

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos y Soluciones

Excepto en los casos donde se aclara expresamente, todas las soluciones fueron preparadas con agua ultra pura obtenida por ósmosis inversa (resistividad 18,2 MΩ.cm) y filtración (0,2 μm), empleando un equipo Milli Q^{UF} (Millipore, Francia).

Todos los reactivos utilizados fueron de grado de pureza analítica.

2. Medios de cultivo

El **medio A** (Kratje y Wagner, 1992) consistió en una mezcla 1:1 (V/V) de los medios D-MEM (Medio Dubelcco Modificado por Eagle) (Gibco, EE.UU.) y Ham's-F12 (Gibco), suplementados con 2,441 g/l NaHCO₃, 1,183 g/l D(+) glucosa anhidra (Sigma, EE.UU.), 0,110 g/l piruvato de sodio (Gibco), 1,100 g/l glutamina (Sigma), 0,027 g/l triptofano (Sigma), 0,040 g/l ácido aspártico (Sigma), 0,080 g/l serina (Sigma) y 50 μg/ml gentamicina (Gibco).

El medio A suplementado con diferentes concentraciones de SFB (Bioser, Argentina) y distintos antibióticos se emplearon en diversas experiencias, detallándose en cada caso su composición.

El **medio SMIF-6**, libre de SFB, fue gentilmente cedido por el Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (Braunschweig, Alemania), y se utilizó en la optimización de las condiciones de cultivo para obtener altas producciones de proteína recombinante.

El **medio IMDM** (Medio de Iscove modificado por Dulbecco), libre de hipoxantina/timidina, se utilizó para la selección y coamplificación del gen dhfr. Consiste en 17,700 g/l IMDM (Gibco) y 3,024 g/l NaHCO₃, suplementado con 10% V/V SFB dializado contra una solución salina de fosfatos (PBS) (0,600 g/l KH₂PO₄, 0,780 g/l NaH₂PO₄ y 8,800 g/l NaCl, pH 7,4) para eliminar nutrientes de bajo peso molecular (PM) tales como nucleósidos y aminoácidos que puedan impedir la selección, y diferentes concentraciones de MTX (Sigma) (Kaufman, 1991) que se detallan en cada experiencia.

El **medio D-MEM** se utilizó para el crecimiento y mantenimiento de las células NS0. Está constituido por 13,370 g/l D-MEM suplementado con 3,700 g/l NaHCO₃, 1 mM piruvato de sodio, 50 μg/ml gentamicina, 60 μg/ml tylosina (Sigma) y 10% V/V SFB.

Los medios suplementados con 20% V/V SFB, se utilizaron para realizar el clonado por el método de dilución límite. El alto contenido de SFB es necesario debido a que los requerimientos nutricionales de las células aisladas deben ser cubiertos por el

medio de cultivo, ya que no hay producción de suficientes factores de crecimiento como en cultivos más densos.

El **medio MEM** (Medio Esencial Mínimo) (Gibco) se utilizó para el cultivo de la línea celular WISH, y fue suplementado con 2 mM glutamina, 2,200 g/ml NaHCO₃, 50 µg/ml gentamicina y 10% V/V SFB.

Las concentraciones del SFB empleadas en el desarrollo de los ensayos de valoración biológica *in vitro* se indican en cada experiencia.

La esterilización de los medios de cultivo se realizó por filtración a través de filtros estériles de Millipore, cuyo tamaño de poro fue de 0,2 µm. Para controlar la esterilidad, los medios filtrados fueron incubados durante 48 h a 37 °C.

La descomplementación del SFB empleado para suplementar los medios, se efectuó durante 30 min en un baño de agua termostatzado a 56 °C.

El **medio LB** (Luria-Bertani), compuesto de 10 g/l triptosa (Oxoid, Inglaterra), 5 g/l extracto de levadura (Oxoid) y 10 g/l NaCl; y el LB-agar, medio LB con 2% P/V agar, se utilizaron para el crecimiento bacteriano. Se esterizaron en autoclave durante 15 min a 1 atmósfera a 120 °C.

Para seleccionar clones bacterianos, se suplementó el medio con 10 µg/ml tetraciclina, a partir de una solución 0,5% P/V tetraciclina en etanol, o 100 µg/ml ampicilina, a partir de una solución 10% P/V ampicilina.

3. Líneas celulares y cepas bacterianas

CHO.K1 (Puck y col., 1958): Obtenida de *American Type Culture Collection* (ATCC CCL 61).

CHO dhfr (Urlaub y Chasin 1980, Kaufman y Sharp 1982): Obtenida de la colección de cultivos del Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (Braunschweig, Alemania).

BHK.21 (MacPherson y Stoker, 1962; Capstick y col., 1962; Stoker y MacPherson, 1964): Obtenida de *American Type Culture Collection* (ATCC CCL 10).

COS.7 (Gluzman, 1981): Cedida gentilmente por el Dr. Manfred Wirth, Department of Regulation and Differentiation, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (Braunschweig, Alemania).

HEK-293 (Graham y col., 1977, Walls y col., 1989): Obtenida de la colección de cultivos del Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (Braunschweig, Alemania).

WISH (Hayflick, 1961; Meager, 2002): Cedida gentilmente por el Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maizteghi".

NS0 (Galfrè y Milstein, 1981; Rossman y col., 1996; Barnes y col., 2001; Barnes y col., 2003).

Escherichia coli DH5 α F'Iq (Max Efficiency DH5 α Competent Cells, Gibco-Life Technology).

4. Sistemas de cultivo de células

Todas las líneas celulares empleadas en este trabajo de tesis se cultivaron en estufa gaseada a 37 °C, en atmósfera de CO₂ al 5% saturada de humedad (Nuair, EE.UU.).

Las líneas celulares que se adhieren a una superficie sólida forman una monocapa. Para realizar subcultivos se las debe liberar de este sustrato por medios mecánicos o enzimáticos. Cuando las células cubren el 100% de la superficie de los frascos donde están creciendo, se les retira el sobrenadante del cultivo y se lava la monocapa con una solución de tripsina : EDTA [0,05% P/V tripsina (Gibco), 0,02% P/V EDTA en PBS], durante 15 seg a temperatura ambiente, con el fin de neutralizar la acción de la antitripsina presente en el suero. Después de eliminar la solución de lavado se agrega nuevamente solución de tripsina : EDTA, dejándola actuar por unos minutos, hasta lograr el desprendimiento de las células adheridas. Luego se adiciona el medio de cultivo, neutralizando la acción de la tripsina, y se homogeniza la suspensión celular. Para las células que crecen en suspensión, los repiques se efectuaron por simple dilución de alícuotas de las suspensiones celulares en el medio de cultivo fresco correspondiente.

En todos los casos se mantuvo una relación constante de 0,4 ml de medio de cultivo por cada cm² de superficie, de acuerdo con lo establecido por Freshney (1994a).

Los cultivos celulares se realizaron en placas multipozos de poliestireno (Nunclon, EE.UU.) de 96, 24 y 6 pozos con una superficie de 0,4; 2,0 y 9,6 cm² por pozo, respectivamente. También se emplearon frascos T (Nunclon) de 25, 75 y 150 cm² de superficie.

5. Criopreservación de líneas celulares

La conservación en nitrógeno líquido es el método usualmente empleado para preservar líneas celulares (Freshney, 1994b). La suspensión celular debe ser enfriada lentamente en presencia de un agente preservativo como el glicerol o el dimetil sulfóxido (DMSO) (Lovelock y Bishop, 1959). Las células congeladas son transferidas rápidamente a N₂ líquido. Conservando las células a -196 °C se encontraron deterioros mínimos (Green y col., 1967).

Durante todo el trabajo de tesis, las células se conservaron en N₂ líquido, para lo que se utilizó una técnica de enfriamiento escalonado desde temperatura ambiente hasta -196 °C.

Para ello, previo recuento, los cultivos celulares en fase de crecimiento exponencial se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, en una centrífuga *Eppendorf* 5403 (rotor 16A4-44) (Alemania). Luego se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular se resuspendió en una solución de SFB y DMSO (Sigma)

en una relación 95 : 5, de manera de obtener una concentración de $1-2 \cdot 10^6$ cél/ml, distribuyéndola a razón de 1 ml por criotubo (Nalgene, EE.UU.).

Finalmente la suspensión celular fue enfriada gradualmente:

- a 4 °C durante 1 h
- a -20 °C durante 1 h
- en atmósfera de N₂ durante 30 min

Por último los criotubos fueron conservados a -196 °C en N₂ líquido.

6. Criopreservación de cepas bacterianas

Para la conservación de las bacterias se procedió a cultivarlas en medio LB, diluyéndolas posteriormente en una solución al 20% V/V de glicerol estéril, homogeneizando para asegurar la distribución del glicerol. Finalmente, fueron conservadas a -70 °C (Sambrook y col., 1989b).

7. Descongelamiento de líneas celulares

Para comenzar un cultivo se descongeló un criotubo que contuviese la línea celular deseada.

Se preparó un tubo estéril con 40 ml del medio de cultivo correspondiente a temperatura ambiente. Se retiró el criotubo del termo de nitrógeno y se colocó en un baño de agua a 37 °C hasta que se descongeló. Inmediatamente, se volcó el contenido del criotubo en el tubo con el medio de cultivo y se centrifugó durante 5 min a 1.000 rpm a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el *pellet* de células en un volumen de medio de cultivo apropiado. Finalmente, se realizó el recuento celular con el objeto de evaluar la recuperación y la viabilidad celular.

8. Descongelamiento de cepas bacterianas

Para recuperar las bacterias congeladas, con un ansa estéril se raspó la superficie del cultivo congelado e inmediatamente se realizó una estría en una placa LB-Agar, que contuviese el antibiótico apropiado, incubando la placa a 37 °C. Posteriormente, se tomó una colonia bacteriana, amplificando el cultivo en medio LB con antibiótico según los requerimientos de la experiencia a realizar.

9. Determinaciones analíticas de los cultivos

9.1. Células totales y viables

La concentración de células viables se determinó empleando el método de exclusión con azul de tripán.

El test de exclusión de colorante está basado en el hecho de que las células viables no captan ciertos colorantes, mientras que las células muertas son permeables a ellos. El azul de tripán es el colorante más utilizado para realizar recuentos celulares (Griffiths, 1986).

Con ese fin, se resuspendieron las células en un volumen conocido de medio de cultivo. Se homogeneizó la suspensión celular y se tomó una alícuota que se diluyó en azul de tripán al 0,4% P/V en PBS, dejando unos segundos a temperatura ambiente. Luego se sembró en una cámara de Neubauer empleando las diluciones convenientes de acuerdo con la densidad celular de la muestra.

Se contaron las células vivas (refringentes) y las muertas (azules), contenidas en cada uno de los cuadros de los extremos.

Se calculó la cantidad N de cél/ml, según la ecuación 1, donde x es el número de células contadas.

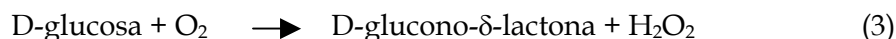
$$N \text{ cél/ml} = x \times 10^4 \times \frac{1}{4} \times (\text{dilución})^{-1} \quad (1)$$

La viabilidad del cultivo (V) se determinó calculando el porcentaje de células viables con respecto a las totales (ecuación 2), teniendo en cuenta que la concentración de células totales (x_T) es la suma de la concentración de células muertas y vivas (x_v).

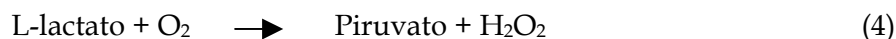
$$V = \frac{x_v}{x_T} \times 100 \quad (2)$$

9.2. Análisis de glucosa y lactato

La concentración de glucosa y lactato presente en los sobrenadantes de cultivo fue determinada diariamente empleando una analizador de glucosa/lactato (Yellow Spring Instrument, modelo YSI 2700, EE.UU.). La medición se basa en un sistema de lectura dual constituido por los biosensores con las enzimas específicas inmovilizadas en membranas para el sustrato a medir. Para la medición de D-glucosa, la enzima inmovilizada es la glucosa oxidasa, la cual cataliza la oxidación de la D-glucosa, generando D-glucono- δ -lactona y peróxido de hidrógeno (ecuación 3).



Por otro lado el L-lactato es oxidado en presencia de la lactato oxidasa a piruvato, produciendo peróxido de hidrógeno (ecuación 4).



Finalmente, el peróxido de hidrógeno es oxidado en el ánodo de platino, produciendo electrones (ecuación 5).



El flujo de electrones es proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno, y por lo tanto, a la concentración de sustrato, glucosa o lactato, respectivamente.

9.3. Análisis de amonio

La concentración de amonio presente en los sobrenadantes de cultivo celular se determinó empleando una adaptación de la técnica desarrollada por Berthelot (1859) y modificada por Fawcett y Scott (1960), teniendo en cuenta las posibles interferencias descritas por Ngo y col. (1982). El mecanismo de la reacción de Berthelot consiste en dos pasos. En el primer paso, el hipoclorito se agrega a la muestra que contiene amonio, lo que resulta en la formación de mono-cloramina. El segundo paso consiste en la adición de fenol a la muestra. El fenol reacciona con la mono-cloramina para formar azul de indofenol, cuyo pico de absorción está a una DO 600 nm. Por lo tanto, la intensidad del color azul es proporcional a la concentración de amonio presente en la muestra analizada.

