos $\geq 2 \times 10^{-4}$ pg/cél; sin embargo, en la clona considerada de producción baja (#1.3) con una densidad <1.34x10⁶ células/mL ya no se logró su cuantificación, lo cual pueda deberse a un silenciamiento génico. Autores mencionan que debido a que la integración de los vectores al genoma hospedero es de manera aleatoria, los efectos de posición generalmente manifiestan una pérdida de expresión parcial o completa. Dicha

integración ocurre por recombinación no homóloga y puede presentarse tanto en una región de cromatina altamente condensada y silenciada (Heterocromatina) dando como resultado una expresión transgénica mínima o nula; o en una cromatina más abierta y activa (eucromatina) favoreciendo su transcripción en niveles más altos. Debido que una gran proporción del genoma está en forma de Heterocromatina, la posibilidad de que el transgén se integre en o cerca puede generar una alta consecuencia en el silenciamiento o represión del transgén (Gorman et al., 2009). Así mismo, se corroboró la pérdida de la expresión génica del IFN- γ en esa clona a través del RT-PCR (ver Figura No. 38) ya que no se observan los transcritos específicos ARNm; mientras que las demás (#1.2, 3.1 y 3.2) continúan con su expresión al observarse bandas ~520 pb. Por otro lado, el análisis de la expresión proteica por SDS-PAGE demostró que las clonas HEK293 individuales continúan secretando al pase #22-25 la proteína a un peso molecular ~20 kDa, correspondiente al IFN- γ tipo II. Se dice que es de tipo II con respecto a lo reportado por Mata-Espinosa, D.A. & Hernández-Pando, R., 2008 y Sareneva et al, 1995; en cual mencionan que dependiendo del número de sitios que estén glicosilados el peso molecular del IFN- γ se verá reflejado en 3 distintas maneras: 15 kDa sin ningún sitio glicosilado, 20 kDa con un sólo sitio glicosilado y a 25 kDa con ambos sitios glicosilados, denominándolos tipo I, II y III.

Hasta ahora las clonas individuales obtenidas presentaron estabilidad en la expresión proteica al número de pase #18 a 25; corroborando a través de los análisis por adaptabilidad a medios químicamente definidos y congelación-descongelación el desarrollo de una línea celular con expresión estable ya que la proteína de interés continúa expresándose aún sin presión selectiva al mismo nivel de transcripción (ARNm 520 pb, >300 pg/mL) y peso molecular (~20 kDa) así como a número de pase >33 y ~215 generaciones.

En general, el tiempo de desarrollo de las líneas HEK293 fue ~8-10 meses y de acuerdo a los análisis de estabilidad sí se logró obtener líneas celulares con expresión estable. Por lo tanto, este proyecto puede servir de base para crear futuras líneas ya que los protocolos utilizados para la selección fueron sencillos y las amplificaciones de las clonas se redujeron a sólo placas de 24 pozos y frascos T25 por lo se podría reducir el tiempo de trabajo (~6 meses). La ventaja en nuestro caso, fue debido a que el método de dilución limitada no fue tedioso ya que sólo se utilizó la dilución final y no requirió de una serie de diluciones lo que provocaría más manipulación de la muestra y contaminaciones; así mismo no requirió de equipos sofisticados para la selección clonal. Por otro lado, el uso de un sistema adherente y en presencia de suero fetal bovino favoreció también la obtención de clonas individuales

y más homogéneas a densidades extremadamente bajas, debido a sus principales componentes como son: factores de crecimiento (PDGF, FGF, EGF, VEGF y IGF-1), factores de adhesión (Fibronectina) y actividad antitripsina (α_2 -macroglobulina), así como proteínas (Albúmina, Transferrina), minerales (hierro, cobre, zinc, selenio, usualmente unidos a la albúmina), lípidos (ácido oleico, ácido linolénico, etanolamina, fosfatidiletanolamina) y hormonas (Hidrocortisona e insulina) (Beltrán V. y González de la Rosa, 2016). En nuestros cultivos el SFB favoreció la adherencia y división celular por lo que no requirió de medios metabolizados, más tiempo de cultivo o de una densidad mayor para favorecer la proliferación. A pesar de que las agencias regulatorias prohíben el uso para la producción de proteínas recombinantes por sus desventajas como: altos costos, preocupación por las materias primas indefinidas que potencialmente contienen agentes adventicios (virus, endotoxinas, micoplasma), problemas éticos, variabilidad de lote a lote (Van Der Valk *et al.*, 2018). En nuestro proyecto sólo se utilizó para la obtención de clonas individuales productoras para su posterior adaptación a medios libres de suero debido a que no se obtuvieron resultados favorables cuando se utilizó un sistema HEK293 en suspensión y medio SFM4 (datos no mostrados). Por lo tanto, como perspectivas se recomienda continuar con la adaptación de las clonas estables obtenidas en medios EX-CELL™293 para su posterior escalamiento y que nos permita así obtener mayor productividad. Además, esta adaptación podría simplificar el proceso de purificación (Downstream) para evaluar la actividad inmunoestimuladora del IFN- γ .

Con base a las concentraciones alcanzadas de IFN- γ (ver Tabla No. 14) se logró determinar que el sistema de integración aleatorio aumenta significativamente la productividad de la citocina 2.6 ng/mL, ~100 veces más al ser comparado con el sistema transitorio Ad5/IFN- γ 0.019 ng/mL. Debido a que el Ad5 se caracteriza por una adsorción lenta en las células, así como un ciclo de crecimiento largo (30-40 h), se ha observado que la máxima producción alcanzada de proteína recombinante se ve retardada hasta las 120-144 h de cultivo (Sosa García, 2018). Esto en comparación con la producción de otras proteínas en suspensión (como EPO, IFN α 2b, CapPCV2) y sistemas más sofisticados como RMCE y CRISPR/Cas9 (Loignon *et al.*, 2008; Liste-Calleja *et al.*, 2015; Chin *et al.*, 2019) se puede observar que nuestra producción aún es baja; sin embargo, aún no se ha realizado en nuestros cultivos una producción volumétrica y en sistemas en suspensión para determinar exactamente los niveles de proteína que se puedan alcanzar.

Tabla No. 15: Productividades alcanzadas en HEK293 de diferentes proteínas y sistemas.

