

# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**“Compuestos naturales y sintéticos que modulen la actividad biológica de los interferones humanos de tipo I: análisis mediante una nueva herramienta biológica”**

**María de los Milagros Bürgi**

Director de tesis: Ricardo Bertoldo Kratje

Co-director de Tesis: Mariela Bollati Fogolín

Lugar de realización:

Laboratorio de Cultivos Celulares

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Universidad Nacional del Litoral

**-2013-**



**Parte de estos resultados fueron publicados en:**

- **“New reporter cell clones to determine the biological activity of human type I interferons”** Milagros Bürgi, Claudio Prieto, Marcos Oggero, Mariela Bollati-Fogolín, Marina Etcheverrigaray, Ricardo Kratje. En: BMC Proceedings 2011, 5(Suppl 8):P4
- **“WISH cell line: from the antiviral system to a novel reporter gene assay to test the potency of human IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$ ”** María M. Bürgi, Claudio Prieto, Marina Etcheverrigaray, Ricardo Kratje, Marcos R. Oggero, Mariela Bollati-Fogolín. Journal of Immunological Methods, ISSN 0022-1759, (2012) Vol. 381 (1-2): 70-74.

**Parte de estos resultados fueron presentados en:**

- Decimotercer Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral y Cuarto Encuentro de Jóvenes Investigadores de Universidades de Santa Fe. 19-20 de noviembre de 2009. **“EFECTO DE DIFERENTES COMPUESTOS NATURALES Y SINTÉTICOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LOS INTERFERONES DE TIPO I”**, bajo la modalidad de Póster y defensa oral del mismo. Bürgi, M.; Oggero, M.; Bollati-Fogolín, M.; Etcheverrigaray, M.; Kratje, R.
- IV Congreso Argentino de Biotecnología: BIOLATINA 2010 - Bioeconomía e Innovación: Un nuevo Desafío. 18-20 de octubre de 2010. Universidad de la Empresa, Buenos Aires, Argentina. **“VALORACIÓN BIOLÓGICA DE INTERFERONES DE TIPO I: UN ENSAYO ALTERNATIVO”**, bajo la modalidad de póster y defensa oral del mismo. Bürgi, M.; Prieto, C.; Oggero, M.; Bollati-Fogolín, M.; Etcheverrigaray, M.; Kratje, R.
- Cuarto Seminario Latinoamericano de Tecnología de Cultivos de Células (SLATCC). 7- 9 de Noviembre de 2010- Hotel Hermitage, Montevideo, Uruguay. **“DESARROLLO DE UNA NUEVA HERRAMIENTA BIOLÓGICA PARA DETERMINAR LA POTENCIA DE LOS INTERFERONES DE TIPO I”**, bajo la modalidad de póster y defensa oral. Bürgi, M.; Prieto, C.; Oggero, M.; Bollati-Fogolín, M.; Etcheverrigaray, M.; Kratje, R.
- Congreso Internacional 22nd ESACT meeting 2011 in Viena: “Cell Based Technologies”. 15-19 de mayo de 2011 en Viena-Austria. **“A NEW REPORTER CELL CLONE TO DETERMINE THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF TYPE I INTERFERONS”**, bajo la modalidad de póster y defensa oral. Bürgi, M.; Prieto, C.; Oggero, M.; Bollati-Fogolín, M.; Etcheverrigaray, M.; Kratje, R.
- VII Jornadas de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Uruguay. 3-4 de noviembre de 2011. Montevideo, Uruguay. **“NUEVAS LÍNEAS REPORTERAS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS INTERFERONES DE TIPO I”**, bajo la modalidad de póster y defensa oral del mismo. Bürgi, M.; Prieto, C.; Oggero, M.; Bollati-Fogolín, M.; Etcheverrigaray, M.; Kratje, R.

- V Seminario Latinoamericano de Cultivos Celulares (SLATCC 2012) Hotel Los Silos. Santa Fe, Argentina. 25 al 27 de octubre de 2012. **“MONITOREO DE BIBLIOTECAS DE COMPUESTOS QUE MODULEN LA ACTIVIDAD DE LOS INTERFERONES DE TIPO I MEDIANTE EL EMPLEO DE NUEVAS LÍNEAS CELULARES REPORTERAS.”** Presentación formato póster y defensa oral y presentación oral. Bürgi M., Prieto C., Bollati-Fogolín M., Oggero-Eberhardt M., Etcheverrigaray M., Kratje R.
- V Seminario Latinoamericano de Cultivos Celulares (SLATCC 2012) Hotel Los Silos. Santa Fe, Argentina. 25 al 27 de octubre de 2012. **“DESARROLLO DE SISTEMAS REPORTEROS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA POTENCIA DE INTERFERONES DE TIPO I EMPLEANDO DIFERENTES LINAJES CELULARES HUMANOS”.** Presentación formato póster y defensa oral. Bürgi M., Prieto C., Bollati-Fogolín M., Oggero-Eberhardt M., Etcheverrigaray M., Kratje R.
- Muestra “40 años FBCB”. Estación Belgrano. Santa Fe, Argentina. 1º noviembre de 2012. **“A NEW REPORTER CELL CLONE TO DETERMINE THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF TYPE I INTERFERONS”.** Presentación formato póster y defensa oral. Bürgi, M., Prieto, C., Oggero, M., Bollati-Fogolín, M., Etcheverrigaray, M., Kratje, R.
- Muestra “40 años FBCB”. Estación Belgrano. Santa Fe, Argentina. 1º noviembre de 2012. **“MONITOREO DE BIBLIOTECAS DE COMPUESTOS QUE MODULEN LA ACTIVIDAD DE LOS INTERFERONES DE TIPO I MEDIANTE EL EMPLEO DE NUEVAS LÍNEAS CELULARES REPORTERAS.”** Presentación formato póster y defensa oral. Bürgi, M., Prieto, C., Oggero, M., Bollati-Fogolín, M., Etcheverrigaray, M., Kratje, R.
- Muestra “40 años FBCB”. Estación Belgrano. Santa Fe, Argentina. 1º noviembre de 2012. **“DESARROLLO DE SISTEMAS REPORTEROS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA POTENCIA DE INTERFERONES DE TIPO I EMPLEANDO DIFERENTES LINAJES CELULARES HUMANOS”.** Presentación formato póster y defensa oral. Bürgi, M., Prieto, C., Oggero, M., Bollati-Fogolín, M., Etcheverrigaray, M., Kratje, R.
- Congreso Internacional 23rd ESACT meeting 2013 in Lille: “Better cells for better health”. 23-26 de junio de 2013 en Lille-Francia. **“SEARCHING FOR COMPOUNDS THAT MODULATE TYPE I INTERFERON ACTIVITY BY SCREENING LIBRARIES WITH NEW REPORTER CELL LINES”.** Milagros Bürgi, Claudio Prieto, Valentina Porro, Marina Etcheverrigaray, Ricardo Kratje, Mariela Bollati-Fogolín, Marcos Oggero. El trabajo fue presentado bajo la modalidad de póster y defensa oral. Este trabajo fue seleccionado como uno de los 20 mejores trabajos.
- VIII Jornadas de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Uruguay. 12-13 de septiembre de 2013. Montevideo, Uruguay. **“IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS SINTÉTICOS INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL IFN- $\alpha$  HUMANO”**, bajo la modalidad de póster y defensa oral del mismo. Bürgi, M.; Prieto, C.; Porro, V.; Etcheverrigaray, M.; Kratje,

R.; Cabrera, M.; Hernandez, P.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Oggero-Eberhardt, M.; Bollati-Fogolín, M.

- Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB)- 6 y 7 de noviembre de 2013 – Fundación Instituto Leloir – Buenos Aires. **“CHARACTERIZATION OF COMPOUNDS THAT INHIBIT HUMAN INTERFERON- $\alpha$  ACTIVITY USING A NEW REPORTER GENE ASSAY”**, bajo la modalidad de póster y defensa oral del mismo. Bürgi, M.; Prieto, C.; Porro, V.; M.; Etcheverrigaray, M.; Kratje, R.; Cabrera, M.; Hernandez, P.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Oggero-Eberhardt, M.; Bollati-Fogolín, M.
- XII PABMB CONGRESS 2013 PUERTO VARAS CHILE- 9-14 de noviembre de 2013, Puerto Varas-Chile. **“INTERFERON-I ACTIVITY REPORTER CELL LINES TO EXPLORE NATURAL AND SYNTHETIC LIBRARIES DERIVED COMPOUNDS WHICH CAN MODULATE THE CYTOKINE’S POTENCY”**. Presentación formato póster y defensa oral. Bürgi, M., Prieto, C., Etcheverrigaray, M., Kratje, R.; Bollati-Fogolín, M., Oggero, M.