Como reactivos de trabajo se emplearon, una solución de fenol nitroprusiato (Sigma) y una solución alcalina de hipoclorito (Sigma). Para cada determinación se efectuó una curva de calibración a partir de una solución madre de NH_4Cl 100 mM, diluyéndola de forma tal que las concentraciones correspondientes a cada uno de los puntos de la curva fueran las siguientes: 5 - 3 - 2,5 - 1,5 - 1 - 0,5 mM.

En una placa de 96 pozos se agregaron, para cada muestra o testigo, por duplicado, un volumen de 5 μl por cavidad. Posteriormente, se adicionaron 125 μl de cada uno de los reactivos de trabajo, se incubó la placa a 37 °C durante 30 min y finalmente se efectuó la lectura de la absorbancia a una DO 570 nm en un lector de placas de microtitulación (Labsystems Multiskan, modelo MCC/340, Finlandia). Los valores de concentración de amonio para cada muestra se obtuvieron interpolando el valor de la absorbancia medida en la curva de calibración realizada para cada determinación.

10. Métodos de *screening*, cuantificación y valoración de rhIFN- β 1

Antes de realizar cualquier manipulación genética sobre las células de mamíferos para que expresen rhIFN- β 1a, fue necesario establecer métodos simples, rápidos y confiables para la determinación de la citoquina.

Para tal fin se obtuvo inicialmente rhIFN- β 1b puro para ser utilizado en la producción de anticuerpos (Ab) policlonales y monoclonales (MAb), que posteriormente fueron usados en el desarrollo de métodos inmunoquímicos.

10.1. Preparación de rhIFN- β 1b puro

Se preparó rhIFN- β 1b puro a partir de una muestra comercial (Betaferon, Schering-Plough, Alemania). Para ello, se realizó una cromatografía en columna de Sephacryl S-200 (Pharmacia, Suecia) de 23 ml de volumen de lecho, con un equipo

FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) (FPLC System, GE Healthcare, EE.UU.). La purificación consistió en los siguientes pasos:

1. Equilibrado de la columna: con solución de 0,1% V/V SDS en PBS hasta medir en el eluato una conductividad igual a la de la solución de equilibrado y elución.
2. Acondicionamiento de la muestra: se filtró la muestra a través de filtros de 0,2 μm , y se diluyó en solución de equilibrado, obteniendo una solución proteica con una concentración de 0,75 mg/ml.
3. Siembra: 1 ml de la muestra se sembró a un flujo de 0,25 ml/min.
4. Elución: se realizó con la solución de equilibrado, a un flujo de 0,25 ml/min, recogiendo alícuotas de 1 ml, hasta demostrar la ausencia de proteínas en el eluido por medida de la absorbancia a DO 280 nm en espectrofotómetro UV-visible (Ultrospec 2000, GE Health Care, EE.UU.).

Se mezclaron las fracciones correspondientes al pico de elución de rhIFN- β 1b monitoreado a DO 280 nm y el producto obtenido se concentró 8 veces utilizando filtros Amicon® Ultra (Millipore).

Se determinó la pureza del eluido por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras (según sección 10.7.3). La concentración de rhIFN- β 1b se estimó a partir de la lectura de la absorbancia medida a DO 280 nm, teniendo en cuenta un coeficiente de extinción de 0,95 ml/cm.mg.

10.2. Producción de anticuerpos monoclonales anti-IFN- β 1

10.2.1. Obtención de hibridomas

Los hibridomas se obtuvieron empleando un protocolo de fusión estándar (Galfrè y Milstein, 1981) a partir de linfocitos provenientes del bazo de ratones hembras BALB/c, previamente inmunizados con rhIFN- β 1b, y células NS0. Para la inmunización se emplearon 2 ratones, inyectándoles dosis de 25 μg de antígeno disuelto en 0,2 ml de PBS y emulsionado con 0,2 ml de adyuvante de Freund completo (AFC) (Gibco). A los 7 días de la segunda dosis, se realizó una sangría exploratoria determinando el título del anti-suero obtenido por un ELISA (enzimoinmunoensayo) específico indirecto (según sección 10.2.4). Finalmente, 3 días antes de la hibridización, se realizó un *booster* con 30 μg de antígeno disuelto en 0,2 ml de PBS.

Después de la fusión, se seleccionó 1 línea celular productora de MAb específicos. Ésta fue clonada por el método de dilución límite (según sección 13.2).

La producción de MAb anti-IFN- β 1 de los clones se detectó mediante un ELISA específico indirecto (según sección 10.2.4). Los clones de mayor productividad fueron amplificados, determinándose la variedad isotópica de las cadenas pesadas de las

inmunoglobulinas (Igs) murinas producidas mediante la técnica de ELISA específico indirecto (según sección 10.2.2).

10.2.2. Determinación de las variedades isotópicas de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas murinas

Para la determinación de las variedades isotópicas de las cadenas pesadas de las Igs murinas presentes en los sobrenadantes de cultivo de hibridomas se efectuó un ensayo inmunoenzimático.

La técnica de ELISA consistió en:

- 1- Sensibilización: placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Greiner Bio-One, Alemania) fueron sensibilizadas con 100 μ l/pozo de rhIFN- β 1b (Betaferon) 0,5 μ g/ml (50 ng/pozo) diluido en solución de Na₂CO₃/NaHCO₃ 50 mM, pH 9,6 (solución de sensibilización). Se incubó durante 1 h a 37 °C y toda la noche a 4 °C.
- 2- Bloqueo: el bloqueo de los sitios de interacción inespecífica se realizó con 200 μ l/pozo de solución 1% P/V de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma) en PBS (solución de bloqueo). Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 3- Primera incubación: se agregaron 100 μ l/pozo de sobrenadante de cultivo de hibridomas sin diluir empleando 6 pozos por placa para cada muestra (un pozo para cada isotipo murino de cadena pesada). Se incubó durante 2 h a 37 °C.
- 4- Segunda incubación: cada muestra se incubó con 100 μ l/pozo de Ab de cabra anti-isotipos murinos (Sigma) diluidos en 0,1% P/V BSA y 0,05% V/V Tween 20 (USB Corporation, EE.UU.) en PBS (solución diluyente). Se ensayó un pozo de muestra por cada anti-isotipo: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA e IgM. La incubación se efectuó durante 30 min a temperatura ambiente.
- 5- Tercera incubación: se adicionaron 100 μ l/pozo de Ab de conejo anti-Ig de cabra conjugados con la enzima peroxidasa (DAKO, Dinamarca) diluidos en solución diluyente. La incubación se efectuó durante 1 h a 37 °C.
- 6- Reacción reveladora: comprende la reacción enzimática empleando como sustrato H₂O₂ 0,12 vol diluida en solución 50 mM citrato/fosfato, pH 5,3 (solución de revelado) con el agregado de *o*-fenilendiamina (OPD) (Sigma) en una concentración de 3 mg/ml. La incubación se realizó en oscuridad a temperatura ambiente y la lectura del color generado se efectuó a una DO 450 nm en un lector de placas de microtitulación.

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron seis lavados con solución 0,05% V/V Tween 20 en PBS (solución de lavado).

10.2.3. Producción *in vivo* de anticuerpos monoclonales anti-IFN- β 1

La producción *in vivo* de MAbs se llevó a cabo mediante la inoculación intra peritoneal del hibridoma 2C12 en ratones BALB/c previamente tratados con ácido 2,6,10,14-tetrametilpentadecanoico (Pristane) (Sigma) por vía intra peritoneal. A partir del líquido ascítico fue determinada la concentración de Igs según la técnica de ELISA específico indirecto (según sección 10.2.4).

10.2.4. ELISA específico indirecto para la detección de anticuerpos anti-IFN- β 1

La puesta en evidencia de Ab específicos en los sueros o en el sobrenadante de cultivo de hibridomas se efectuó mediante un ensayo inmunoenzimático.

La técnica de ELISA consistió en:

- 1- Sensibilización: placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano fueron sensibilizadas con 100 μ l/pozo de rhIFN- β 1b (Betaferon) 0,5 μ g/ml (50 ng/pozo) diluido en solución de sensibilización. Se incubó durante 1 h a 37 °C y toda la noche a 4 °C.
- 2- Bloqueo: los sitios de unión inespecífica fueron bloqueados con 200 μ l/pozo de solución de bloqueo. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 3- Primera incubación: se adicionaron 100 μ l/pozo de cada muestra para el monitoreo de la producción de Abs específicos. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 4- Segunda incubación: se agregaron 100 μ l/pozo Ab de cabra anti-Ig de conejo conjugados con la enzima peroxidasa (DAKO) o Ab de conejo anti-Ig murinas conjugados con la enzima peroxidasa (DAKO), para la detección en sueros de conejo o en sueros de ratón y sobrenadantes de hibridomas, respectivamente, diluidos en solución diluyente. Se incubó nuevamente durante 1 h a 37 °C.
- 5- Reacción reveladora: se repitió el procedimiento indicado en 10.2.2.

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron seis lavados con solución de lavado.

10.3. Producción de suero anti-IFN- β 1 en conejos

10.3.1. Obtención de suero policlonal

Para obtener un antisuero anti-IFN- β 1 en conejos, se llevó a cabo un plan de inmunización durante 51 días. Se inmunizaron dos conejos con 20 o 40 μ g de rhIFN- β 1b puro, respectivamente. Para la preparación del inóculo, 5 ml de cada una de las soluciones de rhIFN- β 1b en PBS se emulsionaron con 5 ml de AFC. La emulsión resultante se inyectó por vía subcutánea multisitio en la región dorsal de cada animal. A los 29 días se realizó una inoculación idéntica a la anterior, pero utilizando adyuvante de Freund incompleto (AFI) (Sigma). A los 36 días del plan de

inmunización, se realizó una sangría exploratoria con el objeto de determinar el título de los anticuerpos por ELISA específico indirecto (según sección 10.2.4). Se efectuaron sucesivas sangrías por la vena marginal de la oreja de los conejos, para la obtención del anti-suero hiperinmune a los 41, 45 y 51 días.

10.3.2. Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad a proteína A

Luego de la obtención de Igs en los fluidos ascíticos o sueros, la purificación de los Abs se llevó a cabo en un equipo FPLC empleando una columna de Sepharose-Proteína A HiTrap (GE Healthcare) de 5 ml de matriz, de acuerdo con los siguientes pasos:

- 1- Equilibrado de la columna: con solución de 1 M Tris/HCl, 3 M NaCl, pH 9. Se emplearon 5 volúmenes de columna para esta etapa.
- 2- Acondicionamiento de la muestra: el líquido ascítico o el suero se ajustaron a pH 9 con solución de 1 M Tris/HCl y posteriormente se agregó NaCl sólido de manera de alcanzar una concentración 3 M. Se sembró un volumen de muestra apropiado según la capacidad de la matriz cromatográfica y la concentración de Igs presentes en el líquido ascítico o en el suero. Se respetó una relación de 6 mg de Ig por cada ml de gel.
- 3- Siembra: la muestra se sembró a un flujo de 0,5 ml/min.
- 4- Lavado: las proteínas no retenidas por la matriz se lavaron con solución de 1 M Tris/HCl, 3 M NaCl, pH 9, al mismo flujo de siembra, hasta demostrar la ausencia de proteínas por medida de la absorbancia a una DO 280 nm.
- 5- Elución: se realizó por descenso de pH. Se empleó una solución de 0,1 M ácido cítrico/NaOH, pH 3. Se recogieron alícuotas de 1 ml y se neutralizaron inmediatamente agregando 0,37 ml de solución de 1 M Tris/HCl, pH 9. Las fracciones correspondientes al pico de elución de Igs, monitoreado a DO 280 nm, fueron mezcladas y el producto obtenido fue dializado contra PBS toda la noche a 4 °C.

El flujo establecido para todas las etapas del proceso cromatográfico fue de 0,5 ml/min.

Luego de la diálisis, la concentración de Abs fue determinada mediante lectura espectrofotométrica. Se asumió que una unidad de absorbancia a DO 280 nm de una solución de Igs murinas equivale a una concentración de 0,8 mg/ml de Ab puro (Harlow y Lane, 1988); y que una unidad de absorbancia a DO 278 nm de una solución de Igs de conejo equivale a una concentración de 0,625 mg/ml de Ab puro (Margni, 1996).

10.3.3. Conjugación de inmunoglobulinas de conejo con biotina

Se biotinizaron las Igs de conejo purificadas por cromatografía de afinidad a proteína A. La metodología desarrollada para la preparación de conjugados con biotina fue puesta a punto en el laboratorio siguiendo esencialmente las pautas establecidas por Bayer y col. en 1979:

- 1- Se preparó una solución de 10 mg/ml del reactivo de biotina esterificada con ácido succínico (N-hidroxisuccinimidil éster de biotina, Sigma) en DMSO.
- 2- Las Igs fueron dializadas con solución de 0,1 M borato de sodio, pH 8,8. La concentración de Igs en el material de diálisis fue determinada mediante lectura espectrofotométrica a DO 278 nm.
- 3- Posteriormente, se adicionó el volumen necesario de solución de éster de biotina a la solución de Igs, de manera de establecer la siguiente relación: 200 µg de biotina por cada mg de proteína. Se incubó durante 4 h en agitación a temperatura ambiente.
- 4- Luego de la etapa de biotilación propiamente dicha, se inhibió la reacción agregando solución de 1 M NH₄Cl. Se incubó durante 10 min. La reacción de inhibición se basó en la neutralización de la biotina remanente con iones amonio.
- 5- Para eliminar la biotina no reaccionante se procedió a dializar la muestra con PBS durante 36 h.
- 6- Luego de la diálisis se procedió a centrifugar el material biotilado en microcentrífuga Sanyo BS 4402 (Gran Bretaña) a 13.000 rpm durante 5 min para eliminar el material precipitado durante esta etapa. Se descartó el precipitado y el sobrenadante se diluyó con igual volumen de glicerol al 87% V/V. De esta manera, la conservación de las Igs biotiladas se realizó en glicerol al 43,5% V/V y a -20 °C.
- 7- La eficiencia de la biotilación se determinó titulando las Igs sometidas al acoplamiento con biotina frente a su antígeno, mediante ensayo de ELISA específico indirecto (según sección 10.3.4).