	[IFN- γ] (ng/mL)	[CapPCV2] (ng/mL)	[IFN α 2b] (mg/mL)	[EPO] (mg/mL)
Infección adenoviral	0.019 1.92x10 ⁻⁸ mg/mL	20.85		
Integración ilegítima	2.6 ¹ 2.6x10 ⁻³ mg/mL	327.34	333* (Loignon <i>et al.</i> , 2008)	
Integración dirigida al sitio		256.57 RMCE (Liste-Calleja <i>et al.</i> , 2015)		696* CRISPR/Cas9 (Chin <i>et al.</i> , 2019)

*Producción volumétrica, cultivos en suspensión.

¹Máxima concentración alcanzada ~2568 pg/mL.

A pesar de ello, sería conveniente realizar líneas celulares estables HEK293-IFN- γ basados en integración dirigida debido a que se ha reportado que mejoran la producción (Liste-Calleja *et al.*, 2015; Chin *et al.*, 2019) así como implementar otros elementos en los vectores de transferencia para mejorar la selección clonal. A continuación, se mencionan algunas alternativas para mejorar la producción de proteína. (1) En lugar de una integración aleatoria que deriva problemas de silenciamiento génico, sería deseable dirigir el gen de interés a un locus específico que permita una transcripción génica fuerte y estable. El sistema mediante el intercambio de cassette mediado por recombinasa (RMCE) podría utilizarse, ya que el proceso es más rápido (~7 semanas) desde el día de la transfección hasta la criopreservación de las líneas celulares de producción clonal (Büssow, 2015). Con el sistema CRISPR es posible elegir la zona del genoma a editar simplemente variando los 20 nucleótidos de reconocimiento homólogo en el sgRNA. Otra categoría de elementos reguladores para prevenir este silenciamiento y que permita el manteniendo de una región de eucromatina bajo transcripción activa; serían los elementos de apertura de cromatina ubicuos (UCOE) (Hunter, M. *et al.*, 2018).

(2) El uso de proteínas fluorescentes (por ejemplo: eGFP) como marcadores de selección nos permitiría aislar células estables de alta producción entre millones de células transfectadas mediante clasificación celular por FACS, sin aplicar presión selectiva. La expresión de GFP se puede acoplar a la expresión del gen de interés construyendo vectores bicistrónicos basados en el sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) (Büssow, 2015).

(3) Continuar con el uso del promotor CMV a pesar de que es propenso al silenciamiento epigenético, estudios han determinado que resulta ser más eficaz para la expresión de la

proteína en células HEK293 al ser comparado con los promotores como EF1 α y CAG (Román R., 2018).

XI. CONCLUSIÓN GENERAL

El desarrollo de líneas celulares HEK293 con expresión estable se llevó a cabo correctamente con el vector recombinante pcDNA3+/IFN- γ ya que las clonas son estables a más de 33 pases y 215 generaciones, confirmándose la transcripción de ARNm específicos, así como la expresión del Interferón gamma humano glicosilado de tipo II. Así mismo, la productividad de la proteína fue mayor (2.6 ng/mL) que la alcanzada por un sistema de expresión transitorio (Ad5/IFN- γ , 0.019 ng/mL).

XII. CONCLUSIONES PARCIALES

La construcción molecular pcDNA3+/IFN- γ se realizó correctamente ya que el análisis BLAST de la secuenciación demostró que existe una similitud del 100% al gen de IFN- γ humano (166 aa); sin embargo, es necesario secuenciar nuevamente para confirmar los resultados.

El uso de medios enriquecidos con suero permitió el crecimiento celular de cultivos HEK293 en densidades extremadamente bajas.

El método por dilución limitante permitió obtener 25 clonas individuales productoras para IFN- γ con un rendimiento del 65% y concentraciones que varían 13 a >400 pg/mL.

La clona HEK293 #1.3 a través del número de pase presentó silenciamiento génico con pérdida de la expresión génica y proteica del IFN- γ .

El tiempo de desarrollo de líneas celulares HEK293 con expresión estable fue de ~8-10 meses; en el cual se logró mantener la expresión génica (ARNm específicos, ~520 pb) y proteica (~20 kDa, IFN- γ tipo II glicosilado) del IFN- γ a través del transcurso del número de pase, adaptación y criopreservación.

XIII. PERSPECTIVAS

- Adaptar adecuadamente los cultivos estables HEK293/IFN- γ a medios químicamente definidos y realizar su escalamiento para obtener una mayor concentración proteica.
- Purificar el hIFN- γ obtenido de los cultivos recombinantes en suspensión para evaluar su actividad inmunoestimuladora en modelos *in vitro* e *in vivo*.
- Analizar y determinar el patrón de glicosilación del hIFN- γ obtenido de los cultivos estables HEK293/IFN- γ .
- Desarrollar líneas celulares HEK293 estables mediante sistemas UCOE o CRISPR/Cas9 para mejorar la productividad del IFN- γ .

XIV. BIBLIOGRAFÍA

Bandaranayake, A. D. y Almo, S. C. (2014). "Recent advances in mammalian protein production". *ELSEVIER. Federation of European Biochemical Societies*, 588, pp. 253–260. doi: 10.1016/j.febslet.2013.11.035.

Beltrán V., N. E. y González de la Rosa, C. H. (2016). "TÉCNICAS DE CULTIVOS CELULARES E INGENIERÍA DE TEJIDOS". Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa, en. México, D. F., pp. 67–68.

Büssow, K. (2015). "Stable mammalian producer cell lines for structural biology". *ELSEVIER, Current Opinion in Structural Biology*, 32, pp. 81–90. doi: 10.1016/j.sbi.2015.03.002.

C. Platanias, L. (2005). Mechanisms of Type-I- and Type II-Interferon-Mediated Signalling. *Nature Reviews Immunology*, 5(May), pp. 375–386. <http://doi.org/10.1038/nri1604>.

Chávez-Peña, C. *et al.* (2010). "Efecto de la densidad celular y la multiplicidad de infección sobre la producción de Baculovirus recombinantes en cultivos de células de insecto". *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 13(2), pp. 62–72.

Chin, C. L. *et al.* (2019). "A human expression system based on HEK293 for the stable production of recombinant erythropoietin". *SCIENTIFIC REPORTS*, 9(16768), pp. 1–16. doi: 10.1038/s41598-019-53391-z.