*“Muchas veces, a lo largo de un mismo día, me doy cuenta que mi propia vida y sus logros se han construido gracias al trabajo de las personas que me rodean. También comprendo, con cuanta seriedad debo esforzarme para darles, en correspondencia, tanto como he recibido.”*

*-Albert Einstein*

Es por esto que quiero agradecer a todas aquellas personas que fueron piezas fundamentales de este rompecabezas que hoy terminé de completar con mucha felicidad.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, por ser la cuna de mi formación por darme el espacio y las herramientas para crecer en lo académico y como persona.

A Ricardo y Marina, por creer en mí, dándome la oportunidad nuevamente de formar parte de su maravilloso grupo de trabajo, fiel reflejo del compromiso y responsabilidad que ellos manifiestan diariamente. Gracias por compartir tanta experiencia y conocimientos, y por guiarme, aconsejarme y apoyarme en todo momento, y por todas las oportunidades que generosamente me brindaron.

Claudio, Marcos y Mariela... no tengo palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí, y todo lo que me han enseñado. Gracias infinitas por dirigir con compromiso y dedicación este trabajo, por su aliento constante para caminar cuesta arriba, demostrándome que con esfuerzo, dedicación y empeño todo se puede lograr. Por enseñarme a través del ejemplo a crecer en este camino que elegí, siendo excelentes investigadores pero sobre todas las cosas, extraordinarias personas. Gracias por hacerme sentir en todo momento que fuimos un equipo de trabajo!.

Gise; admiro tu paciencia, dedicación y capacidad para resolver todo tipo de duda, inconvenientes. Gracias por estar dispuesta siempre a ayudar con cariño y buen humor!

Al gran grupo de personitas del LCC: Seba R., Ale, Carlitos, Ceci, Mary, Lore, Vir, Rodri, Kitu, Iván, Nico, Mauri, Lucho, Quique, Victor, Luchi, Pancho, Marcos, Germán, Tito, Gustavo, Norma, Caro, Edu, el Doc, Nacho, Belén B., Laura, Cristian, Regi, Anto, Mili, Fer, Brenda, Fabri, Eva, Ana, Sofi, Vale, Guille, Gise, Cele, Luisi, Ile, Nati, Pao, Diane; por brindarme siempre su ayuda desinteresada, por compartir tantas experiencias y por hacerme sentir como en casa.

A los chicos de la oficina, Moni, Belu, Ale R, Seba, Diego, Guli, Luisi, Ile y Cele, por todas las vivencias compartidas: viajes, mates, buena música y tantas charlas, por la paciencia y el apoyo, simplemente por la compañía de cada día. Especialmente, Gu, Seba, Diego...gracias por sus enseñanzas, por demostrarme que son amigos incondicionales, por estar siempre, por escucharme una y otra vez, brindándome sus consejos, por disfrutar de las alegrías y lindos momentos compartidos, y por ser mi sostén cuando las cosas no salen como uno quiere. Simplemente gracias por ser personitas tan

importantes en mi vida!. Belu, gracias por tu apoyo en este último tiempo, por cuidarme y demostrarme tanto cariño, gracias!

A todos mis amigos, la banda de la facu: Mechi, Ana, Benchi, Pau, Jesi, Ceci, Lisi, Joha, Chino, Ivan, Horas, Emi, Rodri, Ale...y ya van casi 10 años de buenos e inolvidables momentos vividos en su compañía. Gracias por haber sido y continuar siendo personitas tan importantes en este tramo de mi vida!

Lu, Leti F., Leti A, Jo, Juan, mis compañeros de camino! Gracias por tanto camino recorrido juntos y por recordarme a diario con el ejemplo el significado de la palabra amistad!

Colo, Tati, Mica, Barbi, Edu gracias por tantas experiencias compartidas, dentro de ellas nuestras creencias, por su apoyo incondicional y su gran amistad!

A mi familia, uno de los tesoros más preciados que tengo, por su apoyo incondicional, su aliento fortalecedor y su cariño reconfortante, por brindarme todo, por darme la libertad y la enseñanza para ir en busca de mis anhelos sin miedo. Gracias ma por tener siempre las palabras justas para calmarme cuando las cosas no salen como quisiera...y a vos papi, porque las palabras no son tu fuerte, pero si tus abrazos! Quién mejor que ustedes para demostrarme que todo lo que se pretende alcanzar en la vida se puede lograr con esfuerzo y perseverancia. Gracias por impulsarme siempre a seguir luchando por lo que quiero, y por reconocer cada uno de mis esfuerzos. Lore, Sole y Nico, mis hermanitos....gracias por alegrar mis días, por compartir alegrías y lágrimas, por ser cómplices de mis locuras, por estar siempre cerca. Gracias por tanto cariño! Y si, Matu, el tesoro más importante de la familia, ese bichito de luz que llegó para iluminar nuestras vidas. Gracias enanito por llenarme de amor y alegría, por tener esa capacidad de transformar un día de cansancio, en un excelente día.

No puedo dejar de agradecerles a ustedes Abus, porque fueron quienes sembraron sus valores y principios, basándose en el respeto, la justicia, la libertad y fundamentalmente la unión y el amor. Los extraño, pero sé que durante todo este tiempo estuvieron junto a mi guiándome, cuidándome. Gracias!

A todas las personas que de una u otra forma pasaron por mi vida dejándome una enseñanza, compartiendo alegrías, esfuerzos, momentos de diversión; entre ellos Ma. Delia, Uli, Lau y Jesi.

Finalmente a Dios, por guiar mis pasos, por acompañarme a lo largo de mi vida, por darme las fuerzas para superar las pruebas de la vida y por darme tanto para ser feliz.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS.....	14
UNIDADES.....	20
RESUMEN.....	21
SUMMARY.....	23
INTRODUCCIÓN.....	26
1. Las citoquinas como agentes terapéuticos.....	26
2. Interferones.....	27
3. Clasificación y nomenclatura de los interferones.....	29
4. Inducción, producción y mecanismo de acción de los IFNs-I.....	31
5. Receptores de interferón.....	31
6. Transducción de la señal.....	32
7. Acciones biológicas de los interferones de tipo I.....	33
7.1. Actividad antiviral.....	33
7.1.1. Proteína Mx.....	36
7.2. Acción inmunomoduladora.....	37
7.3. Acción antiproliferativa.....	37
8. Uso clínico de los interferones $\alpha$ y $\beta$ : ventajas y desventajas.....	38
8.1. Efectos adversos de los IFNs-I.....	39
8.2. Posibles soluciones a los efectos adversos generados en los tratamientos con IFNs-I.....	40
9. Ensayos biológicos para determinar la potencia de los IFNs-I.....	38
9.1. Ensayo de actividad antiviral (AVA).....	41
9.2. Bioinmunoensayos.....	43
9.3. Ensayos reporteros.....	44
9.3.1. Sistemas de genes reporteros.....	46
10. <i>High throughput screening (HTS)</i> .....	48
10.1. Desarrollo de un ensayo para HTS.....	49
10.2. Estadística aplicada al análisis de datos en HTS.....	50
10.3. Uso de bibliotecas de compuestos.....	54
OBJETIVO GENERAL.....	56
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	57