10.3.4. Evaluación de la eficiencia de conjugación de inmunoglobulinas de conejo con biotina

La eficiencia de la biotilación de las Igs se determinó titulándolas mediante un ensayo de ELISA específico indirecto que se detalla a continuación.

- 1- Sensibilización: una placa de poliestireno de fondo plano de 96 pozos fue sensibilizada con 100 µl/pozo de rhIFN-β1b (Betaferon) 0,5 µg/ml (50 ng/pozo) diluido en solución de sensibilización. Se incubó durante 1 h a 37 °C y toda la noche a 4 °C.
- 2- Bloqueo: los sitios de unión inespecífica fueron bloqueados con 200 µl/pozo de solución de bloqueo. Se incubó durante 1 h a 37 °C.

- 3- Primera incubación: se adicionaron 100 μ l/pozo de Igs biotiniladas o sin biotinar en sucesivas diluciones al medio en solución diluyente. La incubación se realizó durante 1 h a 37 °C.
- 4- Segunda incubación: se adicionaron 100 μ l/pozo de streptavidina conjugada con la enzima peroxidasa (Sigma) o de Ab de cabra anti-Ig de conejo conjugados con la enzima peroxidasa diluidas en solución diluyente, para detectar las Igs biotiniladas y sin biotinar, respectivamente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 5- Reacción reveladora: se repitió el procedimiento indicado en 10.2.2.

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron seis lavados con solución de lavado.

10.4. ELISAs

Para cuantificar el rhIFN- β 1a presente en los sobrenadantes de cultivo se utilizaron los anticuerpos obtenidos previamente, optimizando la técnica de ELISA.

Se plantearon diferentes diseños de ELISAs, empleando varias combinaciones de Igs de ratón purificadas a partir de la ascitis 2C12 y suero de conejo o las Igs de conejo purificadas en su forma biotinilada o sin biotinar.

Un problema común que se presenta en los inmunoensayos es la influencia que ejercen los componentes de la solución en la que se encuentra la citoquina a cuantificar sobre el reconocimiento del antígeno (Ag) y por parte del Ab. Esto se debe al hecho de que pueden producirse determinadas interacciones de naturaleza inespecífica.

Para analizar la influencia del medio de dilución de la citoquina, en todos los casos se realizaron cálculos de recuperación de la concentración de rhIFN- β 1b diluido en medio suplementado con 5% V/V SFB, utilizando como estándar la curva de la citoquina diluida en una solución 0,1% P/V BSA y 0,05% V/V Tween en PBS. La concentración de citoquina en el ensayo se calculó interpolando siempre en las distintas curvas con el valor de absorbancia correspondiente al 50% de la zona de linealidad de la curva estándar. El cociente entre la concentración de citoquina así estimada y su dilución, permitió determinar la concentración de citoquina en la muestra.

En este tipo de análisis es muy importante incorporar el estudio del paralelismo de las curvas, con el objeto de identificar y monitorear cambios en el funcionamiento del ensayo debido a los reactivos (Hamilton y Franklin Adkinson, 1988). Idealmente, las curvas del estándar y la muestra deberían ser paralelas. La importancia práctica del paralelismo reside en que una determinada muestra obtendrá la misma estimación final de su dosis (corregida por la dilución correspondiente) luego de la interpolación en cualquier sector de la curva del estándar.

10.4.1. ELISA *sandwich* empleando inmunoglobulinas de conejo

Este ensayo se basa en la captura de rhIFN- β 1 por parte de Igs de conejo, purificadas a partir de suero con actividad anti-IFN- β 1, inmovilizadas sobre placas. Posteriormente el rhIFN- β 1 es reconocido por las Igs de conejo purificadas y biotiniladas. Éstas, a su vez reaccionarán con streptavidina conjugada con una enzima, que catalizará, *a posteriori*, la transformación de su sustrato incoloro en una sustancia coloreada.

Se procesaron el estándar y los controles por duplicado, de acuerdo con la siguiente metodología:

- 1- Sensibilización: placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano fueron sensibilizadas con 100 μ l/pozo de Igs de conejo purificadas desde el suero 0,6 μ g/ml (60 ng/pozo) diluida en solución de sensibilización. Se incubó durante 1 h a 37 °C y toda la noche a 4 °C.
- 2- Bloqueo: los sitios de unión inespecífica fueron bloqueados con 200 μ l/pozo de solución de bloqueo. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 3- Primera incubación: se agregaron 100 μ l/pozo de rhIFN- β 1b (Betaferon), desde 40,000 hasta 0,039 μ g/ml, realizando sucesivas diluciones al medio en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 4- Segunda incubación: se agregaron a cada pozo 100 μ l de Igs de conejo biotiniladas diluidas en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 5- Tercera incubación: se agregaron 100 μ l/pozo de streptavidina conjugada con la enzima peroxidasa (DAKO) en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 6- Reacción reveladora: se repitió el procedimiento indicado en 10.2.2.
- 7- Controles: se efectuó un control negativo, incubando en ausencia de Ag soluble. Para ello, durante la primera incubación se adicionaron 100 μ l de solución diluyente en lugar de Ag, continuando posteriormente con las siguientes etapas del ensayo.
- 8- Se graficaron los valores de absorbancia en función de las correspondientes concentraciones de rhIFN- β 1 en escala logarítmica.

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron seis lavados con solución de lavado.

10.4.2. ELISA *sandwich* empleando un anticuerpo monoclonal y un anti-suero policlonal

Este ensayo se basa en la captura de rhIFN- β 1 por parte de Igs murinas, purificadas a partir de la ascitis 2C12 con actividad anti-IFN- β 1 e inmovilizadas sobre placas. Posteriormente el rhIFN- β 1 es reconocido por Igs presentes en el suero de conejo 2. Éstas, a su vez reaccionarán con un segundo Ab conjugado con una enzima,

que catalizará, *a posteriori*, la transformación de su sustrato incoloro en una sustancia coloreada.

Se procesaron el estándar y los controles por duplicado, de acuerdo con la siguiente metodología:

- 1- Sensibilización: placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano fueron sensibilizadas con 100 μ l/pozo de Igs murinas purificadas desde ascitis 2C12 0,5 μ g/ml (50 ng/pozo) diluida en solución de sensibilización. Se incubó durante 1 h a 37 °C y toda la noche a 4 °C.
- 2- Bloqueo: los sitios de unión inespecífica fueron bloqueados con 200 μ l/pozo de solución de bloqueo. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 3- Primera incubación: se agregaron 100 μ l/pozo rhIFN- β 1b (Betaferon), desde 2,000 hasta 0,002 μ g/ml, realizando sucesivas diluciones al medio en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 4- Segunda incubación: se agregaron 100 μ l/pozo de suero de conejo diluido en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 5- Tercera incubación: se agregaron 100 μ l/pozo de Ab de cabra anti-Ig de conejo conjugados con la enzima peroxidasa en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 6- Reacción reveladora: se repitió el procedimiento indicado en 10.2.2.
- 7- Controles: se efectuó un control negativo, incubando en ausencia de Ag soluble. Para ello, durante la primera incubación se adicionaron 100 μ l de solución diluyente en lugar de Ag, continuando posteriormente con las siguientes etapas del ensayo.
- 8- Se graficaron los valores de absorbancia en función de las correspondientes concentraciones de rhIFN- β 1 en escala logarítmica.

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron seis lavados con solución de lavado.

10.4.3. ELISA de competición empleando inmunoglobulinas de conejo y un anticuerpo monoclonal

En este ensayo se emplean Igs de conejo purificadas a partir de suero e Igs murinas purificadas a partir de ascitis 2C12, ambas con actividad anti-IFN- β 1. Este ELISA se basa en la competición por el rhIFN- β 1 entre Igs de conejo inmobilizadas sobre placas e Igs murinas presentes en forma soluble. Estas últimas, a su vez reaccionarán con un segundo Ab conjugado con una enzima, que catalizará, *a posteriori*, la transformación de su sustrato incoloro en una sustancia coloreada. Bajo este principio se puede determinar la concentración del Ag en muestras complejas con alta sensibilidad y especificidad.

Se procesaron el estándar, los controles y las muestras por duplicado, de acuerdo con la siguiente metodología:

- 1- Sensibilización: placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano fueron sensibilizadas con 100 μ l/pozo de Igs de conejo purificadas desde el suero 0,5 μ g/ml (50 ng/pozo) diluida en solución de sensibilización. Se incubó durante 1 h a 37 °C y toda la noche a 4 °C.
- 2- Bloqueo: los sitios de unión inespecífica fueron bloqueados con 200 μ l/pozo de solución de bloqueo. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 3- Primera incubación: se agregaron 50 μ l/pozo rhIFN- β 1b (Betaferon), desde 2,000 hasta 0,002 μ g/ml, realizando sucesivas diluciones al medio.
Las muestras se ensayaron en diferentes concentraciones, realizando diluciones seriadas al medio, de manera de poder compararlas con el estándar en el rango de linealidad de la curva, agregando 50 μ l/pozo.
En el mismo momento, se agregaron 50 μ l/pozo de Igs murinas purificadas desde la ascitis 2C12 2 μ g/ml (0,2 μ g/pozo).
Todas las diluciones fueron realizadas en solución diluyente. Se incubó durante 2 h a 37 °C.
- 4- Segunda incubación: se agregaron 100 μ l/pozo de Ab de conejo anti-Ig murinas conjugada con la enzima peroxidasa en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 5- Reacción reveladora: comprende la reacción enzimática reveladora empleando como sustrato H₂O₂ 0,015 vol diluida en solución de revelado con el agregado de OPD en una concentración de 0,5 mg/ml. La incubación se realizó en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 min, para finalmente detener la reacción enzimática con el agregado 50 μ l/pozo de 2 N H₂SO₄. La lectura del color generado se efectuó a DO 492 nm en un lector de placas de microtitulación.
- 6- Controles: se efectuó un control negativo, incubando en ausencia de Ag soluble. Para ello, durante la primera incubación se adicionaron 50 μ l de solución diluyente en lugar de Ag, continuando posteriormente con las siguientes etapas del ensayo.
- 7- Se graficaron los valores de absorbancia en función de las correspondientes concentraciones de rhIFN- β 1 y las diluciones, en escala logarítmica para el estándar y las muestras respectivamente. Comparando la curva de cada muestra con la correspondiente curva estándar, se determinaron las concentraciones de las muestras.

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron seis lavados con solución de lavado.

10.5. Immunodot

La técnica de *immunodot* constituye un método rápido para la identificación de líneas celulares productoras de rhIFN- β 1a. Permite estimar la concentración de la proteína presente en los sobrenadantes de los cultivos, por comparación visual del color originado por la muestra y el color producido por testigos de concentraciones

conocidas. Se basa en el reconocimiento inmunológico del antígeno (proteína de interés), adsorbido sobre membranas de nitrocelulosa, por parte de Ab específicos. Estos, a su vez reaccionarán con un segundo Ab conjugado con una enzima, que catalizará, *a posteriori*, la transformación de su sustrato incoloro en una sustancia coloreada.

Para ello, 40 µl de muestra se adsorbieron sobre papel de nitrocelulosa (BioRad, EE.UU.), utilizando un Hybridot (BioRad). Posteriormente se efectuaron los siguientes pasos:

- 1- Bloqueo: los sitios de papel de nitrocelulosa sin proteínas adsorbidas fueron bloqueados por inmersión del papel de nitrocelulosa en solución de 1% P/V BSA disuelta en solución salina de tris (TBS) (0,05 M Tris, 0,015 M NaCl, pH 7,5), durante 1 h, con agitación.
- 2- Primera reacción inmuno-específica: se sumergió el papel de nitrocelulosa en una solución de ascitis 2C12, diluida en 0,1% P/V BSA en TBS (solución diluyente de inmunodot). Se incubó durante 1 h con agitación.
- 3- Segunda reacción inmuno-específica: se llevó a cabo sumergiendo el papel de nitrocelulosa en una solución de Ab de conejo anti-Ig murinas conjugado con peroxidasa diluido en solución diluyente de inmunodot. Se incubó durante 1 h en agitación.
- 4- Revelado: se emplearon dos soluciones preparadas en el momento, mezclándolas inmediatamente antes de su uso.
 - a) solución de H₂O₂ 0,15 vol en TBS.
 - b) solución de 0,25 % P/V α-cloronaftol en metanol.

Luego de cada etapa se efectuaron tres lavados. Cada lavado consistió en sumergir el papel de nitrocelulosa en solución de TBS, durante 3 min, con agitación.