Chung, N. P. *et al.* (2014). "Stable 293 T and CHO cell lines expressing cleaved, stable HIV-1 envelope glycoprotein trimers for structural and vaccine studies". *Retrovirology*, 11(33), pp. 1–14.

Dalby, B. *et al.* (2004). "Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: Primary neurons, siRNA, and high-throughput applications". *Methods, ELSEVIER*, 33, pp. 95–103. doi: 10.1016/j.ymeth.2003.11.023.

De la Madrid Hurtado, M. (2009). Ley General de Salud. *Diario Oficial de La Federación*, pp. 1–180.

Drago Serrano, M. E. y Sainz Espuñes, T. del R. (2006). "Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes". *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37, pp. 38–44. doi: 10.5565/rev/athenea.1697.

Dumont, J. *et al.* (2016). "Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives". *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(6), pp. 1110–1122. doi: 10.3109/07388551.2015.1084266.

Fact. MR (2017). Recombinant Protein Market Forecast, Trend Analysis & Competition Tracking: Global Market insights 2017 to 2022. Link: <https://www.factmr.com/report/186/recombinant-protein-market>.

García, J. *et al.* (2013). "Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*". *VacciMonitor*, 22(2), pp. 30–39.

García López, Y. (2018). "EVALUACIÓN EN CÉLULAS A549 DE LA TRANSGÉNESIS DEL VECTOR Ad5/IFN- γ COMO POTENCIAL BIOFÁRMACO PARA TERAPIA GÉNICA". Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Geol Yoon, Y. y D. Koob, M. (2009). "Selection by drug resistance proteins located in the mitochondria of mammalian cells". NIH, manuscript, 8(5–6), pp. 345–351. doi: 10.1016/j.mito.2008.07.004.Selection.

GlobeNewswire (2020); ReportLinker, RECOMBINANT PROTEIN MARKET - GROWTH, TRENDS, AND FORECASTS (2019-2024). Link: https://www.reportlinker.com/p05865770/?utm_source=GNW.

Gorman, C. *et al.* (2009). Use of MAR Elements to Increase the Production of Recombinant Proteins. *Cell Line Development, Cell Engineering* 6. doi: 10.1007/978-90-481-2245-5; pp. 1-32.

Guerrero-Olazarán, M. *et al.* (2004). Biotecnología de Proteínas Recombinantes para la Aplicación en Acuicultura. *Nutrición Acuícola VII*, pp. 1-23. Disponible en: http://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/VII/archivos/23MarthaGuerrero.pdf.

Horizon (2019). ACTIMMUNE (interferon gamma-1b) injection, for subcutaneous use. ACT-US-PI-001; pp. 1-10.

Huang, Y. M., Hu, W., Rustandi, E., Chang, K., Yusuf-Makagiansar, H., & Ryll, T. (2010). Maximizing productivity of CHO cell-based fedbatch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. *Biotechnology Progress*, 26(5), 1400–1410. doi: 10.1002/btpr.436.

Hunter, M. *et al.* (2018). "Optimization of Protein Expression in Mammalian Cells". *Current Protocols in Protein Science*, pp. 1–28. doi: 10.1002/cpps.77.

Iglesias-Osma, M. C., González Correa, J. A., Moreno, U., & Tejerina, T. (2013). Desarrollo y Regulación de Medicamentos Biotecnológicos. *Actualidad En Farmacología Y Terapéutica*, 11(2), pp. 223–228.

Invitrogen Corporation (2010). pcDNA™3.1(+), pcDNA™3.1(-), Catalog nos. V790-20 and V795-20. 28-0104, pp. 1-23.

Kaufman, R. J. (2000). "Overview of Vector Design for Mammalian Gene Expression". *Molecular Biotechnology*, 16, pp. 151–160. doi: 10.1385/MB.

Kruif, J. *et al.* (2010). "Generation of Stable Cell Clones Expressing Mixtures of Human Antibodies". *Biotechnology and Bioengineering*, 106(5), pp. 741–750. doi: 10.1002/bit.22763.

Lalonde, M.-E. y Durocher, Y. (2017). "Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells". *Journal of Biotechnology*. Elsevier B.V., pp. 1–40. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.04.028.

Leon, E. Z. P. de (2014). Reglamento de Insumos para la Salud. *Diario Oficial*. doi: 10.1127/1869-6155/2010/0128-0006.

Liste-Calleja, L. *et al.* (2015). "Hek293 as a recombinant protein factory: three different approaches for protein production". *BMC Proceedings*. BioMed Central Ltd, 9, pp. 1–2. doi: 10.1186/1753-6561-9-S9-P74.

Liu, C., Dalby, B., Chen, W., Kilzer, J. M., & Chiou, H. C. (2008). Transient transfection factors for high-level recombinant protein production in suspension cultured mammalian cells. *Molecular Biotechnology*, 39(2), 141–153. doi: 10.1007/s12033-008-9051-x.

Loignon, M. *et al.* (2008). "Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFNalpha2b in HEK293 cells". *BMC Biotechnology*, 8(65), pp. 1–16. doi: 10.1186/1472-6750-8-65.

Lonza Cologne (2012). Guideline for Generation of Stable Cell Lines. *BioResearch*, pp 1-8.

Mata-espinoza, D. A. y Hernández-pando, R. (2008). "Interferón gamma: aspectos básicos, importancia clínica y usos terapéuticos". *Revista de Investigación Clínica*, 60(5), pp. 421–431.

Miller, C. H. T., Maher, S. G. y Young, H. A. (2009). "Clinical Use of Interferon- γ ". *HHS*, pp. 69–79. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05069.x.Clinical.

Parham, J. H. *et al.* (1998). "Optimization of transient gene expression in mammalian cells and potential for scale-up using flow electroporation". *Cytotechnology*, 28, pp. 147–55. doi: 10.1023/A:1008046101653.

Razaghi, A., Owens, L., & Heimann, K. (2016). Review of the recombinant human interferon gamma as an immunotherapeutic: Impacts of production platforms and glycosylation. *Journal of Biotechnology*, 240, pp. 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.10.022>.

Román R., R. (2018). "Desarrollo de procesos de producción de proteínas bioterapéuticas: Aumento de la productividad específica en células". Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona, pp., 1-230.