MATERIALES Y MÉTODOS .....	59
1. Reactivos y soluciones .....	60
2. Medios de cultivo .....	60
2.1. Para células de mamíferos .....	60
2.2. Para cepas bacterianas .....	61
3. Líneas celulares, cepas bacterianas y cepas virales.....	61
4. Sistemas de cultivo de células .....	63
5. Determinación de la concentración de células viables, muertas y totales ...	64
6. Criopreservación de líneas celulares de mamífero .....	65
7. Criopreservación de cepas bacterianas .....	66
8. Revitalización de líneas celulares de mamífero .....	66
9. Revitalización de cepas bacterianas.....	66
10. Construcción de vectores para expresión en células eucariotas conteniendo el promotor Mx2, inducible por IFNs-I (IFNs-I), dirigiendo la expresión de la proteína verde fluorescente (EGFP) .....	67
10.1. Técnicas de biología molecular para clonado .....	67
10.1.1. Preparación de células de <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ F'1q competentes .....	67
10.1.2. Transformación de células competentes.....	68
10.1.3. Preparación de ADN plasmídico .....	68
10.1.3.1. Minipreparación de ADN plasmídico.....	69
10.1.3.2. Maxipreparación de ADN plasmídico.....	70
10.1.4. Determinación de la concentración y pureza del ADN .....	71
10.1.5. Digestiones enzimáticas .....	72
10.1.6. Electroforesis en geles de agarosa.....	72
10.1.7. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa.....	73
10.1.8. Estrategia diseñada para la generación del vector de expresión pMx2/EGFP.....	73
10.1.8.1. Esquema y descripción del plásmido de expresión pEGFP-C1 .....	73
10.1.8.2. Obtención de la secuencia codificante del promotor Mx2 .....	75
10.1.8.3. Clonado del promotor Mx2 en el vector pEGFP-C1 para obtener el vector de expresión pMx2/EGFP.....	75
11. Transfección de células eucariotas.....	79

11.1.	Transfección transitoria de células eucariotas para el análisis del funcionamiento del vector de expresión generado.....	81
11.2.	Obtención de líneas celulares reporteras en forma estable .....	81
12.	Clonado de las líneas celulares recombinantes generadas .....	82
13.	Métodos de valoración de la actividad biológica <i>in vitro</i> de los rhIFNs-I.....	84
13.1.	Valoración de la actividad biológica antiviral .....	84
13.2.	Valoración de la actividad biológica antiproliferativa .....	86
14.	Desarrollo de un nuevo ensayo de gen reportero para cuantificar la potencia de los rhIFNs-I.....	89
15.	Validación del ensayo de gen reportero desarrollado .....	92
15.1.	Optimización del ensayo de gen reportero desarrollado .....	92
15.2.	Evaluación de la especificidad del promotor Mx2 por los IFNs-I .....	92
15.3.	Evaluación de la estabilidad del clon reportero WISH-Mx2/EGFP L1G3.....	93
15.4.	Cuantificación de la potencia de rhIFN empleando el sistema de gen reportero y el modelo AVA.....	93
15.5.	Estudio <i>in vivo</i> de la expresión de EGFP en células A549-Mx2/EGFP.....	94
16.	Monitoreo de bibliotecas de compuestos, potencialmente moduladores de la actividad de los IFNs-I. Análisis mediado por el ensayo de gen reportero.....	95
16.1.	Monitoreo de una biblioteca de 176 compuestos naturales cedida por el Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung (HZI), Braunschweig, Alemania (HZI Nat).....	96
16.2.	Monitoreo de una biblioteca de 288 compuestos sintéticos cedida por el Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung (HZI), Braunschweig, Alemania (HZI Sint).....	96
16.3.	Monitoreo de una biblioteca de 88 compuestos sintéticos cedida por la Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay (QuiMed- FCien).....	97
16.4.	Selección de compuestos respondedores .....	97
16.5.	Caracterización de los compuestos seleccionados.....	98
16.5.1.	Evaluación de la toxicidad .....	98
16.5.2.	Evaluación de la dosis efectiva .....	101

16.5.3.	Análisis del efecto de los compuestos seleccionados sobre la línea NIH3T3S1CS2YIRF7mCherry mediante microscopía de fluorescencia ....	101
16.5.4.	Análisis del efecto residual de los compuestos sobre el cultivo celular para modular la actividad de los IFNs- I.....	103
16.5.5.	Análisis de la reversión de la activación de los IFNs-I por parte de los compuestos .....	104
16.5.6.	Valoración de la AVA empleando las líneas celulares reporteras para evaluar el efecto de los compuestos seleccionados.....	105
16.5.7.	Análisis del efecto de los compuestos sobre la actividad antiproliferativa (AA) de los IFNs-I .....	106
16.5.8.	Estudio de las fases del ciclo celular de células WISH-Mx2/EGFP y HeLa-Mx2/EGFP tratadas con los compuestos seleccionados desde las bibliotecas de compuestos naturales y sintéticos. ....	107
16.5.9.	Análisis de compuestos potencialmente inductores de apoptosis mediante microscopía de fluorescencia .....	109
16.6.	Evaluación del efecto combinado de compuestos sintéticos provenientes de la biblioteca de QuiMed- FCien sobre la actividad del IFN- $\alpha$ 2a.....	110
16.6.1.	Evaluación de la citotoxicidad de las combinaciones de compuestos .....	112
16.6.2.	Evaluación del efecto combinado de compuestos sintéticos provenientes de la biblioteca QuiMed- FCien sobre la actividad del IFN- $\alpha$ 2a, evaluado por ensayo de AVA.....	112
16.6.3.	Evaluación del efecto combinado de compuestos sintéticos provenientes de la biblioteca QuiMed- FCien sobre la actividad del IFN- $\alpha$ 2a, evaluado por ensayo AA.....	112
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>		<b>113</b>
1.	Obtención del vector de expresión pMx2/EGFP-C1.....	114
2.	Transfección transitoria de células eucariotas para el análisis del funcionamiento del vector de expresión generado.....	119
3.	Generación de líneas celulares reporteras que expresen en forma estable la construcción Mx2/EGFP .....	121
4.	Evaluación mediante citometría de flujo de las líneas celulares humanas reporteras generadas .....	122
5.	Desarrollo de un nuevo ensayo de gen reportero para cuantificar la potencia de los rhIFNs-I.....	126
6.	Validación del ensayo de gen reportero desarrollado .....	129

6.1.	Optimización del EGR desarrollado .....	129
6.1.1.	Estudio de la expresión de EGFP en células A549-Mx2/EGFP .....	131
6.2.	Evaluación de la especificidad del promotor Mx2 por los IFNs-I .....	134
6.3.	Evaluación de la estabilidad del clon WISH-Mx2/EGFP L1G3 .....	135
6.4.	Evaluación de la reproducibilidad del nuevo EGR. Comparación con el sistema AVA .....	136
7.	Monitoreo de bibliotecas de compuestos, potencialmente moduladores de la actividad de los IFNs-I. Análisis mediante EGR. ....	137
7.1.	Monitoreo de una biblioteca de 176 compuestos naturales (HZI Nat) cedida por el Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung (HZI) (Braunschweig, Alemania).....	142
7.2.	Monitoreo de una biblioteca de 288 compuestos sintéticos (HZI Sint) cedida por el Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung (HZI) (Braunschweig, Alemania).....	147
7.3.	Monitoreo de una biblioteca de 88 compuestos sintéticos (QuiMed-FCien) cedida por el Grupo de Química Medicinal de la Facultad de Ciencias (Montevideo, Uruguay) .....	151
7.4.	Selección de compuestos respondedores. ....	152
7.5.	Caracterización de los compuestos seleccionados.....	154
7.5.1.	Evaluación de la toxicidad y la dosis efectiva.....	155
7.5.2.	Análisis del efecto de los compuestos seleccionados de la biblioteca HZI Nat, sobre la línea NIH3T3S1CS2YIRF7mCherry mediante microscopía de fluorescencia. ....	159
7.5.3.	Análisis del efecto residual de los compuestos sobre la actividad de los IFNs-I .....	169
7.5.4.	Análisis de la reversión de la activación de los IFNs-I por parte de los compuestos. ....	173
7.5.5.	Análisis del comportamiento de los compuestos seleccionados, al combinar ambos efectos: residual y reversión de la vía de activación de los IFNs-I .....	176
7.5.6.	Valoración de la AVA empleando las líneas celulares reporteras para evaluar el efecto de los compuestos seleccionados.....	180

7.5.7.	Análisis del efecto de los compuestos sobre la AA de los IFNs-I. ....	185
7.5.8.	Estudio de las fases del ciclo celular de células WISH-Mx2/EGFP y HeLa-Mx2/EGFP tratadas con los compuestos seleccionados desde las bibliotecas de compuestos naturales y sintéticos.....	190
7.5.9.	Evaluación de la apoptosis inducida por los compuestos mediante microscopía de fluorescencia .....	205
7.6.	Evaluación del efecto combinado de compuestos sintéticos provenientes de la biblioteca QuiMed- FCien sobre la actividad del hIFN- $\alpha$ 2a.....	212
7.6.1.	Comparación de los ensayos EGR, AVA y AA para evaluar la acción moduladora de las combinaciones de compuestos sobre la actividad del rhIFN- $\alpha$ 2a .....	215
<b>CONCLUSIONES</b> .....		<b>219</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....		<b>231</b>

**ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS**

$\alpha$	alpha
$\beta$	beta
$\gamma$	gamma
$\delta$	delta
$\epsilon$	epsilon
$\kappa$	kappa
$\lambda$	lambda
$\mu$	micro
$\tau$	tau

**A**

A549	Línea celular de cáncer de pulmón
AA	Actividad antiproliferativa
ABAC	Asociación Banco Argentino de Células
AB	Actividad biológica
ABE	Actividad biológica específica
Abs	Absorbancia
ADAR1	Adenosina deaminasa 1
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
Amp <sup>R</sup>	Resistencia a ampicilina
ANOVA	Análisis de la varianza
AP	Fosfatasa alcalina- <i>Alkaline phosphatase</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNdc	Ácido ribonucleico doble copia
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AVA	Ensayo de actividad antiviral- <i>Antiviral activity assay</i>

**B**

BAC	Cromosoma artificial bacteriano- <i>Bacterial artificial chromosome</i>
$\beta$ -gal	Beta galactosidasa
BSA	Seroalbúmina bovina

**C**

CAT	Cloranfenicol acetiltransferasa
-----	---------------------------------

Cél	Células
CF	Citometría de flujo
CFP	Proteína cian fluorescente- <i>Cyan fluorescence protein</i>
CLT	Concentración límite tóxica
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CMV	Citomegalovirus
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
col.	Colaboradores
CV	Coefficiente de variación
C-	Control negativo
C+	Control positivo
CC-	Control negativo de compuesto
<b>D</b>	
DE	Dosis efectiva
D-MEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH</i>
dsRNA	Ácido ribonucleico doble cadena- <i>doble strain ribonucleic acid</i>
<b>E</b>	
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético
EGFP	Proteína de fluorescencia verde incrementada - <i>Enhanced green fluorescence protein</i>
EGR	Ensayo de gen reportero
eIF2	Factor de iniciación de la transcripción
<b>F</b>	
Fc	Fragmento constante de las inmunoglobulinas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fig.	Figura
FSC	<i>Fordward scatter</i>
FV	Flavonas

**G**

G418	aminoglycosid-2'-deoxystreptin
GFP	Proteína de fluorescencia verde- <b>Green fluorescence protein</b>
GH	Hormona de crecimiento- <b>Growth hormone</b>
GTPAsa	Proteína kinasa de GTP
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos- <b>Granulocyte colony stimulating factor</b>
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos- <b>Granulocyte and macrofage colony stimulate factor</b>
GUS	Glucoronidasa

**H**

hGH	Hormona de crecimiento humana
hIFNs	Interferones humanos
HTS	Monitoreo de alto rendimiento- <b>High throughput screening</b>
HZI	Instituto de investigación <i>Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung</i>
HZI Nat	Biblioteca de compuestos naturales del <i>Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung</i> (Braunschweig, Alemania)
HZI Sint	Biblioteca de compuestos sintéticos del <i>Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung</i> (Braunschweig, Alemania)

**I**

IFN	Interferón
IFNs	Interferones
IFNs-I	Interferones tipo I
IFN- $\alpha$	Interferón alfa
IFN- $\beta$	Interferón beta
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IFN- $\omega$	Interferón omega
IFN- $\delta$	Interferón sigma
IFN- $\tau$	Interferón tau
IFNAR	Receptores de interferón
IFNAR1	Receptor de interferón- subunidad tipo 1
IFNAR2	Receptor de interferón- subunidad tipo 2
IL	Interleuquina
IL-1	Interleuquina 1
IL-2	Interleuquina 2

IL-4	Interleuquina 4
IL-5	Interleuquina 5
IL-6	Interleuquina 6
IL-10	Interleuquina 10
IL-12	Interleuquina 12
IP	Ioduro de propidio
IPMont	Instituto Pasteur de Montevideo
IRFs	Factores de respuesta a interferón
IRF7	Factor 7 de respuesta a interferón
IRF9	Factor 9 de respuesta a interferón
ISGs	Genes estimulados por interferón
ISRE	Elemento de respuesta estimulado por interferón
<b>J</b>	
Jak1	Proteína kinasa <i>Janus-1</i>
<b>K</b>	
Kn	Kanamicina
<b>L</b>	
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
LPS	Lipopolisacárido
Luc	Luciferasa
LTS	Monitoreo de bajo rendimiento- <i>Low throughput screening</i>
$\lambda$	Longitud de onda
<b>M</b>	
MM	Masa molecular
mCherry	Proteína <i>cherry</i> monomérica (proteína de fluorescencia roja)
MDBK	<i>Madin-Darbin Bovine Kidney</i>
MEM	Medio esencial mínimo
mIFN	Interferón murino_ <i>murine interferon</i>
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxi-fenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolium)
Mx	Proteína de resistencia a <i>Myxovirus</i>
Mx2	Promotor del gen de resistencia a <i>Myxovirus</i> murino 2

MxA	Promotor del gen de resistencia a <i>Myxovirus</i> humano A
MxB	Promotor del gen de resistencia a <i>Myxovirus</i> humano B
<b>N</b>	
n/d	No detectable
ND	No determinado
NE	No estudiado por alteraciones evidenciadas en el ensayo
N <sub>2</sub>	Nitrógeno
Neo <sup>R</sup>	Resistencia a neomicina
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
NK	Células asesinas humanas - <i>Natural killer</i>
NT	No tóxico
<b>O</b>	
OAS	2' - 5' oligoadenilato sintetasa
ORF	Marco abierto de lectura – <i>Open reading frame</i>
<b>P</b>	
P	Promedio
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos
pb	Pares de bases
PBS	Solución salina de fosfatos
PEG	Polietilenglicol
PFA	Paraformaldehído
PI	Pos-inducción
PKR	<i>Protein kinasa</i>
PMS	Metasulfato de fenazina
PRR	Receptor de reconocimiento de patógenos
<b>Q</b>	
QuiMed-FCien	Biblioteca del Grupo de <b>Química Medicinal</b> – Facultad de <b>Ciencias</b> – Universidad de la República (Montevideo, Uruguay)
<b>R</b>	
rhIFN	Interferón recombinante humano
RFP	Proteína de fluorescencia roja - <i>Red fluorescence protein</i>
RGA	Ensayo de gen reportero - <i>Reporter gene assay</i>

**S**

SCC	<i>Side scatter</i>
SD	Desviación estándar
SEAP	Fosfatasa alcalina secretable- <b><i>Secreted alkaline phosphatase</i></b>
SEM	Error estándar de la media
SES	Sin efecto significativo
SFB	Suero fetal bovino
SOCs	Proteínas inhibidoras de la señalización de citoquinas
SR	Sistema reportero
STAT	Proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción
SV40	Virus símico 40

**T**

TGF- $\alpha$	Factor transformante de crecimiento $\alpha$ - <b><i>Transforming growth factor <math>\alpha</math></i></b>
TGF- $\beta$	Factor transformante de crecimiento $\beta$ - <b><i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i></b>
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TNF	Factor de necrosis tumoral- <b><i>Tumor necrosis factor</i></b>
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$ - <b><i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i></b>
TNF- $\beta$	Factor de necrosis tumoral $\beta$ - <b><i>Tumor necrosis factor <math>\beta</math></i></b>
Tyk2	Tirosin-quinasa-2
Tween 20	Polisorbato 20

**V**

VSV	Virus de la estomatitis vesicular
V+I	Vector + Inserto
V <sub>R</sub>	Vector religado
Vs	versus

**W**

wt	<i>wild type</i>
----	------------------

**X**

X	Concentración de células
X <sub>M</sub>	Concentración de células muertas
X <sub>T</sub>	Concentración de células totales

$X_v$  Concentración de células vivas

## Y

YFP Proteína de fluorescencia amarilla - *Yellow fluorescence protein*

## UNIDADES

cm	centímetro
mm	milímetro
$\mu\text{m}$	micrómetro
nm	nanómetro
$\text{cm}^2$	centímetro cuadrado
kg	kilogramo
g	gramo
mg	miligramo
$\mu\text{g}$	microgramo
ng	nanogramo
l	litro
ml	mililitro
$\mu\text{l}$	microlitro
h	hora
min	minuto
s	segundo
M	molar
mM	milimolar
$\mu\text{M}$	micromolar
nmol	nanomol
UA	unidades arbitrarias
UI	unidades internacionales
kDa	kilodalton
rpm	revoluciones por minuto
V	voltio
W	vatio
% (V/V)	mililitros de solvente en 100 ml de solución
% (P/V)	gramos de soluto en 100 ml de solución
A	amperio
$^{\circ}\text{C}$	grado Celsius