Como patrón se empleó Betaferon, diluido en solución diluyente de *inmunodot*, en un rango de concentraciones desde 2,500 hasta 0,001 µg/ml, en diluciones sucesivas al medio. Como control negativo se empleó solución diluyente de *inmunodot*.

10.6. Valoración de la actividad biológica *in vitro*

La valoración de la actividad biológica de una citoquina puede realizarse empleando diferentes métodos, pero todos ellos se fundamentan en la capacidad de la proteína para inducir alguna actividad cuantificable en células o tejidos (Wadhwa y col., 1996).

En la actualidad es muy raro que se determine la actividad biológica *in vivo*, ya que el desarrollo de líneas celulares que responden a una determinada citoquina constituyó un avance importante en la provisión de material para realizar los bioensayos. Líneas celulares, humanas o murinas, pueden depender de la presencia de una citoquina para su crecimiento y usualmente son inmortales, constituyendo esto una fuente homogénea de células que pueden distribuirse de laboratorio a laboratorio.

Todos los ensayos de actividad antiviral para IFNs cuantifican la actividad inhibitoria que ejercen estas proteínas sobre la propagación o replicación viral. El procedimiento más conveniente y simple es medir la capacidad del IFN para proteger las células susceptibles del efecto citopático de virus líticos, para un dado rango de concentraciones de IFN.

El procedimiento básico consiste en colocar suficiente cantidad de células sensibles al IFN- β 1, en nuestro caso células WISH, de manera que se encuentren en confluencia, en presencia de diferentes concentraciones de rhIFN- β 1 que inducen el estado antiviral, después de lo cual las células son expuestas a un virus citolítico, en este caso VSV (virus de la estomatitis vesicular), hasta que se observa el máximo efecto citopático en las células control (en ausencia de rhIFN- β 1). En este momento las células protegidas con el rhIFN- β 1 son coloreadas determinando los niveles del efecto citopático. La mayoría de los métodos basados en la actividad antiviral, fijan y colorean las células con colorantes que sólo o preferencialmente tiñen las células vivas. Usualmente las células adherentes muertas permanecen unidas en el fondo del pozo; sin embargo, subsecuentes lavados y el procedimiento de coloreado pueden despegarlas (Meager, 2002).

Luego se grafican curvas dosis-respuesta a partir de las cuales se calcula la potencia de las preparaciones de rhIFN- β 1, en términos de unidades de actividad antiviral.

El diseño de bioensayos *in vitro* puede adoptar diferentes formas; sin embargo, un ensayo de un único punto se convierte en una condición no válida. Así, una serie de mediciones de la muestra que se desea cuantificar, debe ser comparada con una serie de mediciones de un material de referencia o estándar, observando particular atención a la comparación de las regiones lineales de ambas curvas dosis-respuesta (Mire-Sluis y col., 1996).

La estimación de la potencia biológica de rhIFN- β 1 se realizó mediante el ensayo de rectas paralelas, basado en la comparación de la respuesta de una muestra con la de un estándar de referencia. Para ello, se determinó la respuesta del ensayo de actividad antiviral por triplicado de una serie de diluciones del estándar y de la muestra. Posteriormente se graficaron las mediciones de absorbancia frente a sus correspondientes dosis en escala logarítmica. Para este ensayo, la condición de similitud entre el estándar y la muestra requiere que las rectas de ambas preparaciones sean paralelas, trabajando con aquellas dosis pertenecientes a la región lineal de las curvas.

Inicialmente se optimizaron las condiciones del bioensayo empleando como estándar rhIFN- β 1b (Betaferon), para la determinación de la potencia de una muestra incógnita, variando el tiempo del ensayo entre 24, 48 y 72 h (Rubinstein y col., 1981).

Para el ensayo de 24 h, se utilizó el medio MEM suplementado con 10% V/V SFB, y se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo:

- 1- En placas de cultivo de 96 cavidades de fondo plano se colocaron 100 µl/pozo de diluciones sucesivas al medio en medio de cultivo, realizando por triplicado curvas de:
 - estándar: desde una concentración de 48 hasta 0,024 UI/ml.
 - muestra incógnita: en una dilución conveniente y realizando las diluciones.
- 2- Se realizan por cuadruplicado los siguientes controles:
 - control de virus: 100 µl de medio, de modo de observar el efecto del virus sobre las células. Es un control de lisis.
 - control de células: 100 µl de suspensión celular, para evaluar la máxima absorbancia.
- 3- La línea celular WISH se cultivó 3 días antes del ensayo. Cuando la suspensión celular se encontró en fase de crecimiento logarítmico ($3-5 \cdot 10^5$ cél/ml), se cosecharon las células, se contaron y se resuspendieron de manera tal de alcanzar una densidad celular de $4 \cdot 10^5$ cél/ml.
- 4- Se sembraron 100 µl de la suspensión celular ($4 \cdot 10^4$ cél) en cada cavidad, excepto en el control sin células. Seguidamente se incubó durante 4 h.
- 5- Finalmente se agregaron 50 µl de una dilución apropiada del virus VSV en cada cavidad de la placa. Incubando durante 24 h.
- 6- Se eliminó el medio de la placa por inversión de la misma, se escurrió y se agregaron 50 µl por pozo de 0,75% P/V cristal violeta en 40% V/V metanol. Incubando durante 15 min a 37 °C.
- 7- Posteriormente, se eliminó el colorante, enjuagando con agua destilada hasta que el agua eliminada fue límpida, escurriendo nuevamente.
- 8- Se agregaron 250 µl de 20% V/V ácido acético en cada cavidad, homogeneizando para que el color sea uniforme y la lectura del color generado se efectuó a una DO 540 nm en un lector de placas de microtitulación.
- 9- Se graficaron los valores de absorbancia en función de las correspondientes concentraciones de rhIFN-β1 y diluciones, en escala logarítmica, para el estándar y las muestras respectivamente. Comparando la curva de la muestra con la correspondiente curva estándar, se determinaron las actividades de las muestras.

Para los ensayos de 48 y 72 h, se utilizó el medio MEM suplementado con 2% V/V SFB, y se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo:

- 1- La línea celular WISH se cultivó 3 días antes del ensayo. Cuando la suspensión celular se encontró en fase de crecimiento logarítmico, se cosecharon las células, se contaron y se resuspendieron de manera tal de alcanzar una densidad celular de $2,5 \cdot 10^5$ cél/ml, sembrando 100 µl por cavidad ($2,5 \cdot 10^4$ cél) en una placa de cultivo de 96 pozos. Incubando durante 24 h.
- 2- Se eliminó el sobrenadante por inversión de la placa, se escurrió y se colocaron 100 µl de medio a cada pozo y se agregaron a los primeros pozos 100 µl del estándar o de la muestra incógnita,

realizando posteriormente diluciones sucesivas al medio. Se incubó durante 6 y 24 h para cada uno de los ensayos, respectivamente.

- 3- Se realizan por cuadruplicado los mismos controles que fueron detallados en el paso 2 del ensayo de 24 h.
- 4- Se volcó el medio por inversión de la placa y se la lavó dos veces con 100 µl de medio.
- 5- Finalmente se agregaron 100 µl de una dilución apropiada del virus VSV en cada cavidad de la placa. Incubando durante 24 h.
- 6- Se repitieron los pasos 6 a 9 del ensayo de 24 h.

10.7. Electroforesis

10.7.1. Electroforesis en geles de agarosa

Para la preparación de *buffer* Tris base, ácido acético y EDTA (TAE), se disolvieron 242 g de Tris y 19,01 g de EDTA en aproximadamente 800 ml de agua calidad MilliRo (Millipore). Se adicionaron 57,1 ml de ácido acético glacial. Se ajustó el volumen final a un litro y se esterilizó en autoclave durante 15 min a 1 atmósfera.

Para las separaciones de ADN en geles de agarosa se empleó el sistema submarino (Ausubel y col., 1987). Para la preparación del gel, se pesó la cantidad de agarosa adecuada y se disolvió en *buffer* TAE, adicionándole bromuro de etidio, a partir de una solución de 10 mg/ml hasta una concentración final de 0,5 µg/ml.

Las muestras de ADN se mezclaron con el *buffer* de siembra 6 X (10% P/V Ficoll 400, 0,25% P/V azul de bromofenol, 0,25% P/V xilen cianol FF, 0,4% P/V orange G, 10 mM Tris/HCl, 50 mM EDTA, pH 7,5) y cuidadosamente se sembraron en cada una de las calles del gel. Se aplicó un voltaje entre 80 y 100 V hasta que los colorantes del *buffer* de siembra lograron migrar a lo largo del gel.

Finalmente, el gel fue examinado en luz UV y fotografiado. El fundamento de la detección de los fragmentos de ADN empleando luz UV se basa en que el bromuro de etidio presenta una estructura planar que al intercalarse entre las bases de las moléculas de ácidos nucleicos, se une y origina un incremento en la fluorescencia comparado con el colorante libre. La radiación UV es absorbida y la energía es emitida en la región del espectro visible correspondiente a 590 nm (roja-naranja).

10.7.2. Electroforesis en geles de bajo punto de fusión

De las diversas técnicas disponibles para recuperar fragmentos de ADN de gran tamaño desde un gel, se escogió aquella que emplea geles de agarosa de bajo punto de fusión (Metaphor™, EE.UU.).

Los pasos seguidos tanto para la preparación del gel como para la siembra y corrida de las muestras fueron similares a los descritos anteriormente, con la única diferencia de que el voltaje aplicado para lograr la separación del ADN fue entre 30 y 50 V. Finalizada la separación electroforética, se observó el gel bajo luz UV y se procedió al corte del fragmento de ADN de interés.

Se disolvió el fragmento deseado en H₂O en un baño a 60 °C, realizando luego tres extracciones alcohólicas, dos con fenol : cloroformo y una con cloroformo, y la posterior precipitación del ADN con isopropanol, resuspendiéndolo finalmente en H₂O. Por último, se determinó la pureza y la concentración de los fragmentos, mediante un gel de agarosa.

10.7.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y *Western blot* para el análisis de proteínas

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) y un agente reductor de enlaces disulfuro (condiciones desnaturalizantes) se desarrolló siguiendo esencialmente el método descrito por Laemmli (1970), utilizando para el armado de los geles el sistema de electroforesis modular vertical *Mini-Protean II* (BioRad). Para ello, las muestras se mezclaron con solución de 50 mM Tris, 2% P/V SDS, 10% V/V glicerol, 5% V/V β-mercaptoetanol, 0,05% P/V azul de bromofenol, pH 6,8 (solución de preparación de muestras), en proporción 3:1. Las muestras fueron incubadas a 100 °C durante 3 min y aplicadas sobre el gel de apilamiento, cuya concentración fue del 5% P/V acrilamida/bisacrilamida. El gel de separación se polimerizó a una concentración del 15% P/V acrilamida/bisacrilamida. La corrida electroforética se llevó a cabo a voltaje constante de 200 V, sumergiendo el módulo en baño de hielo, hasta que el frente de corrida alcanzó 0,5 cm del borde inferior del gel.

Luego de la corrida se procedió a desmontar el gel y realizar la coloración utilizando la técnica de coloración argéntica (Tunon y Johansson, 1984) o se continuó con la técnica de *Western blot*, para lo cual se empleó un protocolo estándar de transferencia de proteínas utilizando como solución de transferencia 192 mM glicina en 25 mM Tris, pH 8,3, con el agregado de 20% V/V metanol. La transferencia se realizó durante 1 h a amperaje constante de 180 mA refrigerando el dispositivo en todo momento. El éxito de la misma se evaluó coloreando la membrana con solución de 0,25% P/V rojo Ponceau en 15% V/V ácido acético y 40% V/V metanol. Posteriormente, se efectuó el bloqueo de la membrana y la detección inmunoquímica de rhIFN-β1 según se describió en la sección 10.5 o de la siguiente manera, en el caso de revelar las membranas por quimioluminiscencia:

- 1- Bloqueo: los sitios de papel de nitrocelulosa sin proteínas adsorbidas fueron bloqueados por inmersión del papel de nitrocelulosa en solución de 5% P/V leche descremada disuelta en TBS, durante 1 h, con agitación.
- 2- Primera reacción inespecífica: se sumergió el papel de nitrocelulosa en una solución de ascitis 2C12, diluida en 0,5% P/V leche descremada en TBS (solución diluyente de *Western blot*). Se incubó durante 1 h con agitación.
- 3- Segunda reacción inespecífica: se llevó a cabo sumergiendo el papel de nitrocelulosa en una solución de Ab de conejo anti-Ig

- murinas conjugado con peroxidasa diluido en solución diluyente de *Western blot*. Se incubó durante 1 h en agitación.
- 4- Revelado: se empleó el kit de quimioluminiscencia ECL™ *Western Blotting Analysis System* (Amersham Biosciences, Inglaterra) siguiendo las indicaciones del fabricante. Luego de incubar las membranas durante 5 min a temperatura ambiente, se retiró el exceso de reactivo y se colocaron en un soporte de nylon sellando los extremos para evitar el contacto del sustrato con la película reveladora. Finalmente las membranas fueron expuestas a una película fotográfica Kodak Biomax XAR *Film* (Kodak, EE.UU.) durante diferentes tiempos de manera de lograr la máxima resolución con un buen contraste entre la señal quimioluminiscente y el fondo. La exposición de las membranas a la película fotográfica se efectuó en cuarto oscuro, provisto de una lámpara roja de 15 W. El revelado de la película fotográfica se efectuó en forma manual empleando el método convencional de revelado (Revelador y Reforzador GBX, Kodak, Brasil) y fijación (Fijador gráfico LITH, AGFA, Argentina).