Romero Martínez, N. (2014). "Construcción y evaluación de vectores moleculares que expresen interferón gamma en células humanas como potencial tratamiento inmunoestimulador". Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Sánchez Pacheco, U. A. (2017). "Determinación de la eficacia en células MCF7 de vectores adenovirales que expresen biofármacos con potencial aplicación en terapia génica". Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

SAFC Biosciences™, Inc. (2005). Serum-Free Medium for HEK 293 Cells Frequently Asked Questions. Technical Bulletin, pp. 1-4. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/t059.pdf>.

Sanitarios, A. E. de M. y P. (2018). Imukin 100 microgramos solución inyectable. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), pp. 1-10. https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/60113/FT_60113.pdf.

Sareneva, T. *et al.* (1995). "N-glycosylation of human interferon- γ : glycans at Asn-25 are critical for protease resistance". *The Biochemical journal*, 308, pp. 9–14. doi: 10.1042/bj3080009.

Schiedner, G. *et al.* (2008). "Efficient and reproducible generation of high-expressing, stable human cell lines without need for antibiotic selection". *BMC Biotechnology*, 8(13), pp. 1–11. doi: 10.1186/1472-6750-8-13.

Seitz, S. *et al.* (2011). "Toolbox approach for fast generation of stable CHO production cell lines from different hosts". *BMC Proceedings*. BioMed Central Ltd, 5(Suppl 8), p. P28. doi: 10.1186/1753-6561-5-S8-P28.

Serrano-Rivero, Y., Hernández-García, A. y Fando-Calzada, R. (2013). "Comparación de dos métodos para la preparación de células competentes en *Escherichia coli*". *Revista CENIC de Ciencias Biológicas*, 44(2), pp. 1–5.

Shtrichman, R. y Samuel, C. E. (2001). "The role of gamma interferon in antimicrobial immunity". *Current Opinion in Microbiology*, 4, pp. 251–259. doi: 10.1016/S1369-5274(00)00199-5.

Sigma-Aldrich Co. (2014). Interferon-g, human recombinant, expressed in *E. coli*. DS,PHC 08/14-1. Link: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Datasheet/2/i3265dat.pdf>.

Sigma-Aldrich Co. (2019). Interferon-γ, human recombinant, expressed in HEK 293 cells cell culture tested, endotoxin tested. PCG,SGD,MAM 05/19-1. Link: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Datasheet/11/i17001dat.pdf>.

Sino Biological Inc. (2007-2020). IFG; IFI; IFN gamma; Interferon Gamma in CHO Stable Cells. GMP-11725-HNAS. Link: <https://www.sinobiologicalcdn.com/reagent/GMP-11725-HNAS.pdf>.

Smith, N. L. D., & Denning, D. W. (2014). Clinical implications of interferon gamma genetic and epigenetic variants. *John Wiley & Sons Ltd. Immunology*, 143, pp. 499–511. <http://doi.org/10.1111/imm.12362>.

Sosa García, C. (2018). "Optimización del sistema de expresión HEK293/Ad5-IFN-γ humano mediante el manejo de la densidad celular y la multiplicidad de infección". Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Tavira Montalván, C. A. *et al.* (2009). "Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica". *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40(4), pp. 35–46. Disponible en: www.redalyc.org.

Tavira Montalván, C. A. (2014). "CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS DE CÉLULAS HEK293 ESTÁTICOS, EN SUSPENSIÓN Y EN MEDIO LIBRE DE SUERO PARA

PRODUCCION DE ADENOVIRUS”. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Van Der Valk, J. et al. (2018). “Fetal Bovine Serum (FBS): Past – Present – Future”. *Consensus Report*, 35(1), pp. 99–118. doi: 10.14573/altex.1705101.

Wilson C, Bellen HJ, Gehring WJ (1990). Position effects on eukaryotic gene expression. *Annu Rev Cell Biol*; 6:679–714.

Zaidi, M. R., & Merlino, G. (2011). The Two Faces of Interferon- γ in Cancer. *Clinical Cancer Research*, 17(19), pp. 6118–6125. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0482>.

Zahn-Zabal, M. et al. (2001). “Development of stable cell lines for production or regulated expression using matrix attachment regions”. *Journal of Biotechnology*, ELSEVIER, 87, pp. 29–42.

Zitzmann, J. et al. (2018). “Single-cell cloning enables the selection of more productive *Drosophila melanogaster* S2 cells for recombinant protein expression”. *Biotechnology Reports, Elsevier B.V.*, 19(e00272), pp. 1–11. doi: 10.1016/j.btre.2018.e00272.

XV. ANEXOS

15.1 Preparación de medio LB sólido.

- a) Se pesaron en la balanza digital modelo PW124, 16 g de LB agar (LAB M™, Luria Bertani, LAB168, Formulación: Triptona 10 g/L, Extracto de Levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, Agar 15 g/L, No. de Catálogo: 074692) y se vaciaron en un frasco de vidrio limpio con 400 mL de agua tipo I ultra pura.
- b) Se disolvió completamente la solución hasta eliminar los grumos, se etiquetó el frasco correctamente (Fecha, Nombre) y el medio de cultivo se esterilizó en la autoclave (condiciones: 121°C durante 20 min).
- c) Finalmente, el medio de cultivo al temperarse se almacenó a 4°C hasta su uso.

15.2 Preparación de medio LB líquido.

- a) Se pesaron en la balanza digital modelo PW124, 4 g de Peptona de carne (MCD LAB, No. de Catálogo: 9072, No de Lote: 90723H035), 2 g de Extracto de levadura (BD Bioxon®, No. de Lote: 5361664) y 4 g de NaCl (Fermont, No. de Catálogo: 24903, No. de Lote: 536261).
- b) Posteriormente, se vaciaron en un frasco de vidrio limpio y se adicionaron 400 mL de agua ultra pura tipo I.
- c) Los reactivos se disolvieron completamente hasta eliminar los grumos y se etiquetó el frasco (Fecha, Nombre) para su posterior esterilización (condiciones: 121°C durante 20 min).
- d) Finalmente, el medio de cultivo se almacenó a 4°C hasta su uso.

15.3 Preparación de ampicilina a 100 µg/mL.

- a) En un tubo Eppendorf de 1.5 mL se colocó 100 mg de ampicilina (sólido) y se disolvió en 1 mL de agua tipo I ultra pura, hasta homogeneizar bien la mezcla.
- b) Posteriormente, en la campana de flujo se esterilizó el antibiótico a través de una membrana de 0.22 µm.
- c) Nota: El antibiótico se etiquetó correctamente y se guardó a -20°C hasta su uso.