## RESUMEN

Los interferones (IFNs) constituyen una familia de glicoproteínas especie-específica que cumplen un rol muy importante en la primera barrera de defensa del organismo contra las infecciones virales. Estas proteínas son producidas por cada individuo para actuar en forma local y tienen actividad antiviral, antiproliferativa, antitumoral e inmunomoduladora. Son ampliamente utilizados como biofármacos para el tratamiento de diversas patologías, administrándolos de forma exógena. Es por esto que su potencia debe ser correctamente valorada. Habitualmente, la actividad biológica de dichas moléculas se cuantifica mediante un bioensayo, basado en la capacidad de los IFNs para inducir un estado antiviral en las células *target*, frente a la infección viral con el virus de la estomatitis vesicular (VSV). Sin embargo, este tipo de ensayos presentan grandes variaciones intra- e inter-ensayos y requieren del empleo y manipulación de virus.

En el presente trabajo de tesis se generó un ensayo de gen reportero (EGR) basado en líneas celulares reporteras Mx2/EGFP para determinar la actividad de los hIFNs-I. Cuatro líneas celulares provenientes de diferentes linajes celulares (WISH, A549, HeLa y HEp-2) fueron transfectadas en forma estable con el plásmido pMx2/EGFP. Este vector contiene el gen de la proteína reportera de fluorescencia verde (GFP) bajo el control del promotor Mx2, inducible específicamente por IFNs-I. De esta forma, cuando el IFN se une a sus receptores en la superficie celular, se desencadena una cascada de señalización/activación que concluye con la activación del promotor Mx2 en el núcleo. Como resultado, se expresa la EGFP que es cuantificada mediante citometría de flujo. De esta forma, el porcentaje de células verdes positivas se correlaciona directamente con la cantidad de IFN presente en la muestra.

Este ensayo presenta la ventaja de emplear líneas celulares frecuentemente utilizadas para determinar la potencia de los hIFNs, tal es el caso de la línea WISH, simultáneamente con el uso de un gen reportero muy sensible, el EGFP. Además, cuenta con numerosas ventajas comparado con el ensayo de actividad antiviral y otros ensayos de genes reporteros, ya que es capaz de determinar la potencia de hIFN- $\alpha$  y hIFN- $\beta$  usando una única línea celular, obteniendo la máxima expresión de EGFP a las 24 h. Debido a la especificidad del promotor Mx2, sólo se observa expresión de la proteína reportera sobre aquellas células tratadas con hIFNs-I. Es un ensayo sensible y representa una alternativa segura al ser comparado con los ensayos antivirales convencionales. Presenta coeficientes de variación (CV) intra- e inter-ensayos inferiores al 20%, demostrando su buena reproducibilidad. En conclusión, se ha

logrado desarrollar un ensayo reportero alternativo para el análisis de los hIFNs-I, cuya *performance* lo convierte en un candidato adecuado para reemplazar o complementar los bioensayos habituales.

Si bien los hIFNs-I son ampliamente utilizados como biofármacos, éstos son rápidamente depurados del organismo, lo que implica el uso de elevadas y reiteradas dosis. Asimismo, se han registrado efectos secundarios adversos en algunos tratamientos, que en muchos casos conducen a la interrupción de los mismos. Por otra parte, se ha indicado la existencia de patologías en las cuales se observa una liberación excesiva de IFN endógeno, generando efectos nocivos para el organismo.

Como consecuencia, el IFN se presenta como una molécula central cuyo accionar debe regularse para evitar los inconvenientes clínicos mencionados. En este sentido, es indispensable incrementar su eficacia terapéutica en aquel grupo de patologías que requieran de su administración exógena y, por otro lado, bloquear sus efectos nocivos en aquel conjunto de enfermedades en las que la producción de IFN endógeno constituye parte de la etiología o curso de las mismas. En consecuencia, se ha propuesto la identificación y caracterización de nuevas moléculas, que actúen en forma sinérgica o antagónica con la actividad de los IFNs-I.

El monitoreo del efecto de diferentes compuestos sobre la actividad biológica de los IFNs requiere de métodos versátiles, sencillos, robustos y que contribuyan con una elevada velocidad de procesamiento. Por lo tanto, contar con un ensayo biológico basado en una línea celular que responda a hIFNs-I y que exhiba tales características es trascendental para el cumplimiento del objetivo propuesto.

Con ese fin, en una segunda etapa de este trabajo de tesis, se emplearon las líneas celulares reporteras para monitorear 552 compuestos provenientes de bibliotecas de compuestos naturales y sintéticos, en presencia de rhIFN- $\alpha$ 2a o rhIFN- $\beta$ 1a mediante el ensayo de gen reportero desarrollado. Utilizando este sistema pudieron identificarse 20 compuestos sintéticos inhibidores de la actividad de los hIFNs-I y 5 compuestos naturales, 4 de ellos inhibidores y 1 potenciador de los hIFNs-I. Todos ellos fueron estudiados con el fin de validar el nuevo ensayo.

En conclusión, en este trabajo de tesis se logró desarrollar 4 líneas celulares reporteras capaces de cuantificar la actividad de los hIFNs-I, que fueron posteriormente utilizadas como herramientas biológicas para monitorear bibliotecas de compuestos sintéticos y naturales como posibles moduladores de la actividad de los hIFN-I.

## SUMMARY

Interferons (IFNs) are a species-specific glycoprotein family which plays a very important role against viral infection in the organism first line of defense. These proteins are produced by each individual to act in local mode and they have antiviral, antiproliferative, antitumoral and immunomodulatory activities. They are widely used as biopharmaceuticals for some pathology treatments. Because of that, their potency must be correctly quantified. Commonly, their biological activity is quantified by bioassays, based on the capacity of IFNs to induce an antiviral state in the target cells when they are infected with VSV virus. However, these assays have high intra and inter assay variations and they involve virus manipulation.

In this work, a new reporter gene assay (RGA) was developed using Mx2/EGFP reporter cell lines to determine the hIFNs-I potency. Four reporter cell lines from different cellular lineage: WISH, A549, HeLa, and HEp-2 were stably transfected with pMx2/EGFP plasmid. This vector has the reporter green fluorescence protein gene under the Mx2 promoter, which is specifically inducible by type I IFNs. When type I IFNs bind to their receptors in the cellular surface, an activation/phosphorylation pathway starts and it concludes in the nucleus with Mx2 promoter activation. As a result, the expressed EGFP is quantified by flow cytometry. The positive green cells percentage is directly correlated with the IFN quantity in the sample.

This assay has the advantage of using cell lines commonly employed to determine the hIFNs potency, such as the WISH cell line, in combination with the use of an extremely sensitive reporter gene: EGFP.

Furthermore, RGA has many of advantages when compared with the antiviral activity assay and other reporter gene assays: it is possible to determine both hIFN- $\alpha$  and hIFN- $\beta$  potency by using only one cell line, with the maximum EGFP expression at 24 h after IFN incubation. Because of the Mx2 promoter specificity, it is possible to register EGFP expression in cells treated with hIFN-s. It is a sensitive assay and it represents a safe alternative when compared with conventional antiviral assays. RGA has intra and inter CVs lower than 20% demonstrating, consequently, its reproducibility. In conclusion, an alternative assay to analyze hIFNs-I potency has been developed and this performance makes it an appropriate candidate to replace or to complement the assays habitually employed with this purpose.

On the other hand, hIFNs-I are widely used as biopharmaceuticals even though they are quickly depurated from the organism, and as a consequence, it is necessary to use high and repeated doses. Also, certain side effects have been registered in some treatments, and in such cases it is necessary to conclude them. Otherwise, in

some pathologies it is possible to detect an excessive endogenous IFN release, with registered adverse effects.

As a consequence, IFN is presented as a central molecule whose activity must be regulated to avoid the clinical mentioned drawbacks. In this way, it is essential to increase its therapeutic efficacy in those pathologies where exogenous IFN administration is necessary and, on the other hand, to block its harmful effect on those illnesses where the endogenous IFN production constitutes a part of etiology. As a consequence, it has been proposed the identification and characterization of new molecules that act synergistically or antagonistically as regards IFNs-I activity.