Luego de cada etapa se efectuaron tres lavados. Cada lavado consistió en sumergir el papel de nitrocelulosa en solución de 0,05% V/V Tween 20 en TBS, durante 5 min, con agitación.

11. Construcción de vectores de expresión eucariota

11.1. Digestiones enzimáticas

Las digestiones con endonucleasas de restricción se realizaron respetando los medios y condiciones recomendadas por los proveedores de cada enzima en particular. En todos los casos la reacción se dejó transcurrir durante 2 h a 37 °C, empleándose de 1 a 5 U de enzima por cada µg de ADN.

Después de las digestiones enzimáticas, los fragmentos de hasta 1.000 pb se purificaron desde geles de agarosa utilizando un kit de purificación (GFX™ PCR DNA and Gel Band, Amersham Pharmacia Biotech Inc) siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de tener fragmentos de un tamaño superior, se purificaron desde geles de agarosa de bajo punto de fusión.

11.2. Ligaciones de ADN

Para las reacciones de ligación se utilizó una relación 3 inserto : 1 plásmido en un volumen de reacción de 20 µl, en presencia de la enzima T4 DNA Ligasa (Invitrogen, EE.UU.), según el protocolo indicado por el proveedor, incubando toda la noche a 24 °C.

11.3. Subclonado del gen de hIFN- β 1 en diferentes vectores

11.3.1. Obtención de la región codificante de hIFN- β 1

Se realizó la extracción de ADN genómico a partir de células de sangre periférica. Para ello se recolectaron 20 ml de sangre fresca en tubos conteniendo 3,5 ml de anticoagulante (0,48% P/V ácido cítrico, 1,32% P/V citrato de sodio, 1,47% P/V glucosa), se centrifugó a 1.300 g durante 15 min, descartando el plasma sobrenadante. Se transfirió la capa de la interfase a un nuevo tubo, centrifugando nuevamente. Se resuspendieron las células en 3 ml de solución de extracción (10 mM Tris-HCl pH 8, 0,1 M EDTA pH 8, 20 μ g/ml RNAsa pancreática, 0,5% V/V SDS), incubando durante 2 h a 37 °C. Se agregó proteinasa K de manera tal de obtener una concentración final de 100 μ g/ml, incubando 1 h a 50 °C y agitando periódicamente para fragmentar la cromatina. Se realizaron diferentes extracciones alcohólicas con fenol, fenol : cloroformo y cloroformo, sucesivamente. Se precipitó el ADN con 5 M AcNH₄ y etanol incubando toda la noche a 4 °C. Se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 min a 4 °C, lavando y resuspendiendo el precipitado en 1 ml de H₂O estéril. Se determinó la concentración del ADN molde por el método espectrofotométrico, teniendo en cuenta que una unidad de DO a 260 nm corresponde a 50 μ g/ml de ADN doble hebra (Sambrook y col., 1989c).

Para realizar las reacciones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permitan la amplificación del gen de hIFN- β 1, se utilizaron los siguientes *primers* como *forward* (Fw) y *reverse* (Rv), respectivamente: 5'-ATGACCAACAAGTGTCTCTCCCAA-3' y 5'-TCAGTTTCGGAGGTAACCTGTAAG-3', en un termociclador (Biometra, Alemania) en el cual el ADN molde fue sometido a 40 ciclos consistentes en desnaturalización a 94 °C durante 1 min, hibridación a 64 °C durante 30 seg y extensión a 72 °C durante 1 min.

Los amplicones fueron analizados en un gel de agarosa y purificados utilizando un kit de purificación, determinando la pureza y la concentración de cada fragmento en un gel de agarosa. Luego se agregaron dATP en los extremos 3' de los fragmentos, de manera tal de permitir su posterior inserción en el plásmido pGEM-T Easy.

11.3.2. Construcción de vectores con la secuencia *wild type* del gen de hIFN- β 1

11.3.2.1. Vector pGEM-T Easy-IFN- β 1

Los productos de PCR fueron clonados en el plásmido pGEM-T Easy.

Después de realizar la transformación bacteriana, se seleccionaron clones verificando la orientación del inserto por restricción, con la enzima *Pst*I.

El vector pGEM-T Easy IFN- β 1 posee un origen de replicación bacteriana, una región del fago f1, que permite su amplificación en *E. coli* y el gen que codifica para resistencia a ampicilina para su selección en estas células.

Contiene además secuencias que permiten la selección de bacterias blancas o azules, en presencia de X-gal, según posean o no el gen de hIFN- β 1 (Fig. 6).

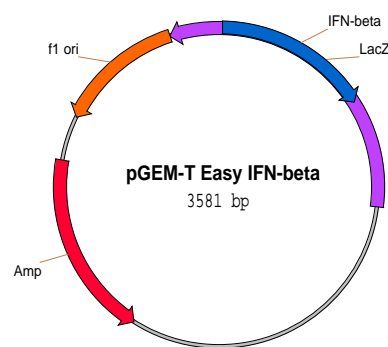


Fig. 6. Plásmido pGEM-T Easy-IFN- β 1.

11.3.2.2. Vector pCIneo-IFN- β 1

Se digirió el plásmido pCIneo con la enzima *EcoRI* y se desfosforiló utilizando para ello fosfatasa alcalina de intestino de ternero (CIAP, Gibco BRL), siguiendo las indicaciones del fabricante. Por último, se purificó con una extracción alcohólica con fenol : cloroformo, se precipitó con isopropanol y se determinó la concentración en un gel de agarosa.

Se efectuó la ligación del plásmido digerido y desfosforilado y del inserto derivado del vector pGEM-T Easy-IFN- β 1 escindido también con *EcoRI*.

Después de realizar la transformación bacteriana, se seleccionaron y amplificaron clones bacterianos verificando la presencia del inserto por restricción con la enzima *EcoRI*. Posteriormente, se determinó cuáles de los clones poseían el gen de hIFN- β 1 en la orientación correcta, mediante una transfección transiente de células CHO.K1 y posterior *screening* de los sobrenadantes utilizando la técnica de *immunodot*.

Se realizó el secuenciamiento automático de la construcción seleccionada para confirmar la identidad de la secuencia clonada en el vector denominado pCIneo-IFN- β 1.

El vector pCIneo-IFN- β 1 posee un origen de replicación bacteriana, una región del fago f1, que permite su amplificación en *E. coli* y el gen que codifica para resistencia a ampicilina para su selección en estas células.

Contiene además secuencias que permiten su expresión en eucariotas, como el promotor/*enhancer* CMV, un intrón quimérico compuesto por el sitio 5' de *splicing* del intrón de la BGH y el sitio 3' de *splicing* del intrón de la IgG, la señal tardía de poliA del SV40, el gen de la enzima neomicina fosfotransferasa y el de hIFN- β 1 (Fig. 7).

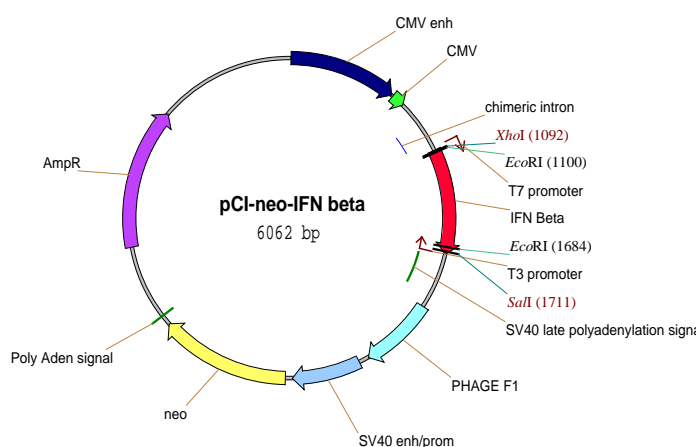


Fig. 7. Plásmido pCIneo-IFN- β 1.

11.3.2.3. Vector pKG4 -IFN- β 1

Se realizó una estrategia de subclonado de manera tal de colocar el gen de hIFN- β 1 en forma adyacente a sitios de restricción presentes también en el vector pKG4, siguiendo los pasos detallados en la Fig. 8, debido a que no había digestiones posibles que permitieran el clonado directo desde el vector pGEM-T Easy – IFN- β 1.

Se efectuó entonces la ligación del plásmido pGEM-3Zf(+) digerido con las enzimas *SalI* y *SphI* y del inserto derivado del vector pGEM-T Easy-IFN- β 1 cortado con las mismas enzimas, obteniendo el vector pGEM-3Zf(+)-IFN- β 1.

Posteriormente se realizó la ligación del vector pKG4 digerido con las enzimas *HindIII* y *BamHI* y del inserto proveniente del plásmido pGEM-3Zf(+)-IFN- β 1 cortado con las mismas enzimas.

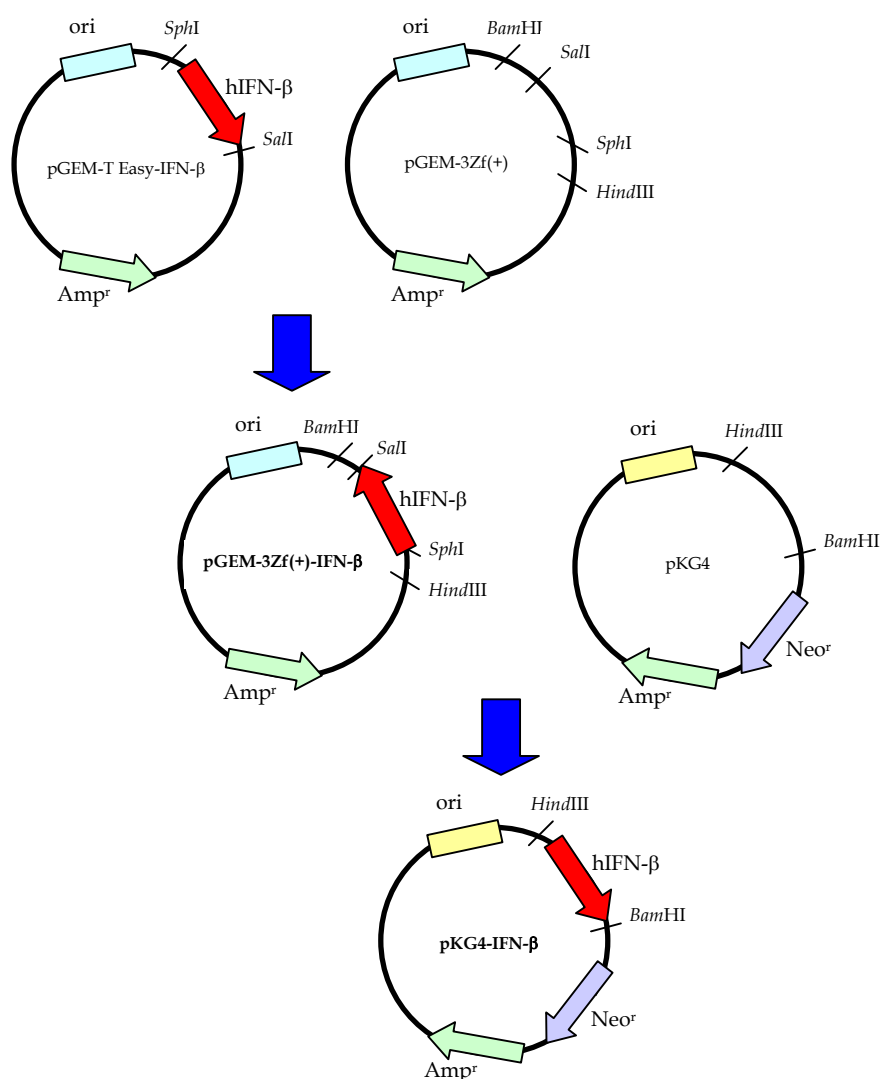


Fig. 8. Estrategia de clonado del gen de hIFN- β 1a en el vector pKG4.

El gen se escindió desde el plásmido pGEM-T Easy-IFN- β 1a por la digestión con las enzimas *SphI* y *SalI*, subclonándolo en el plásmido pGEM-3Zf(+), dando origen al vector pGEM-3Zf(+)-IFN- β 1a. Posteriormente, se escindió por digestión con las enzimas *BamHI* y *HindIII*, subclonándolo finalmente en el plásmido pKG4 digerido con las mismas enzimas, dando origen al vector pKG4-IFN- β 1a.

Se realizó el secuenciamiento automático de la construcción obtenida para confirmar la identidad de la secuencia clonada en el vector pKG4-IFN-β1.

El vector pKG4-IFN-β1 posee el origen de replicación bacteriana del plásmido pBR322, que permite su amplificación en *E. coli* y el gen que codifica para resistencia a ampicilina para su selección en bacterias.

Tiene además secuencias que permiten su expresión en eucariotas, como el promotor temprano del SV40, el gen de la enzima neomicina fosfotransferasa y el de hIFN-β1 (Fig. 9).

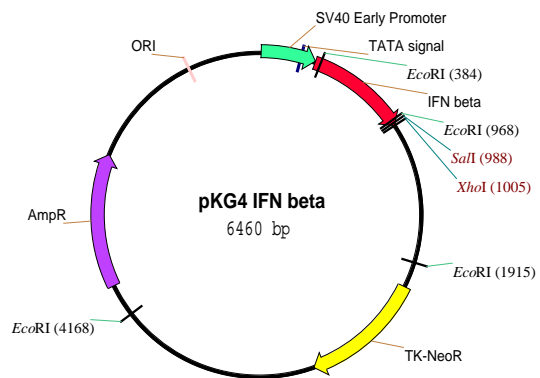


Fig. 9. Plásmido pKG4-IFN-β1.