15.4 Preparación de cajas LB con ampicilina 100 µg/mL.

- a) Bajo condiciones estériles, se etiquetaron cajas Petri (Fecha, medio utilizado, nombre del experimento) para su llenado.
- b) Posteriormente en un tubo estéril de 50 mL, se agregaron 25 mL de medio LB sólido templado y 25 µL del antibiótico estéril (ampicilina 100 µg/mL).

- c) Se homogeneizó bien la mezcla anterior y se colocó la solución directamente sobre la caja Petri estéril. Nota: En caso de que se formaran burbujas, el asa bacteriológica se calentó en el mechero e inmediatamente se pincharon las burbujas de aire.
- d) Una vez llenada la caja Petri, se tapó correctamente y se colocó en una superficie plana para que gelificará el medio LB sólido. Nota: Se prepararon también cajas Petri con medio LB sin antibiótico (para los controles negativos).
- e) Una vez gelificado el medio LB, las cajas se guardaron a 4°C hasta su uso.

15.5 Preparación de CaCl₂

Datos: PM CaCl₂: 111 g/mol, Volumen total: 100 mL, 100 Mm= 0.1 M

$$\text{gramos} = \left(0.1 \frac{\text{mol}}{\text{L}}\right) \left(111 \frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) (0.1 \text{ L}) = 1.11 \text{ g de CaCl}_2 \quad (1)$$

- a) Con base a la ecuación No. 1, se pesaron en la balanza digital modelo PW124 1.11 g de CaCl₂ y se disolvieron en 100 mL de agua tipo I ultra pura, hasta homogeneizar bien la mezcla.
- b) Posteriormente, la solución fue filtrada a través de una membrana de 0.22 µm y se almacenó en tubos de 50 mL estériles a 4°C hasta su uso.

15.6 Cuantificación de ADN plasmídico.

Después de la purificación del ADN es necesario cuantificar su concentración y pureza a través del equipo NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific Acceso Lab., donde se registran las lecturas de concentración en unidades de ng/µL en muestras de ADN de 1-2 µL; siendo indispensable tomar la lectura de la relación ADN/proteínas (260/280) y ADN/sales (260/230) para observar la pureza de las muestras (valores óptimos: ~1.8-2.0 y ~0.3-0.6 para proteínas y sales, respectivamente). Por lo tanto, dependiendo de sí se obtienen valores altos de sales, se podría realizar otra purificación por ejemplo Fenol: Cloroformo, para purificar más el ADN plasmídico. La cuantificación en el equipo NanoDrop 2000 se llevó a cabo de la siguiente manera:

- a) El equipo se lavó previamente con 2 µL de agua destilada, bajando el pedestal para colocar posteriormente el blanco.
- b) El blanco a utilizar fue el Buffer TE, Buffer de elución o agua libre de RNAsa según sea el caso, registrándose su valor.
- c) Posteriormente, se limpió y secó el pedestal y el porta muestras para colocar 1 µL de ADN plasmídico, registrándose su concentración.
- d) Finalmente, se lavó el equipo con agua destilada estéril y se secó cuidadosamente.

15.7 Extracción de ADN plasmídico con Fenol: Cloroformo.

- a) A cada muestra de ADN que se desea purificar, se le agregaron 80 μL de Buffer TE o llevar a 100 μL de volumen final y 100 μL de una Solución de Fenol: Cloroformo: Ácido isoamílico (25:24:1).
- b) Los tubos se vortexearon gentilmente y se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min a 4°C para obtener la separación de las fases.
- c) Se transfirió cuidadosamente la parte superior acuosa a otro tubo Eppendorf estéril, descartando la fase media e inferior.
- d) Posteriormente, al sobrenadante recuperado (del inciso c) se le adicionaron 400 μL de etanol al 95%, 25 μL de NH_4OAc 10 M y 1 μL de Glicógeno (20 mg/mL).
- e) Se vortexearon nuevamente los tubos y se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min a 4°C.
- f) El sobrenadante obtenido se retiró con cuidado para obtener solamente el pellet de ADN y se le adicionaron 300 μL de etanol al 70%.
- g) El contenido del tubo del inciso f) se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min a 4°C y se eliminó el etanol con cuidado.
- h) El pellet de ADN finalmente se dejó secar aproximadamente 15 min a temperatura ambiente y se disolvió en 50 μL de Buffer TE (Tris-HCl 10 Mm, EDTA 1 Mm, pH 8.0).
- i) Nota: Se cuantificó la concentración de ADN de las muestras en el equipo NanoDrop 2000 y se guardaron a -20°C hasta su uso.

15.8 Preparación de geles de agarosa.

- a) En un matraz Erlenmeyer se disolvieron 0.25 g de agarosa (Promega No. de Cat.: V3121) en 24.5 mL de agua destilada estéril a una temperatura de 70° a 80°C.
- b) Una vez disuelta la agarosa completamente, la temperatura de la mezcla se disminuyó y se le agregaron 0.5 mL de TAE 50x (Compuesto de: 242 g/L Tris base, 57.1 mL/L HCH_2COOH glacial, 100 mL/L EDTA 0.5 M pH 8.0) y 1 μL de Bromuro de etidio (10 mg/mL).
- c) Posteriormente, se preparó el soporte de electroforesis con el peine y se vertió la mezcla con cuidado para evitar la generación de burbujas.
- d) Se dejó gelificar la solución de agarosa y el gel se colocó adecuadamente en posición horizontal para verter 300 mL de Buffer TAE 1x (294 mL de agua destilada estéril + 6 mL TAE 50x).

- e) Se cargaron en el gel de agarosa los productos requeridos con 2 μ L del Buffer de carga Orange 6x (Thermo Scientific No. de Catálogo: #R0631, No. de Lote: 00113802).
- f) Se usó como marcador de peso molecular el O'Gene Ruler™ 1 kb ADN Ladder (No. de Catálogo: #SM1163, No. de Lote: 0079556), colocando en el pozo 2 μ L de MPM y 8 μ L de H₂O estéril.
- g) Finalmente, se corrieron las muestras en la cámara de electroforesis (AccesoLab No. de Catálogo: 0030401) y se reveló el gel en el equipo ChemiDoc XRS BIO-RAD.