The screening of the different compound effect on IFNs biological activity require versatile, easy, robust methods with high speed processing. Therefore, it is fundamental to have a biological assay based on cell lines that respond to hIFNs-I and that show those characteristics in order to reach the proposed objective.

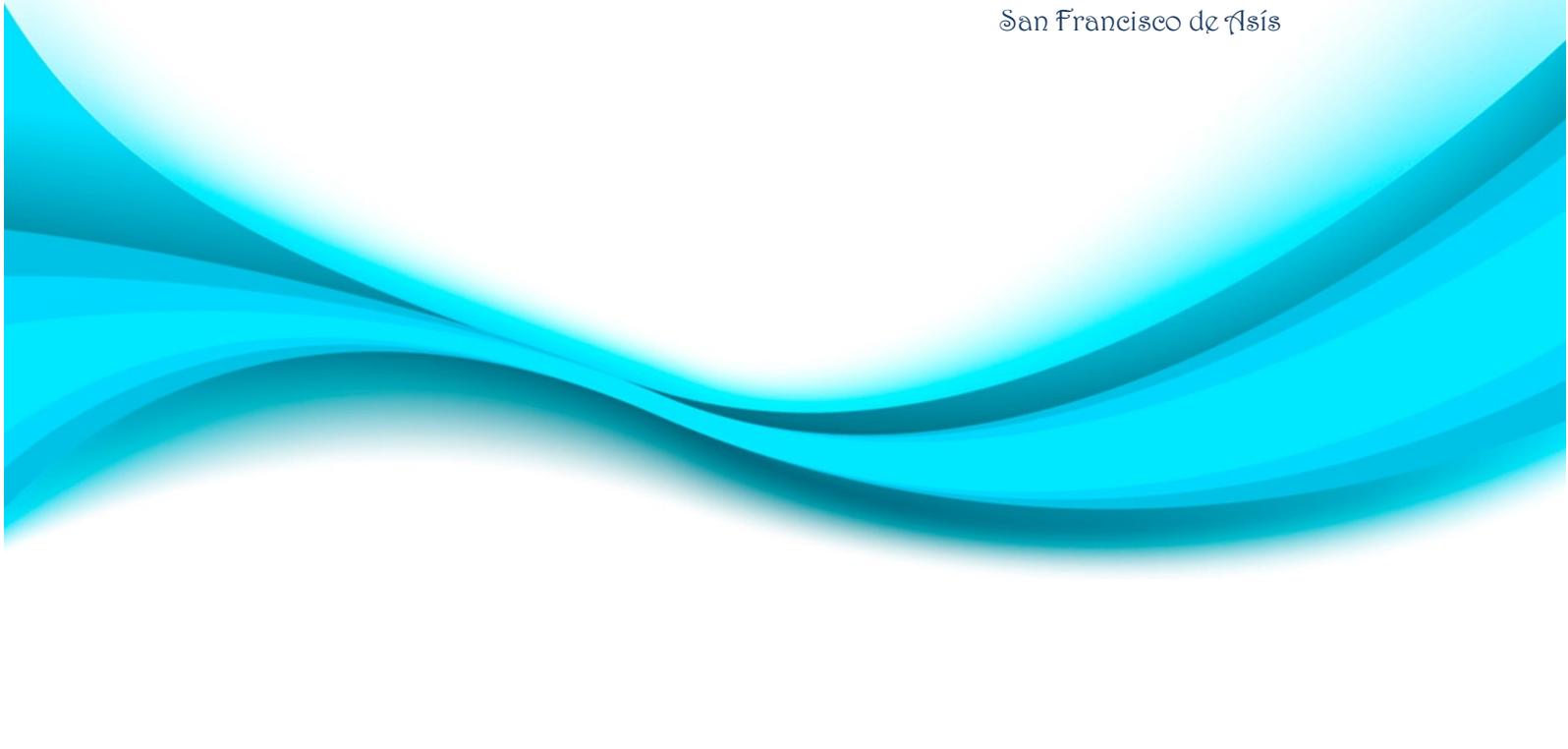
In the second stage of this thesis, reporter cell lines were employed to screen 552 compounds from natural and synthetic libraries. They were analyzed in presence of rhIFN- $\alpha$ 2a and rhIFN- $\beta$ 1a using the reporter gene assay previously developed. This system allowed the identification of 20 synthetic compounds that inhibit the hIFNs-I activity and 5 natural compounds, 4 of them are inhibitors and 1 of them is an enhancer of hIFNs-I activity. All of them were analyzed with the purpose of validating our new reporter gene assay.

In conclusion, in this work 4 reporter cell lines, capable of quantifying the IFNs-I activity were achieved. They were used as biological tools to screen natural and synthetic libraries compounds, possible modulators of hIFN-I activity.

# INTRODUCCIÓN

“Empieza por hacer lo necesario, luego haz lo posible y de pronto estarás logrando lo imposible”

San Francisco de Asís



## INTRODUCCIÓN

### **1. Las citoquinas como agentes terapéuticos**

Las citoquinas son proteínas señalizadoras extracelulares de baja masa molecular, esenciales para la comunicación entre células. Son producidas en forma transitoria por la mayoría de los tipos celulares y actúan mediante su unión a un receptor específico, presente en la membrana plasmática celular, induciendo diferentes caminos de transducción de señales que conducen a la activación de los mecanismos efectores dentro de las células respondedoras. La señalización mediante citoquinas juega un rol importante tanto en condiciones fisiológicas normales como en presencia de numerosas patologías. La mayoría de las citoquinas posee actividad pleiotrópica y son esenciales en el desarrollo prenatal y la maduración postnatal, las respuestas inflamatorias e inmunes y el mantenimiento y reparación de los tejidos (Rachmawati y col., 2004).

En condiciones fisiológicas, las citoquinas no están presentes en el organismo en cantidades significativas; sin embargo, son fácilmente inducidas y rápidamente degradadas durante las respuestas inflamatorias e inmunes. Numerosas citoquinas pueden participar en un mismo proceso. Una única citoquina puede poseer múltiples funciones y varias citoquinas pueden compartir una misma función. La exposición concurrente de las células a más de una citoquina puede llevar a efectos biológicos aditivos, sinérgicos o antagonistas (Xing y Wang, 2000). Se conoce una gran cantidad de citoquinas y factores de crecimiento, los cuales se agrupan según sus similitudes estructurales e incluyen los interferones (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , entre otros), las interleuquinas (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, entre otras), los factores estimulantes de colonias (factor estimulante de colonias de granulocitos, G-CSF; factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, GM-CSF), los factores de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ) y los factores de crecimiento transformante (TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ). La capacidad de las citoquinas para regular un amplio número de funciones celulares ha estimulado la investigación acerca de su potencial como agentes terapéuticos. Dado que las mismas participan en múltiples procesos fisiológicos, no es sorprendente que se encuentren involucradas en la patogénesis de muchas enfermedades. Numerosas patologías han sido atribuidas a la ausencia o sobreexpresión de una determinada citoquina o su receptor, lo que ha abierto la posibilidad de un tratamiento terapéutico más racional de las mismas (Mire-Sluis, 1999). En consecuencia, en las últimas décadas se han identificado y clonado más de 150 citoquinas y factores de

crecimiento, muchos de los cuales aún no han sido completamente caracterizados. La tecnología de ADN recombinante ha permitido el clonado y la producción masiva de citoquinas que se utilizan para diferentes aplicaciones clínicas.

Entre las aplicaciones clínicas más comunes de las citoquinas y de los factores de crecimiento se encuentran el tratamiento de cáncer (para lo cual se emplean citoquinas capaces de controlar la proliferación, diferenciación y supervivencia de células progenitoras, como por ejemplo IL-1, IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFNs, GM-CSF); el tratamiento de enfermedades autoinmunes (para esclerosis múltiple se emplea IFN- $\beta$ , para psoriasis se está estudiando la utilización de IL-10); el tratamiento de enfermedades virales (en el caso de hepatitis C se emplea IFN- $\alpha$ ) y el tratamiento de condiciones inflamatorias (muchos estudios clínicos apuntan al uso de IFN- $\gamma$  para enfermedades fibróticas, e IL-4 e IL-12, para el asma).