11.3.2.4. Vector pcDNA-IFN-β1

El plásmido pcDNA-IFN-β1 fue cedido gentilmente por el Dr. Jorge Zorzópulos de la Fundación Pablo Cassará.

Se realizó el secuenciamiento automático de la construcción para confirmar la identidad de la secuencia clonada.

El vector pcDNA-IFN-β1 posee un origen de replicación bacteriana del plásmido pUC, que permite su amplificación en *E. coli*, así como el gen que codifica para resistencia a ampicilina para su selección en bacterias.

Tiene además secuencias que permiten su expresión en eucariotas, como el promotor de CMV, la señal de poliA de la BGH, el gen de resistencia a zeocina y el de hIFN-β1 (Fig. 10).

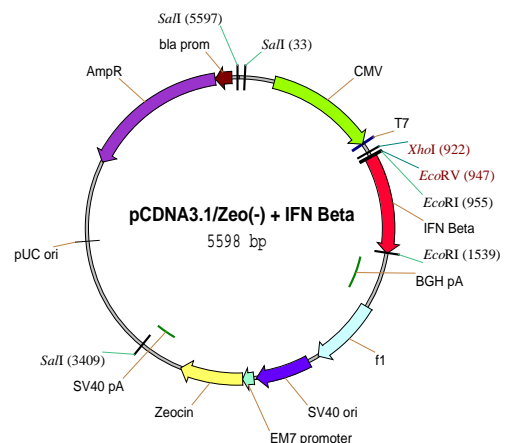


Fig. 10. Plásmido pcDNA-IFN-β1.

11.3.2.5. Vector p91023-IFN-β1

Se digirió el plásmido p91023 con la enzima *EcoRI* y se desfosforiló; posteriormente, se purificó con una extracción alcohólica con fenol : cloroformo, se precipitó con isopropanol y se determinó la concentración en un gel de agarosa.

Se efectuó la ligación del vector digerido y del gen derivado del vector pCIneo-IFN-β1 escindido con la misma enzima.

Se seleccionaron y amplificaron clones bacterianos, determinando cuales de ellos poseían el gen de hIFN-β1 orientado correctamente mediante la técnica de PCR, utilizando un *primer* Fw que hibrida con una región perteneciente al plásmido (5'-TCTCCACAGGTGTCCACTCC-3') y el *primer* Rv del gen de hIFN-β1.

Se realizó el secuenciamiento automático de la construcción obtenida para confirmar la identidad de la secuencia clonada en el vector p91023-IFN- β 1.

El vector p91023-IFN- β 1 posee el origen de replicación bacteriana del plásmido pBR322, que permite su propagación en *E. coli* y el gen de resistencia a la tetraciclina, para su selección en dichas células. Contiene secuencias reguladoras eucarióticas, como origen y *enhancer* del SV40, principal promotor tardío de adenovirus (Ad MLP) acoplado a un ADN copia (ADNc) del líder tripartito de Ad, un intrón híbrido consistente de un sitio 5' de *splicing* del primer exón del líder tripartito y el sitio 3' de *splicing* de un gen de Ig de ratón, la señal temprana de poliA del SV40, la región de los genes VA I y VA II de Ad, los genes de *dhfr* y de hIFN- β 1 (Fig. 11).

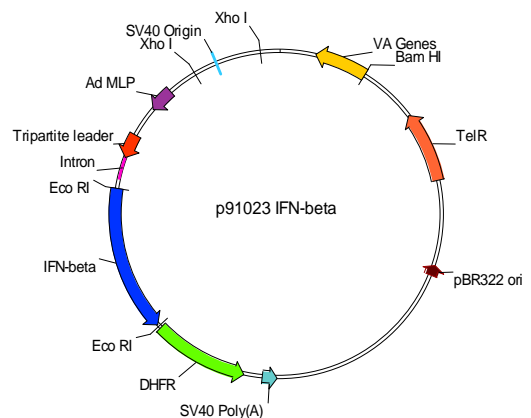


Fig. 11. Plásmido p91023-IFN- β 1.

11.3.2.6. Vector pzc-IFN- β 1

Con el fin de obtener un plásmido que posea un promotor fuerte como es el del CMV junto a su secuencia *enhancer*, presente en el vector pCIneo, y una cola de poliA muy estable como la de BGH, presente en el vector pcDNA3.1(-), se construyó un nuevo vector denominado pzc-IFN- β 1.

El gen de hIFN- β 1 junto a la región promotora se obtuvieron mediante digestión del plásmido pCIneo-IFN- β 1 con las enzimas *Bgl*II y *Kpn*I, lo que permitió posteriormente insertarlo en el plásmido de expresión pcDNA3.1(-) linealizado con las mismas enzimas.

Se seleccionaron y amplificaron clones bacterianos verificando la presencia del inserto por restricción, con la enzima *Eco*RI.

Se realizó el secuenciamiento automático de la construcción obtenida para confirmar la identidad de la secuencia clonada en el vector pzc-IFN- β 1.

El vector pzc-IFN- β 1 posee un origen de replicación bacteriano del plásmido pUC, que permite su amplificación en *E. coli*, así como el gen que codifica para resistencia a ampicilina para su selección en bacterias.

Tiene además secuencias que permiten su expresión en eucariotas, como el promotor/*enhancer* CMV, un intrón quimérico compuesto por el sitio 5' de *splicing* del intrón de la BGH y el sitio 3' de *splicing* del intrón de la IgG, la señal de poliA de BGH, el gen de resistencia a zeocina y el de hIFN- β 1 (Fig. 12).

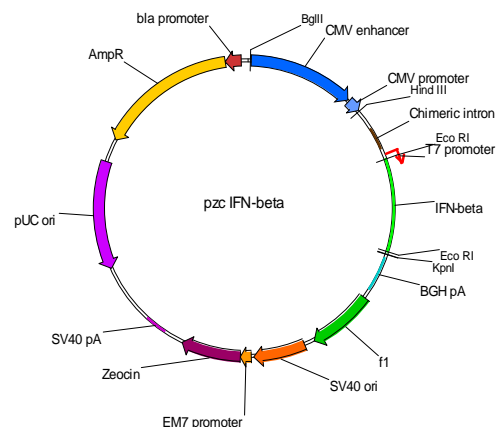


Fig. 12. Plásmido pzc-IFN- β 1.

11.4. Amplificación de ADN plasmídico

11.4.1. Preparación de bacterias competentes

La mayoría de los métodos para transformar bacterias están basados en las observaciones de Mandel e Higa (1970), los cuales demostraron que las bacterias tratadas con soluciones de CaCl₂ frías y seguidamente de un breve *shock* con calor se transformaban con el ADN del bacteriófago λ. El mismo método fue subsecuentemente empleado para transformar bacterias con ADN plasmídico (Cohen y col., 1972). Aparentemente, el tratamiento induce un estado transitorio de competencia de las bacterias receptoras, durante el cual son capaces de incorporar ADN de diferentes orígenes.

Para la preparación de las bacterias competentes se realizó una estría con *E. coli* DH5αF'Iq, sobre una placa de LB-agar. Se cultivó durante toda la noche a 37 °C. De las colonias desarrolladas se tomó una y se inoculó en 3 ml de medio LB, incubando toda la noche a 37 °C. Luego se repicó el cultivo, en una dilución 1/100 en medio LB, y se incubó a 37 °C, hasta alcanzar una DO 550 nm de 0,48.

Posteriormente, se incubó durante 5 min en baño de hielo y se centrifugó a 4.000 rpm durante 5 min a 4 °C, en una centrífuga *Eppendorf 5403*. Se eliminó el sobrenadante y se dejó escurrir en posición invertida. Se resuspendieron luego las bacterias en 20 ml de la solución de transformación I fría (30 mM KAc, 100 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂ y 15% V/V glicerol, pH 5,8, esterilizada con filtro de 0,2 μm). Se incubó durante 10 min en baño de hielo. Luego se centrifugó a 5.000 rpm durante 1 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, resuspendiendo las bacterias en 2 ml de la solución de transformación II (10 mM MOPS, 10 mM KCl, 75 mM CaCl₂ y 15% V/V glicerol, pH 6,5, esterilizada con filtro de 0,2 μm). Aquellas bacterias que no se emplearon inmediatamente para la transformación fueron conservadas a -70 °C hasta su utilización.

11.4.2. Transformación bacteriana

Para la transformación bacteriana se descongelaron 100 μl de células competentes y se mezclaron con 10 μl del producto de ligación, incubando durante 30 min en baño de hielo, luego en baño a 42 °C durante 70 seg, y por último, durante 2 min en baño de hielo.

Se agregó medio LB y se incubó durante 1 h a 37 °C. Finalmente, se plaquearon las bacterias en LB-agar con el antibiótico correspondiente, de modo tal de seleccionar las bacterias transformadas.

11.4.3. Extracción plasmídica

Con el fin de obtener concentraciones suficientes de los plásmidos a partir de bacterias transformadas para corroborar la presencia y la orientación del gen de hIFN-β1, se realizó una extracción plasmídica en **pequeña escala**. Para lo que se

inoculó el clon bacteriano a analizar en 10 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente, incubando toda la noche a 37 °C. Se fraccionó el cultivo en tubos *ependorf*, centrifugando a 5.000 rpm durante 10 min. Se resuspendió el *pellet* obtenido en 100 µl de solución I (25 mM Tris, 10 mM EDTA, 50 mM glucosa), incubando 5 min a temperatura ambiente. Se adicionaron 200 µl de solución II (0,2 N NaOH y 1% V/V SDS), incubando 5 min a 4 °C. Se agregaron 150 µl de solución III (3 M K⁺ y 5 M Ac⁻), incubando 10 min a 4 °C, centrifugando luego a 13.000 rpm durante 5 min. Se tomó el sobrenadante, realizándole una extracción alcohólica con fenol : cloroformo, y otra posterior, con cloroformo, centrifugando en ambos casos a 13.000 rpm durante 10 min, conservando siempre la fase acuosa. Por último se precipitó el ADN con isopropanol incubando 10 min a -20 °C, centrifugando a 13.000 rpm durante 15 min. Se lavó el precipitado con etanol, resuspendiéndolo en 20 µl de H₂O.

Con el fin de obtener concentraciones suficientes de los plásmidos a partir de bacterias transformadas, para ser utilizados durante las transfecciones, se realizó una extracción plasmídica en **escala intermedia**, utilizando el kit Wizard SV 96 Plasmid DNA Purification Kits (Promega, EE.UU.), siguiendo las indicaciones del fabricante.

En ambos casos, se observó la integridad, la concentración de los plásmidos y las posibles contaminaciones presentes, mediante electroforesis en gel de agarosa.

12. Transfecciones de líneas celulares eucariotas

12.1. Protocolo general para optimizar las condiciones de lipofección

Con el objetivo de optimizar las condiciones en las cuales usar cada lípido para obtener la mayor eficiencia de transfección para las distintas líneas celulares, se trabajó con un conjunto de lípidos catiónicos: Lipofectin (Gibco), LipofectAMINE (Gibco), LipofectAMINE 2000 (Invitrogen), LipofectAMINE Plus (Gibco), CellFECTIN (Gibco), DMRIE-C (Gibco) y DOTAP (Roche, Suiza), y ADN plasmídico pCMV.SPORT-β-gal (Gibco) (Fig. 13), que contiene el gen reportero de la β-gal. Después de realizada la transfección se efectuó la coloración *in situ* de la actividad β-gal de acuerdo con una combinación de las técnicas descritas por Sanes y col. (1986) y Coonrod y col. (1997).

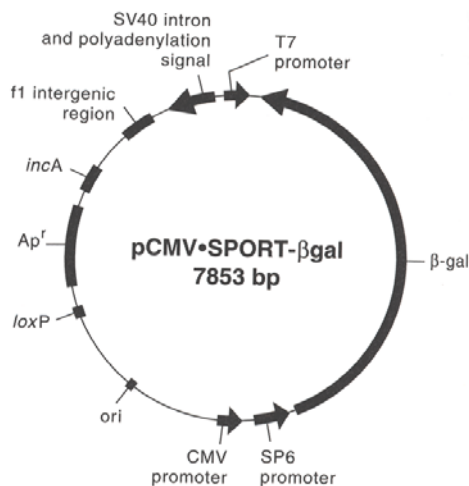


Fig. 13. Plásmido pCMV.SPORT-βgal.