15.9 Purificación del gen IFN- γ a partir de geles de agarosa.

Se purificó el fragmento amplificado del gen IFN- γ a partir del gel de agarosa, con la finalidad de eliminar los posibles remanentes de la reacción de PCR. Por lo tanto, se llevó a cabo el siguiente protocolo de acuerdo al manual del kit comercial Zymoclean™ Gel DNA Recovery (No. de Catálogo: #D4001, No. de Lote: ZRC170827).

- a) Una vez revelado el gel con la luz UV se cortaron los fragmentos de agarosa que contenían el segmento en ~520 pb con ayuda de un scraper estéril.
- b) Los fragmentos fueron colocados en tubos Eppendorf estériles y se agregaron 1000 μ L de Solución ADB™.
- c) Posteriormente, los tubos Eppendorf se incubaron a 55°C durante 10 min en el equipo ThermoBlock a 400 rpm.
- d) Acabado el tiempo de incubación, se disolvió bien la mezcla para transferirla a una columna Zymo-Spin™.
- e) Posteriormente, la columna fue centrifugada durante 30-60 s a 16000 x g a temperatura ambiente.
- f) El sobrenadante del fondo del tubo colector fue desechado y a la columna se le agregaron 200 μ L de Buffer de lavado para su centrifugación a 16000 x g durante 30 s (Nota: El lavado se realizó dos veces).
- g) Finalmente, se colocó la columna dentro de un tubo Eppendorf nuevo y se añadieron 15 μ L de Buffer de elución directamente a la matrix de la columna. Posteriormente, se incubó durante 1 min y se centrifugó a 16000 x g durante 30-60 s para eluir el ADN.

15.10 Mantenimiento de la línea celular.

15.10.1 Descongelamiento de células HEK293.

Para poder mantener la línea celular HEK293 en crecimiento y poder realizar los experimentos necesarios, se descongelaron viales de células almacenadas a -196°C . El protocolo de descongelamiento llevado a cabo fue el siguiente para frascos T 25 cm^2 .

Nota: El protocolo se llevó a cabo bajo condiciones estériles en campana de flujo laminar.

- a) En un tubo de 15 mL estéril se agregaron 9 mL de medio de cultivo DMEM/F-12 frío sin suero.
- b) Se descongeló el vial de células HEK293 y se agregó con cuidado el contenido al tubo anterior.
- c) Se resuspendieron cuidadosamente las células en el medio DMEM/F-12 frío para disminuir la cantidad de DMSO.
- d) Posteriormente, se centrifugó el tubo a 900 rpm durante 5 min para eliminar el sobrenadante y así obtener el pellet celular.
- e) Al pellet celular obtenido se le agregaron 4.5 mL de medio DMEM/F-12 al 10% con SFB y se homogeneizó bien la solución.
- f) El contenido resultante se vació a frascos T 25 cm^2 y se le agregó 0.5 mL de SFB, para una concentración final al 20%.
- g) Finalmente, los frascos se mantuvieron en condiciones de crecimiento y se observó a las 24 h si los cultivos presentaban adherencia y crecimiento celular. Sí fuera el caso, se cambió el medio por medio fresco al 10 % de SFB.

15.10.2 Congelación de células HEK293 en DMSO.

Fue necesario preservar las células HEK293 para posteriores usos utilizando un criopreservante como el dimetilsulfóxido al 10% (DMSO). Por lo tanto, se realizó la siguiente metodología:

- a) Bajo condiciones estériles se realizó el subcultivo normal de células HEK293 hasta la obtención del pellet celular.
- b) Posteriormente, se resuspendió el pellet celular en 3 mL de medio fresco DMEM/F-12 y se colocó la cantidad necesaria de SFB para una concentración final al 20%.
- c) Bajo condiciones estériles se etiquetaron los criovales (Cryo TubeTM No. de Cat.: 379146) como se indica a continuación: Nombre de la línea celular, # pase, medio utilizado y fecha de congelación.

- d) El llenado de criovales se realizó en condiciones frías y rápidamente, agregando 1 mL de la suspensión celular (obtenida del inciso b) + 110 μ L de DMSO (Sigma No. Lote: 106K2310).
- e) Finalmente, los criovales se almacenaron a -80°C y posteriormente a Nitrógeno líquido para su mantenimiento.

15.11 Preparación de reactivos para Western Blot.

- **Electroforesis:** Se utilizó un Buffer TGS 10x concentrado (Sigma-Aldrich, No. de Cat.: T7777) donde se preparó 1 L de TGS a 1x: 100 mL de TGS 10x en 900 mL de agua ultra pura tipo I. Posteriormente, se almacenó el Buffer a 4°C .
- **Transferencia:** Buffer compuesto principalmente de Tris, Glicina y Metanol. Preparación para 1 L: Tris Base 48 mM 5.81 g, Glicina 39 mM 2.92 g, Metanol 200 mL, SDS 0.375 g. Para la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se utilizó un 1 $\frac{1}{2}$ L de Buffer y se almacenó a 4°C .
- **Buffer de lavado:** Se preparó 1 L de una solución salina con Tris, Tween 20 al 0.1%. El Buffer TBST 1x se preparó a partir de un Buffer concentrado TBST 10x: 100 mL de TBST 10x en 900 mL de agua ultra pura tipo I.
- **Rojo de Ponceau al 0.1 %** para 30 mL: Se disolvieron 0.033 g de Ponceau S en 10 mL de ácido acético al 3% y 20 mL de agua ultra pura tipo I.
- **Solución de acrilamida** (30% Acrilamida 99.9% No. de Cat. #161-0100 + 0.8% bis-Acrilamida No. de Cat.: #161-0200). Se disolvieron 14.6 g de acrilamida y 0.4 g de bis-acrilamida en un volumen final de 50 mL de agua ultra pura tipo I. Nota: Fue importante la manipulación de esta solución con guantes y cubre bocas ya que la acrilamida es neurotóxica. Así mismo, se almacenó a 4°C hasta su uso.
- **Solución Tris-HCl 1.5 M pH 8.8:** Se disolvieron 18.17 g de Tris base en 50 mL de agua tipo I. Posteriormente, se ajustó el pH a 8.8 con HCl 6N y se aforó a 100 mL. Nota: Se almacenó a 4°C hasta su uso.
- **Solución Tris-HCl 0.5 M pH 6.8:** Se disolvieron 6.06 g de Tris base en 50 mL de agua tipo I. Posteriormente, se ajustó el pH a 6.8 con HCl 6N y se aforó a 100 mL. Nota: Se almacenó a 4°C hasta su uso.
- **10% Persulfato de Amonio** (BIO-RAD No. de Cat.: #161-0700, 10 g). Se disolvieron 0.1 g de Persulfato de Amonio en 1 mL de agua tipo I y se envolvió en papel aluminio.
- **10% SDS:** Se disolvió 1 g de SDS en 10 mL de agua tipo I.