## 2. Interferones

Los interferones fueron las primeras citoquinas descritas en términos de su actividad biológica. Estas moléculas fueron descubiertas por Isaac y Linderman en 1957. La designación de su nombre se basó en la capacidad que presentan dichas citoquinas para inducir un estado antiviral en diferentes células del organismo contra un amplio espectro de virus de mamíferos. Fueron denominados interferones precisamente por su capacidad de interferir con el proceso de replicación e infección viral de numerosos virus.

Estas moléculas fueron también muy importantes desde el punto de vista de la investigación biomédica, dado que fueron las primeras citoquinas purificadas a homogeneidad, clonadas, sus secuencias fueron completamente determinadas y producidas en forma recombinante (Billiau, 2006).

Desde entonces, el campo de estudio de los IFNs comenzó a cobrar importancia, hasta llegar a dilucidar los mecanismos moleculares por los cuales son inducidos, producidos y el modo en que los mismos actúan sobre diferentes células del sistema inmune (Samuel, 2001).

Con el transcurso de los años, se describió al sistema IFN como un componente clave del sistema inmune innato. En la Tabla I se resumen algunos de los trabajos de investigación llevados a cabo para el estudio de los IFNs, desde su descubrimiento, caracterización, estudio de su producción y acción, estudio de los efectos adversos que los mismos presentan en diversos tratamientos y mecanismos de señalización, entre otros.

**Tabla I: Avances y Descubrimientos del sistema IFN a lo largo del tiempo** (reproducido de Vilcek J., 2006).

Año	Logros y Demostración <sup>a</sup>	Referencias <sup>b</sup>
1957	Descripción de los IFNs como proteínas inhibidoras virales desde células embrionarias de pollo expuestas al virus de la gripe inactivado	Isaacs y Lindermann, 1957
1962	IFNs inhiben el crecimiento de células cultivadas IFNs inhiben el crecimiento intracelular de bacterias	Paucker y col., 1962 Sueltenfuss y Pollard, 1962
1964	Los IFNs son inducidos por bacterias y endotoxinas en animales	Ho, 1964; Stinebring y Youngner, 1964
1965	Descripción del IFN- $\gamma$ (IFN tipo II)	Wheelock, 1965
1967	RNA doble cadena induce IFN	Field y col., 1967
1969	IFNs inhiben el crecimiento tumoral en animales	Gresser y col., 1969
1972-1976	Se reconoce la acción inmunomoduladora de los IFNs	Lindahl y col., 1976, 1972
1974-1976	Se describe la actividad antiviral mediada por proteínas inducidas por IFN	Kerry col., 1974; Lebleu y col., 1976
1975	Identificación de distintos subtipos de proteínas IFN tipo I (IFN- $\alpha$ e IFN- $\beta$ ) Descripción de niveles elevados de IFN en pacientes con lupus eritematoso	Havell y col., 1975 Skurkovich y Eremkina, 1975
1975- 1977	Reconocimiento de efectos adversos de los IFNs en animales	Gresser y col., 1975; Riviere y col., 1977
1979	Aislamiento y secuenciación del cDNA del IFN- $\beta$ humano	Taniguchi y col., 1979
1980	Aislamiento, secuenciación y expresión del cDNA del IFN- $\alpha$ humano Purificación y secuenciación parcial de las proteínas humanas IFN- $\alpha$ e IFN- $\beta$	Nagata y col., 1980 Knighty col., 1980; Zoon y col., 1980
1982	Aislamiento y secuenciación del cDNA del IFN- $\gamma$ humano Se describió una concentración elevada de IFN en pacientes infectados con HIV, la cual se correlacionó con la severidad de la enfermedad	Gray y Goeddel, 1982 DeStefano y col., 1982
1985	Identificación de elementos de reconocimiento ISRE en la región <i>upstream</i> de genes inducidos por IFN	Friedman y Stark, 1985
1988	Descubrimiento de la familia de factores de transcripción IRF	Miyamoto y col., 1988
1990	Identificación del complejo proteico ISGF3, mediador de la activación de genes inducibles por IFN.	Fu y col., 1990
1990- 1996	Identificación y caracterización de los componentes del receptor de los IFNs-I	Novick y col., 1994; Domansid y Colamonic, 1996
1992- 1994	Identificación de la vía de señalización JAK-STAT como la mejor vía de expresión de genes inducidos por IFN	Velazquez y col., 1992; Damell y col. 1994
1995- 1998	Descubrimiento del rol fundamental de IRF-3 e IRF-7 en la inducción de los IFNs tipo I	Juang y col., 1998; Marie y col., 1998; Sato y col., 1998
1999	Células dendríticas plasmocitoides como productores robustos de IFN tipo I	Siegal y col., 1999
2001	Toll-like receptor 3 mostró reconocimiento de ARN doble hebra	Alexopoulou y col., 2001
2004- 2005	Helicasa citosólica RIG-I y MDA5 pueden activar la producción de IFN en respuesta a virus ARN y ARN doble cadena	Yoneyama y col., 2004

<sup>a</sup>A menos que se indique lo contrario, los hitos hacen referencia a los logros en el campo de investigación de los IFNs tipo I  
<sup>b</sup>No todas las referencias pertenecientes a los descubrimientos y demostraciones fueron incluidos

Actualmente, los IFNs son conocidos como una familia de citoquinas glicosiladas, especie-específicas, que constituyen moléculas claves del sistema inmune innato y adquirido con diversas funciones biológicas, las cuales incluyen actividad antiviral, antiproliferativa e inmunomoduladora. Estas moléculas presentan actividad autócrina y parácrina, pero no son moléculas efectoras. Es decir, estas citoquinas no ejercen su efecto directamente sobre las células blanco, sino que lo hacen indirectamente a través de la activación de una red de respuestas, que concluyen con la ejecución de la actividad proporcionada por los IFNs sobre la misma célula y células vecinas.

### 3. Clasificación y nomenclatura de los interferones

Originalmente, los IFNs fueron clasificados de acuerdo con el tipo celular que les daba origen. De esta forma, eran denominados IFN leucocitario, fibroblástico e inmune. Actualmente, ha podido esclarecerse que las diferentes formas moleculares del IFN no son producidas por un único tipo celular y es por eso que han sido nominados de manera diferente, empleando el alfabeto griego. En esta nueva nomenclatura son designados IFN- $\alpha$  (leucocitario), IFN- $\beta$  (fibroblástico) e IFN- $\gamma$  (inmune). Además se incluyen IFN- $\omega$ , IFN- $\tau$  e IFN- $\delta$  (Sen y Lengyel, 1992).

También se los puede clasificar en tres grandes categorías: IFNs-I, IFNs tipo II e IFNs tipo III. Los de tipo I incluye a los IFNs- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$ ,  $\tau$  y  $\delta$ . Esta categoría está fundamentalmente representada por los IFNs- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , producidos por casi la totalidad de las líneas celulares como respuesta directa frente a una infección viral. La producción de IFN es predominantemente mediada por factores complejos de transcripción y por factores reguladores de interferón (IRFs). Derivan de un mismo gen ancestral y poseen suficiente homología estructural como para actuar a través de su unión a un mismo receptor celular. Son proteínas estables a pH ácido (pH=2). El IFN- $\alpha$  está constituido por una familia de 14 proteínas diferentes pero estructuralmente relacionadas, mientras que el IFN- $\beta$  se encuentra representado por una única especie molecular. El IFN- $\omega$  presenta un 60% de homología con la familia de genes de los IFNs- $\alpha$ . Sin embargo, si bien ambos tipos de IFN son producidos por linfocitos activados por virus y poseen similar actividad antiviral sobre líneas celulares humanas, el IFN- $\omega$  es antigénicamente diferente y difiere en su interacción con el receptor de tipo I (Horton y col., 1999). El IFN- $\tau$  (trofoblástico) no es inducido por virus y ha sido identificado sólo en rumiantes, si bien es activo sobre células humanas. Se produce en forma constitutiva en embriones de rumiantes y provee una función importante para el establecimiento de la preñez (Martal y col., 1998). El IFN- $\delta$  es el más pequeño de todos los IFNs y se ha encontrado sólo en trofoblastos de cerdo. Posee una alta actividad antiviral sobre células porcinas pero no sobre células humanas (Lefevre y col., 1998).

En la Tabla II se resumen las características principales de los IFNs humanos de tipo I.