El protocolo general para optimizar las condiciones de lipofección se detalla a continuación:

- 1- Se plaquearon aproximadamente 1.10^5 cél/ml en 1 ml de medio A suplementado con 5% V/V SFB, en pocillos de placas de 24 cavidades. Se incubó hasta alcanzar el 60-80% de confluencia, aproximadamente 24 h después.
- 2- Se realizó el lavado de las células con 1 ml de medio A. Se prepararon los complejos lípido-ADN, de la siguiente manera: se mezcló el lípido seleccionado con medio A, dejándolo 30 min en reposo a temperatura ambiente para que se formen los liposomas y, por otro lado, se diluyó el ADN con medio A. En el caso de utilizar el reactivo Plus, se realizó su mezcla con el ADN en este momento. Luego se mezclaron las dos soluciones y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente para que se formen los complejos. Se retiró la solución de lavado de los cultivos y se agregaron los complejos, incubando durante 4 h.
- 3- Se retiró el sobrenadante de las placas de cultivo y se agregó 1 ml de medio A suplementado con 5% V/V SFB, incubando durante 24 h.
- 4- Se retiró el sobrenadante de los cultivos y se lavaron las células con 1 ml de PBS. Se fijaron las células con 0,5 ml de la solución fijadora (5% V/V formaldehído en PBS) durante 5 min a temperatura ambiente. Se lavaron las células 2 veces con 1 ml de PBS. Se agregaron 0,5 ml de la solución de sustrato/teñido [20 ml solución de teñido (5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 5 mM $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ y 2 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, en PBS), 1 ml solución sustrato (20 mg/ml X-gal, en dimetilformamida)], preparada en el momento, incubando durante 24 h.
- 5- Se descartó el sobrenadante y se lavaron las células 2 veces con 1 ml de PBS. El porcentaje de células transfectadas se determinó por el recuento de las células totales y azules (transfectadas en forma transitoria con el plásmido pCMV.SPORT- β -gal) en un determinado número de campos.

12.2. Obtención de líneas celulares recombinantes

Con el fin de obtener líneas celulares productoras de rhIFN- β 1a, se efectuó la transfección de las distintas líneas celulares con vectores de expresión, utilizando el método de lipofección. Se ensayaron concentraciones variables de los vectores antes descritos y de los lípidos catiónicos, según los resultados obtenidos durante las experiencias de optimización de las condiciones de lipofección.

A continuación se detallan los ensayos realizados.

- 1- Se plaquearon aproximadamente 1.10^5 cél/ml en 1 ml de medio A suplementado con 5% V/V SFB, en pocillos de placas de

24 cavidades. Se incubó hasta alcanzar el 60-80% de confluencia, aproximadamente 24 h después.

2- Se realizó el lavado de las células con 1 ml de medio A.

Se procedió a la preparación de los complejos lípido-ADN, en medio A, de acuerdo con las concentraciones detalladas en la Tabla II.

Tabla II. Descripción de transfecciones realizadas sobre diferentes líneas celulares con distintos plásmidos de expresión, variando las condiciones de lipofección.

Condición de transfección			Línea celular transfectada
Relación lípido:ADN	Lípido	ADN	
1:2	DOTAP 5,7 µg/ml	pCIneo-IFN-β1 pKG4-IFN-β1 pcDNA-IFN-β1 10 µg/ml	HEK-293
1:1	LipofectAMINE 2000 6,3 µg/ml	pCIneo-IFN-β1 pKG4-IFN-β1 4 µg/ml	CHO.K1
			BHK.21
2:1	LipofectAMINE 2000 12 µg/ml	pCIneo-IFN-β1 pKG4-IFN-β1 6 µg/ml	CHO.K1
			BHK.21
		p91023-IFN-β1 6 µg/ml	COS-7
			CHO dhfr
3:1	DOTAP 17 µg/ml	pCIneo-IFN-β1 pKG4-IFN-β1 6 µg/ml	NS0
			HEK-293
5:1	LipofectAMINE 19 µg/ml y Plus 15 µl/ml	pCIneo-IFN-β1 pKG4-IFN-β1 4 µg/ml	CHO.K1
			BHK.21
6:1	LipofectAMINE 32,2 µg/ml	pCIneo-IFN-β1 pkG4-IFN-β1 5,2 µg/ml	CHO.K1
	LipofectAMINE 25 µg/ml	pCIneo-IFN-β1 pKG4-IFN-β1 4 µg/ml	BHK.21
	LipofectAMINE 16,6 µg/ml	pCIneo-IFN-β1 pkG4-IFN-β1 2,6 µg/ml	CHO.K1
	LipofectAMINE 16 µg/ml y Plus 20 µl/ml	pKG4-IFN-β1 4 µg/ml	BHK.21
8:1	LipofectAMINE 16 µg/ml y Plus 20 µl/ml	pCIneo-IFN-β1 pKG4-IFN-β1 2 µg/ml	COS-7
			CHO.K1
10:1	LipofectAMINE 2000 55,5 µg/ml	pCIneo-IFN-β1 pKG4-IFN-β1 pcDNA-IFN-β1 5,2 µg/ml	CHO.K1
			BHK.21

Las relaciones Lípido : ADN son aproximadas.

Se retiró el sobrenadante de los cultivos y se agregó la mezcla lípido-ADN correspondiente. Una solución sólo con lípido se utilizó como control de la toxicidad del lípido sobre las células y, a partir del día 5, como control de la resistencia natural de las células ante el antibiótico de selección. Se incubó durante 4 h y luego se retiró el sobrenadante, agregando 1 ml de medio A suplementado con 5% V/V SFB, incubando durante 48 h.

En el caso de estar realizando una transfección transiente con células COS-7, pasadas las 48 o 72 h de incubación post-transfección, se retiró el sobrenadante para realizar el *screening*. Paralelamente, las células fueron lisadas con una solución constituida por 0,1 mM PMSF (fluoruro de fenil-metil-sulfonilo), 300 mM sacarosa, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 0,1% V/V Tritón en 50 mM Tris, pH 7,4, removiendo los restos celulares por centrifugación a 1.700 g durante 3 min a 4 °C, conservando la fracción intracelular soluble a -20 °C.

En caso contrario, se continuó con el protocolo.

- 3- Se realizó el recuento celular y se sembraron distintos inóculos (2.000, 20.000 y 100.000 células) en placas de 60 mm de diámetro (Falcon), con el objeto de obtener cultivos en los que las colonias se encuentren suficientemente separadas como para realizar el clonado con anillos. Se incubó durante 24 h.
- 4- Se descartó el sobrenadante de todas las placas y se inició la presión de selección, utilizando medio A suplementado con 5% V/V SFB suplementado con el antibiótico correspondiente.

Se hicieron recambios del medio de cultivo cada 3 ó 4 días, realizando una observación diaria hasta que murieron las células de la placa control.

A continuación, se cosecharon individualmente las colonias de células resistentes por el método de clonado con anillos o, alternativamente, se cosechó la placa completa en el caso en que las colonias no se encontrasen suficientemente aisladas. Se sembraron en una placa de 24 cavidades en dos concentraciones distintas: una mayor en la que se realizó el *screening* de las células productoras de rhIFN-β1a, y una menor en la que se mantuvieron las células hasta conocer el resultado del *screening*.

El *screening* se realizó cuando las células llegaron a confluencia, cambiándoles el medio por medio fresco durante 24 y 48 h, tomando una alícuota del sobrenadante para efectuar el *immunodot*.

12.3. Selección de las células transfectadas

Se determinó la concentración mínima del antibiótico que mata a cada una de las células *wild type*, para realizar la presión de selección que permita la detección de las células transfectadas establemente.

Para ello se sembraron 1.10⁵ cél/ml en 2 ml de medio A suplementado con 5% V/V SFB en placas de 12 pozos, variando la concentración de cada antibiótico

según las indicaciones del fabricante. Se realizaron cambios de medio de cultivo cada 3 días y a los 15 días se determinó, por visualización de los diferentes pozos, la mínima cantidad del antibiótico que resulta deletérea para las células.

Las células que expresan la enzima APH, son aquellas que han sido transfectadas con los plásmidos pCIneo-IFN- β 1 y pKG4-IFN- β 1, que contienen el gen de la neomicina fosfotransferasa. Para seleccionarlas se utiliza el antibiótico genético G-418 Sulfato (Gibco).

Las células que expresan la enzima zeocina, son aquellas que han sido transfectadas con los plásmidos pcDNA-IFN- β 1 y pzc-IFN- β 1, que contienen el gen *sh ble*. Para seleccionarlas se utiliza el antibiótico zeocina (Invitrogen).

12.4. Coamplificación del gen dhfr

El gen de la DHFR es frecuentemente utilizado como un marcador de selección recesivo y para la amplificación génica en células dhfr⁻.

Las células fueron primero seleccionadas para el crecimiento en medio de cultivo IMDM y luego se las presionó con MTX para lograr la coamplificación génica (Sambrook y col., 1989a) adaptándolas gradualmente al crecimiento en concentraciones crecientes de MTX: 10, 100 y 500 nM.

Además se partió de las células adaptadas al crecimiento con 500 nM de MTX y se determinó la máxima concentración de antibiótico que resistían las células, como se describe en la sección 12.3, realizando la presión de selección a esa concentración.

Las células adaptadas al crecimiento en ausencia o con cada una de las concentraciones de MTX ensayadas, fueron criopreservadas para su posterior análisis en cada una de las condiciones de crecimiento.

13. Clonado de las líneas celulares productoras de rhIFN- β 1a

Las líneas celulares transfectadas establemente pueden presentar diferentes niveles de expresión, debido al distinto número de copias y a la integración en un sitio transcripcionalmente más o menos activo. Como resultado de una transfección se obtiene un grupo heterogéneo de células en cuanto a sus propiedades de crecimiento, niveles de expresión y calidad del producto. Por ese motivo, después de transfectar una línea celular se efectúa el clonado del cultivo, obteniendo así descendientes de una misma célula y, por lo tanto, genéticamente iguales.

Hay que destacar, sin embargo, que pueden ocurrir cambios con el tiempo aún en poblaciones clonadas. Estos cambios pueden ser genéticos y así irreversibles, o sólo una respuesta fenotípica a cambios de condiciones que pueden ser controladas o revertidas (Hauser, 1997; Mather, 1991).

13.1. Clonado con anillos

El clonado con anillos se efectúa directamente sobre las placas de 60 mm, cuando las células han formado colonias, de un tamaño adecuado y lo suficientemente separadas como para individualizarlas fácilmente (Freshney, 1994c).

Se examinaron las placas y se marcaron sobre la parte inferior de la placa de Petri aquellas colonias que se deseaba repicar. Se retiró el sobrenadante y se colocó un anillo de plástico (pasado por vaselina, para lograr su adherencia a la placa) sobre la marca que circundaba la colonia elegida, presionándolo para lograr una mejor adhesión. Se adicionaron 50 μ l de una solución de tripsina : EDTA en el interior del pozo creado. Una vez desprendidas las células, se sembró la suspensión en una placa de 24 cavidades en medio suplementado con 5% V/V SFB suplementado con el antibiótico correspondiente.

13.2. Clonado por dilución límite

El clonado por el método de dilución límite (Whitlock y Muller-Sieburg, 1990) consiste en obtener una suspensión celular de manera tal que se encuentre una única célula en un volumen dado de medio de cultivo. El clonado se considera efectivo cuando se observa crecimiento a lo sumo en el 30% de los pozos sembrados con una sola célula.

Se realizaron diluciones de la suspensión celular a clonar con el fin de obtener 0,1, 1 y 10 cél/pocillo, sembrando 200 μ l de suspensión celular en placas de 96 pozos de fondo plano.

Sólo en algunas cavidades, donde se sembraron 0,1 ó 1 cél/pocillo, se observó crecimiento de una colonia, realizando el *screening* de sus producciones por la técnica de *immunodot*.

Los clones que mostraron mayor producción de rhIFN- β 1a se amplificaron sucesivamente y criopreservaron.

14. Comparación de la producción de formas glicosiladas y no glicosiladas de rhIFN- β 1a por diferentes líneas celulares

Es sabido que las moléculas de rhIFN- β 1a producido en diferentes líneas celulares, como las células CHO, células epiteliales de ratón C127, células humanas PC12 y células humanas de adenocarcinoma de pulmón PC8, si bien contienen igual secuencia de aminoácidos, poseen diferentes estructuras de carbohidratos (Utsumi y col., 1989; Kagawa y col., 1988).

Con el fin de determinar si todas las líneas celulares disponibles en el laboratorio producen las mismas proporciones de formas glicosiladas y no glicosiladas de rhIFN- β 1a, se compararon sobrenadantes provenientes de las líneas celulares más productoras utilizando la técnica de *Western blot*.

Además, se trataron 40 μ l de sobrenadante de cultivo en presencia de PNGasa F (BioLabs Inc., Inglaterra) según las indicaciones del fabricante, realizando

posteriormente un ensayo de *Western blot*, para confirmar que las bandas observadas corresponden a formas glicosiladas y no glicosiladas de rhIFN- β 1a.

15. Optimización de las condiciones y procedimientos de cultivo de los clones recombinantes obtenidos

15.1. Adaptación a diferentes condiciones de cultivo

Con el fin de adaptar los clones recombinantes más productores a condiciones de cultivo que permitan su crecimiento con bajas concentraciones de SFB de forma tal de disminuir los costos de producción y facilitar la posterior purificación de la proteína recombinante, se partió de los clones celulares productores CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5, creciéndolos en medio A suplementado con 5% V/V SFB y se les cambió el medio por medio A suplementado con 0,1, 1 o 5% V/V SFB, realizando cambios del medio cada 3 días durante 1 mes. Se realizó el *screening* de las producciones en cada recambio por la técnica de *immunodot* y una vez que los clones se adaptaron al crecimiento en las nuevas condiciones, se criopreservaron.