- **TEMED** (BIO-RAD tetrametiletilendiamina, No. de Cat.: #161-0800). Catalizador para la polimerización de acrilamida y bis-acrilamida.

15.11.1 Preparación de geles de acrilamida (gel separador al 12.5% y gel concentrador al 4%).

Gel separador al 12.5%	Gel concentrador al 4%
Solución Tris-HCl 1.5 M pH 8.8: 5 mL	Solución Tris-HCl 0.5 M pH 6.8: 2.5 mL
Agua destilada: 6.8 mL	3.4 mL
Acrilamida: 8 mL	4 mL
10% SDS: 200 µL	100 µL
TEMED: 10 µL	10 µL
10% Persulfato de amonio: 100 µL	50 µL

- Nota: Las cantidades anteriores se ocuparon para preparar 2 geles de acrilamida; además, fue indispensable colocar los catalizadores al final de la mezcla para evitar una polimerización temprana.

15.12 Evolución de los cultivos HEK293 durante la cinética de crecimiento.

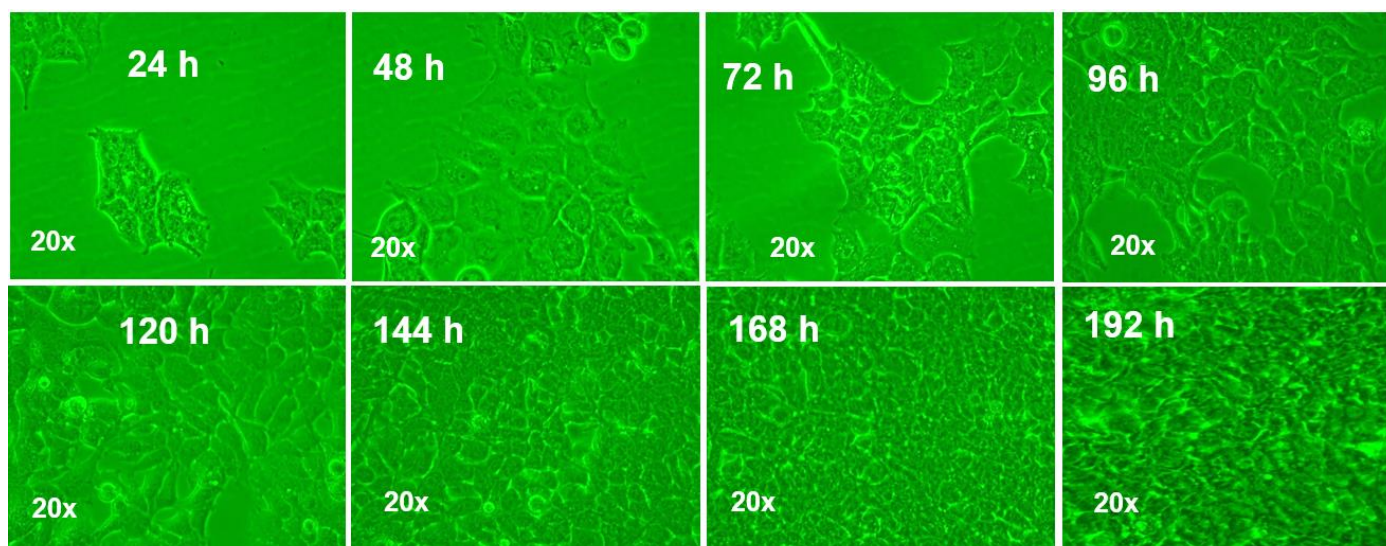


Figura No. 44: Evolución de los cultivos HEK293 en la cinética de crecimiento. Se observa como al transcurrir el tiempo las células crecen considerablemente, ocupando toda la superficie del sustrato. Imágenes vistas al microscopio a 20x, campo claro.

15.13 Curva de calibración del estándar de Interferón gamma.

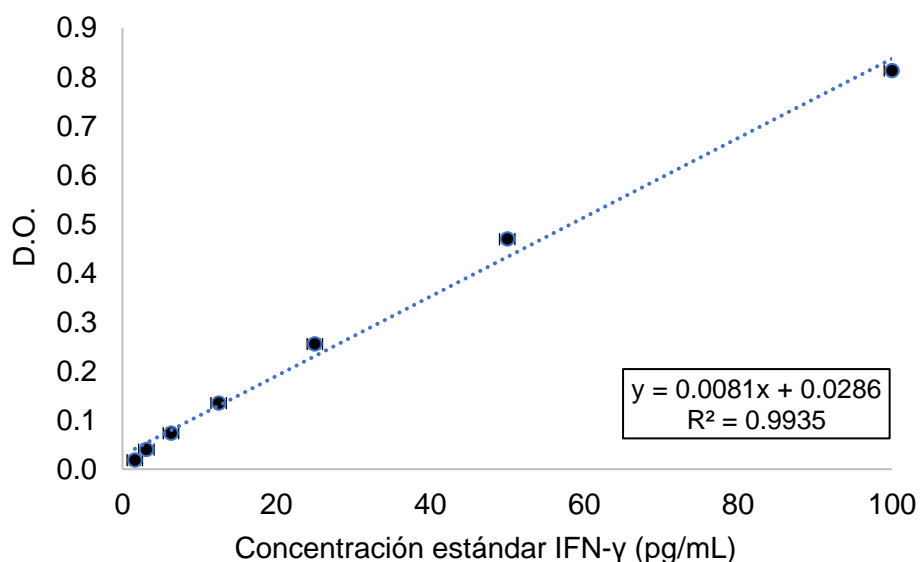


Figura No. 45: Curva de calibración del estándar de IFN-γ. Se determinó la ecuación de la línea recta $y = 0.0081x + 0.0286$; así mismo, dado que las D.O. obtenidas en las muestras problema superaban 0.9 se decidió diluir los SN en los futuros test de ELISA a desarrollar.

15.14 Variabilidad de la concentración de IFN-γ en SN de clonas HEK293 aisladas.

Tabla No. 16: Concentración de Interferón gamma en diferentes clonas aisladas HEK293.

Pools clonales iniciales	Denominación de clonas productoras	IFN-γ (pg/mL)
CLONA 1	1.1	262.3
	1.2	465
	1.3	55
	1.4	106
CLONA 2	2.1	337
	2.2	468
	2.3	436
	2.4	412.5
	2.5	428.5
	2.6	430
	2.7	439.5
CLONA 3	2.8	459
	2.9	419
	3.1	437
	3.2	287.5
CLONA 4	3.3	94
	3.4	13
	4.1	402
	4.2	273
	4.3	392
	4.4	396
	4.5	190
	4.6	206

	4.7	211
	4.8	207

15.15 SDS-PAGE de SN de clonas HEK293 productoras para IFN- γ .

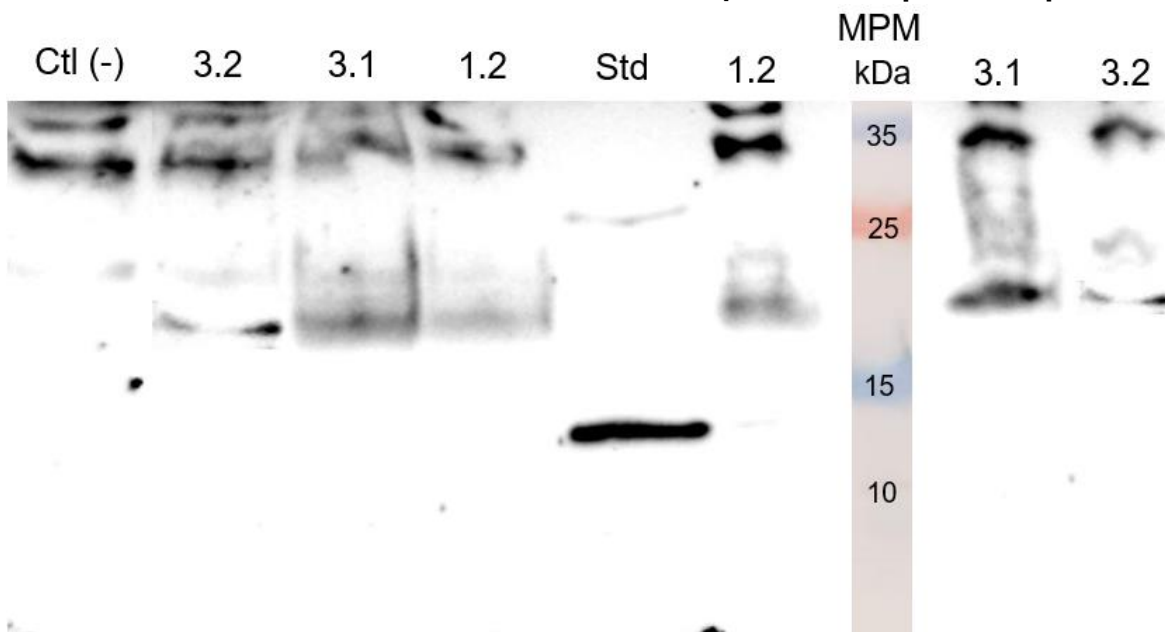
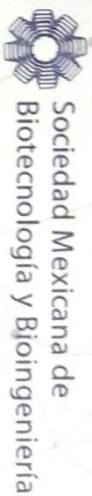


Figura No. 46: Membrana revelada SDS-PAGE de SN de clonas HEK293 productoras. Carril No. 1: SN ctl negativo (sin transfectar); carril No. 2: SN de la clona #3.2; carril No. 3: SN de la clona #3.1; carril No. 4: SN de la clona #1.2; carril No. 5: Std de IFN- γ (*E. coli*); carriles No. 6, 8 y 9: duplicados SN de clonas #1.2, 3.1 y 3.2; carril No. 7: MPM (kDa). Los SN se analizaron a las 168 h de cultivo mediante SDS-PAGE observando bandas ~20 kDa en las clonas 3.2, 3.1 y 1.2; lo cual de acuerdo a la literatura Mata-Espinosa & Hernández-Pando, 2008, corresponde al IFN- γ glicosilado tipo II.

CONSTANCIAS DE PARTICIPACIÓN



León, Guanajuato
23 al 28 de junio

2019

Otorga la presente

CONSTANCIA

A:

**Yoanna García López, Carlos Alberto Tavira Montalván, Mirna Rodríguez Aguilar,
Uriel Abdallah Sánchez Pacheco, Abril Martínez Rizo, Angélica Meneses Acosta**

Por su participación con la contribución en cartel:

**EVALUACIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN MOLECULAR PCDNA3+/IFN- γ EN CÉLULAS HEK293,
COMO SISTEMA DE EXPRESIÓN ESTABLE PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOFÁRMACOS.**

En el XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería,
23 al 28 de junio de 2019 en León, Guanajuato, México.

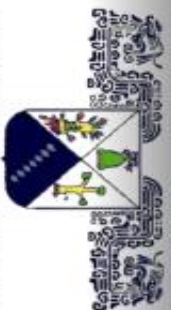
Dr. Adelfo Escalante Lozada
Presidente de la SMBB



leon-mexico.com

Dr. Jaime Ortega López
Presidente del Comité Organizador

Dra. Sylvie LeBorgne
Presidenta del Comité Científico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

A través de la Facultad de Farmacia

Otorga la presente:

CONSTANCIA

a:

Yamara García López, Carlos Alberto Tavira Montalván, Mirna Rodríguez Aguilar, Thiel Abdallah Sánchez Pacheco, Abnil Martínez Rizo y Angélica Meneses Acosta

Por su participación en la presentación del cartel titulado "GENERATION OF STABLE HEK293 CELL LINES THAT PRODUCE INTERFERON-GAMMA" en el 13° Encuentro de Estudiantes de Posgrado en Farmacia.

Cuernavaca, Morelos a 21 de noviembre del 2019.



Dr. Efrén Hernández Balazar
Director de la Facultad de Farmacia