15.1.1 Estudio del crecimiento, metabolismo celular y producción de rhIFN- β 1a en clones celulares establemente transfectados

Para el estudio del crecimiento y monitoreo celular de los clones productores CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5 adaptados al crecimiento en los diferentes medios, se sembraron placas de 24 cavidades con 5.000 cél/ml en 1 ml de medio A suplementado con 1 o 5% V/V SFB. Cada día, durante 12 días, se hizo el recuento celular y se cosechó el sobrenadante del pocillo correspondiente, con el fin de evaluar algunos parámetros del cultivo, como la concentración de glucosa, lactato, amonio e rhIFN- β 1a.

15.2. Efecto del butirato de sodio

El NaBu ha sido utilizado con células recombinantes CHO para obtener altos niveles de expresión de proteínas recombinantes tales como Ab, eritropoyetina (EPO), activador tisular del plasminógeno (tPA), hormona folículo estimulante (FSH). También se observó que inhibe el crecimiento celular e induce la apoptosis (D'Anna y col., 1980; Palermo y col., 1991; Kim y Lee, 2000; Cheng y col., 2001; Hendrick y col., 2001; Mimura y col., 2001; Sung y col., 2004).

15.2.1. Producción del clon CHO pCI 2A5 1D5 en medio A o SMIF-6 ante la presencia de butirato de sodio

Para evaluar la influencia de diferentes medios de cultivo y/o la presencia de NaBu en la producción del clon CHO pCI 2A5 1D5, se partió de una monocapa de células creciendo en una placa de 6 pozos con medio A suplementado con 5% V/V SFB, y se le cambió el medio por medio A suplementado con 0,1 o

5% V/V SFB o medio SMIF-6, agregándole además, a pozos idénticos, 5 mM NaBu, a partir de una solución 500 mM NaBu (Sigma) conservada a -20 °C.

Se incubó durante 72 h, luego se tomó el sobrenadante y se cuantificó la concentración de rhIFN- β 1a utilizando la técnica de *immunodot*.

15.2.2. Producción de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5 en medio A suplementado con diferentes concentraciones de suero fetal bovino y butirato de sodio

Para determinar las condiciones de máxima producción de rhIFN- β 1a de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5, se realizó un ensayo en el cual se efectuaron combinaciones de diferentes concentraciones de SFB y NaBu.

Se partió de una monocapa de células de cada clon creciendo en placas de 24 cavidades, con medio A suplementado con 5% V/V SFB y se le cambió el medio a cada pozo por medio A suplementado con diferentes cantidades de SFB (sin SFB o 0,1, 0,5, 1 y 2% V/V SFB) y NaBu (sin NaBu o 1, 2, 3 y 5 mM NaBu) (Fig. 14). Durante 8 días, cada 48 h se les reemplazó el medio de cultivo, por el correspondiente medio fresco y se tomó el sobrenadante cuantificando la concentración de rhIFN- β 1a utilizando la técnica de *immunodot*.

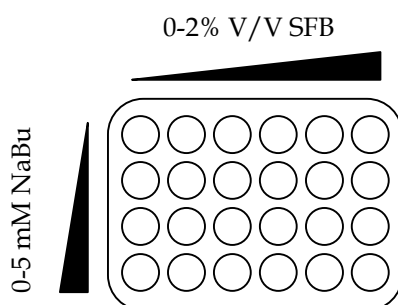


Fig. 14. Esquema de ensayo para optimizar las condiciones de máxima producción de rhIFN- β 1a de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5, en presencia de diferentes concentraciones de SFB y NaBu.

15.3. Efecto del ZnSO₄

Los niveles de ARNm en las células son determinados no sólo por la velocidad de transcripción, sino también por la velocidad de *turnover* del ARNm. Se ha encontrado que el Zn²⁺ tienen un marcado efecto sobre la estabilidad de ARNm que poseen regiones inestabilizantes (Taylor y Blackshear, 1995) similares a las presentes en la secuencia del ARNm de IFN- β 1.

15.3.1. Producción de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5 en presencia de diferentes concentraciones de ZnSO₄

Para determinar si la presencia de ZnSO₄ influía en la producción de rhIFN-β1a de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5, se partió de una monocapa de células de cada clon creciendo en placas de 12 pozos, con medio A suplementado con 5% V/V SFB y se les realizó sucesivos recambios con medio A suplementado con 0,5% V/V SFB y sin ZnSO₄ o 50, 100, 150 y 200 μM ZnSO₄, a partir de una solución 500 mM ZnSO₄ (Sigma) conservada a 4 °C. Durante 3 días, cada 24 h se les cambió el medio de cultivo, por medio fresco y se tomó el sobrenadante cuantificando la concentración de rhIFN-β1a utilizando la técnica de *immunodot*.

15.3.2. Producción de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5 para distintos tiempos de recolección de sobrenadantes

Para determinar si el tiempo en el que se realizaba la recolección de sobrenadantes influía en la producción de rhIFN-β1a de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5, se partió de una monocapa de células de cada clon creciendo en placas de 24 pozos, con medio A suplementado con 5% V/V SFB y se les realizó sucesivos recambios con medio A suplementado con 0,5% V/V SFB y 150 μM ZnSO₄. Durante 2 días, cada 8, 12 o 24 h, se les cambió el medio de cultivo por medio fresco y se tomó el sobrenadante cuantificando la concentración de rhIFN-β1a utilizando la técnica de *immunodot*.

15.4. Efecto conjunto del butirato de sodio y del ZnSO₄

15.4.1. Producción de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5 en presencia de butirato de sodio y diferentes concentraciones de ZnSO₄

Para determinar si la presencia de NaBu y ZnSO₄ influían en forma conjunta en la producción de rhIFN-β1a de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5, se partió de una monocapa de células de cada clon creciendo en placa de 24 pozos, con medio A suplementado con 5% V/V SFB y se realizaron recambios de medio cada 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h por el medio A suplementado con las concentraciones previamente optimizadas de SFB y NaBu para cada clon, y sin ZnSO₄ o 50, 100 y 150 μM ZnSO₄ (Fig.15). A cada tiempo se cambió el medio de cultivo por medio fresco y se tomó el sobrenadante determinando la presencia de rhIFN-β1a, utilizando la técnica de *immunodot* y valoración de la actividad biológica *in vitro*.

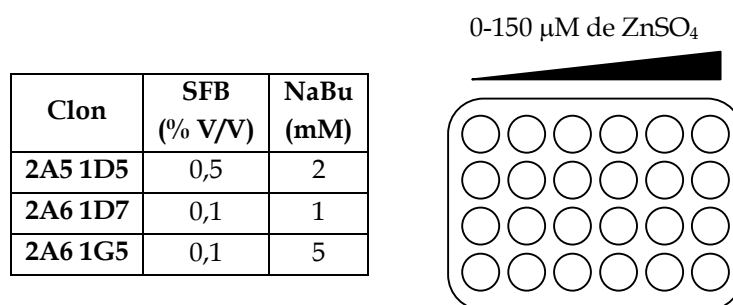


Fig. 15. Esquema de ensayo para optimizar las condiciones de máxima producción de rhIFN- β 1a de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5 con concentraciones optimizadas SFB y NaBu, ante la presencia de distintas cantidades de ZnSO₄.

15.5. Producción del clon CHO pCI 2A5 1D5. Experiencias de pulsos y descansos

Mimura y col. (2001) pudieron mantener el crecimiento de células CHO recombinantes durante un mes en presencia de 2 mM NaBu con cambios de medio cada 24 h.

De igual manera, con el fin de prolongar la producción de rhIFN- β 1a en el tiempo del clon CHO pCI 2A5 1D5, se realizaron experiencias de pulsos en condiciones que podrían resultar deletéreas para las células y descansos en condiciones que resultasen favorables para el crecimiento y mantenimiento celular. Se ensayó agregar diferentes aditivos a los cultivos y variar los tiempos de exposición a ellos al realizar los pulsos y descansos.

15.5.1. Pulsos en presencia de butirato de sodio

Se realizaron experiencias de pulsos en presencia de NaBu y descansos sin este aditivo para determinar si este tipo de cultivo permitía prolongar el tiempo de producción y la vida de las células.

Partiendo de una monocapa de células del clon CHO pCI 2A5 1D5 creciendo en placas de 6 pozos con medio A suplementado con 5% V/V SFB, se realizaron pulsos de 48 h con medio A suplementado con 0,5% V/V SFB y 2 mM NaBu, y descansos de 24 h con medio A suplementado con 1% V/V SFB, en forma alternada durante 14 días. Para cada recambio de medio, se tomó el sobrenadante cuantificando la concentración de rhIFN- β 1a utilizando la técnica de *immunodot*.

15.5.2. Variaciones de la duración de los pulsos y de la concentración de suero fetal bovino durante los descansos

Para tratar de optimizar la duración de los pulsos y la concentración de SFB durante los descansos se realizó la siguiente experiencia.

Se partió de una monocapa de células del clon CHO pCI 2A5 1D5 creciendo en placas de 24 pozos con medio suplementado con 5% V/V SFB, posteriormente se

realizaron pulsos y descansos en las condiciones detalladas en la Tabla III. Durante los 9 días que duró la experiencia, para cada recambio de medio se cuantificó en el sobrenadante la concentración de rhIFN- β 1a utilizando la técnica de *immunodot*.

Tabla III. Diferentes suplementos del medio A utilizados durante los ensayos de pulsos y descansos (15.5.2).

	Duración	Medio	Suplemento		
			SFB (% V/V)	ZnSO ₄ (μ M)	NaBu (mM)
Pulsos	24-48 h	B	0,5		
		C	0,5	50	
		D	0,5		2
		E	0,5	50	2
Descansos	24 h	F	0,1		
		B	0,5		
		G	1		

15.5.3. Variación de la duración de los pulsos y presencia de ZnSO₄ durante los descansos. Evaluación de la adición de glicerol.

El Zn²⁺ llevaría a un incremento en el número de células a través de la estimulación de la división celular y la supresión de la apoptosis (Van Dyk y col., 2003). Se decidió entonces agregar Zn²⁺ con el fin de favorecer el crecimiento y la recuperación celular durante los descansos, luego de realizar pulsos con NaBu.

Por otra parte, se ha reportado que el rhIFN- β 1a, en condiciones fisiológicas, rápidamente forma multímeros inactivos (Utsumi y col., 1989). Teniendo en cuenta que el glicerol estabilizaría las proteínas en el cultivo, disminuyendo las posibilidades de agregación, y, específicamente, que su presencia durante el cultivo de células recombinantes reduciría la agregación de rhIFN- β 1a en un 50 % (Rodríguez y col., 2005), se suplementaron los medios con glicerol durante el cultivo.

Asimismo, con el objeto de mantener la calidad del cultivo celular con una alta producción de proteína recombinante, se analizó la posibilidad de reducir el tiempo de duración de los pulsos, que pudiesen resultar deletéreos para las células, y se tuvieron en cuenta los agregados de los aditivos antes mencionados.

Se partió de una monocapa de células del clon CHO pCI 2A5 1D5 creciendo en placas de 24 pozos con medio A suplementado con 5% V/V SFB. Posteriormente se realizaron pulsos y descansos en las condiciones detalladas en la Tabla IV, en forma alternada durante 7 días. Para cada recambio de medio se realizó un recuento celular y se determinó en el sobrenadante la concentración de rhIFN- β 1a mediante la valoración de la actividad biológica *in vitro*.

En el ensayo en el que se utilizó glicerol, tanto los pulsos como los descansos fueron de 24 h.

Tabla IV. Diferentes suplementos del medio A utilizados durante los ensayos de pulsos y descansos (15.5.3).

	Duración	Medio	Suplemento			
			SFB (% V/V)	ZnSO ₄ (μM)	NaBu (mM)	glicerol (% V/V)
Pulsos	1-6-24 h	B	0,5			
		C	0,5	50		
		D	0,5		2	
		E	0,5	50	2	
		B'	0,5			1
		C'	0,5	50		1
		D'	0,5		2	1
		E'	0,5	50	2	1
Descansos	24 h	G	1			
		F	1	50		
		G'	1			1
		F'	1	50		1

15.5.4. Presencia de rhEPO durante las experiencias de pulsos y descansos en condiciones óptimas

Con el fin de mantener la calidad del cultivo celular con una alta producción de rhIFN-β1a, se realizó una experiencia en la que se agregaron 500 ng/ml de rhEPO (Zelltek S.A., Argentina) durante los pulsos y descansos. La rhEPO actuaría manteniendo la viabilidad de algunos tipos celulares inhibiendo el proceso de apoptosis (Silva y col., 1996; Kumral y col., 2005; Um y Lodish, 2006).

Tabla V. Diferentes suplementos del medio A utilizados durante los ensayos de pulsos y descansos en presencia de rhEPO (15.5.4).

	Duración	Medio	Suplemento			
			SFB (% V/V)	ZnSO ₄ (μM)	NaBu (mM)	rhEPO (ng/ml)
Pulsos	24 h	B	0,5			
		C	0,5	50		
		D	0,5		2	
		E	0,5	50	2	
		B'	0,5			500
		C'	0,5	50		500
		D'	0,5		2	500
		E'	0,5	50	2	500
Descansos	24 h	G	1			

MATERIALES Y MÉTODOS

Se partió de una monocapa de células del clon CHO pCI 2A5 1D5 creciendo en placas de 24 pozos con medio A suplementado con 5% V/V SFB. Posteriormente se realizaron pulsos y descansos en las condiciones detalladas en la Tabla V. Durante cada recambio de medio se realizó un recuento celular y se determinó en el sobrenadante la concentración de rhIFN- β 1a mediante la valoración de la actividad biológica *in vitro*.