El único IFN de tipo II que se conoce es el IFN- $\gamma$ , el cual no es inducido directamente por una infección viral, sino sintetizado por linfocitos T activados y células NK (*natural killer*) en respuesta al reconocimiento de células infectadas. A

diferencia de los anteriores, el IFN- $\gamma$  es lábil en condiciones ácidas y actúa a través de un receptor diferente (Pestka y col., 1983; De Maeyer y De Maeyer-Guignard, 1994; Goodbourn y col., 2000; Bekisz y col., 2004).

Finalmente, los últimos en ser descubiertos fueron los IFNs tipo III, IFNs antivirales, que comprenden tres subtipos  $\lambda$  (Pulverer y col., 2010). Actúan a través de otro complejo receptor, compuesto por la subunidad IL-10R $\beta$  y la subunidad de IL-28R $\alpha$  (Kotenko y col., 2003; Sheppard y col., 2003).

**Tabla II:** Características de los interferones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\omega$ . (Adaptado de Bekisz y col., 2004)

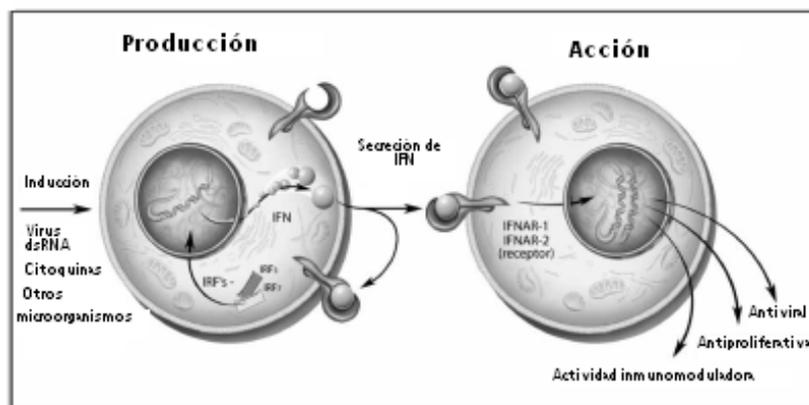
<i>Clase</i>	<i>Alfa</i>	<i>Beta</i>	<i>Omega</i>
<b>Nº de genes</b>	14	1	1
<b>Nº de proteínas</b>	> 22	1	1
<b>Glicosilación</b>	> 3 especies	Sí	Sí
<b>MM aparente</b>	17.500-27.000	20.000	25.000
<b>Uniones S-S</b>	2	1	2
<b>Nº de aminoácidos</b>	165-1.669	166	172
<b>Cromosoma que codifica para IFN</b>	9	9	9
<b>Cromosoma que codifica para el receptor de IFN-I (IFNAR)</b>	21	21	21
<b>Origen</b>	Monocitos y linfocitos B	Fibroblastos, macrófagos y células epiteliales	Leucocitos

Si bien así como los IFNs-I, tienen actividad antiviral, los mismos actúan a través de distintos receptores y activan células diferentes. Además, actúan fundamentalmente sobre algunos órganos particulares: estómago, intestino y pulmón (Sommereyns y col., 2008). Estos autores concluyeron que los IFNs  $\lambda$  pueden contribuir en la prevención de la invasión viral a través de la piel y las mucosas.

#### 4. Inducción, producción y mecanismo de acción de los IFNs-I.

Como puede visualizarse en la Fig. 1, los IFNs presentan una etapa de inducción/producción y otra de acción.

Existen numerosos factores como dsRNA, virus, otros microorganismos, citoquinas y factores de crecimiento capaces de inducir la producción de los IFNs a nivel celular (Brekisz y col., 2004). De esta manera, los interferones producidos se unen a su complejo receptor de tipo I, presente en la superficie celular, desencadenando una cascada de señalización basada en la fosforilación de ciertas moléculas, que permite la activación de numerosos genes estimulados por IFN (ISGs-*Interferon stimulated genes*). Como resultado, se inician numerosas respuestas biológicas propias de los IFNs-I, mediadas por proteínas producidas como consecuencia de la activación de genes de respuesta a IFN.



**Fig.1:** Producción y acción de los IFNs a nivel celular

Los IFNs-I son producidos por el organismo frente a infecciones virales o en presencia de otros microorganismos que inducen su producción. Una vez producidos, los mismos actúan en forma endócrina o parácrina sobre células vecinas para generar un estado antiviral, antiproliferativo e inmunomodulador, mediante la unión específica a su receptor en la superficie celular y posterior cascada de activación/fosforilación que concluye con la activación de genes de respuesta a IFN (Adaptado de Bekitsz y col., 2004).

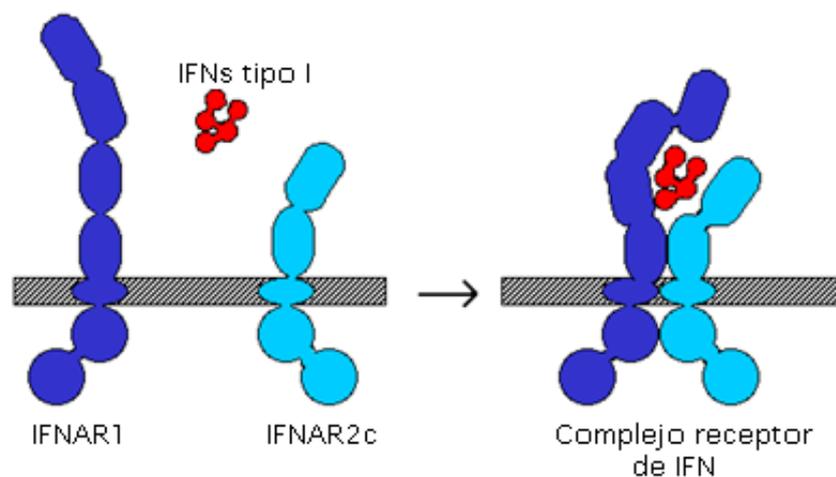
#### 5. Receptores de interferón

Los IFNs no son moléculas efectoras, ya que para poder ejercer su acción deben unirse a su receptor específico, presente en la superficie celular.

A pesar de que los IFNs-I inducen múltiples efectos celulares, los mismos actúan a través de la unión a un mismo complejo receptor IFNAR (complejo receptor de los IFNs-I), presente en la superficie celular de todas las células de vertebrados en un

bajo número (100-5.000 moléculas/célula) (Bekisz y col., 2004). Si bien los receptores se encuentran en baja cantidad en cada célula, tienen alta afinidad por los IFNs. Es por esto que, aún cuando el IFN se encuentra en muy bajas concentraciones, es capaz de producir la activación del receptor.

El receptor celular está compuesto por 2 subunidades transmembrana: IFNAR1, que es una proteína altamente glicosilada, con una masa molecular aparente de 135 kDa y IFNAR2, también glicosilada, que se encuentra presente como una variante larga (115 kDa) y otra corta (55 kDa) como resultado de un *splicing* alternativo del ARNm. Sólo la asociación de la subunidad IFNAR1 y la variante larga IFNAR2 puede iniciar el camino de transducción de señales (Lu y col., 1998; Roisman y col., 2001; Kunzi y Pitha, 2003). Cuando el IFN se une a estas proteínas de transmembrana, ambas subunidades se asocian, constituyendo el receptor funcional (Fig.2).



**Fig. 2:** Activación del complejo receptor de IFNs-I

Los IFNs-I tienen afinidad por un mismo complejo receptor presente en la superficie celular, compuesto por dos subunidades funcionales: IFNAR1 e IFNAR2c. Cuando el IFN se une, ambas subunidades se asocian formando el complejo receptor activo y desencadenando una cascada de señalización mediada por fosforilaciones, para que el IFN active sus mecanismos de acción/protección (Adaptado de Russell-Harde y col., 1999).

## 6. Transducción de la señal

La unión del IFN a su receptor desencadena la rápida activación de las quinasas Tyk2 (*Tyrosine kinase-2*) y Jak1 (*Janus kinase-1*), las cuales se encuentran asociadas físicamente a los dominios intracelulares de las subunidades IFNAR1 e IFNAR2, respectivamente. De esta forma, comienza una cascada de fosforilación/activación.

Estas enzimas sufren una fosforilación recíproca y, sucesivamente, fosforilan los residuos de tirosina de los dominios citoplasmáticos del receptor, así como también un residuo de tirosina del extremo C-terminal de las proteínas STAT (*signal transducers and activators of transcription*). Una vez fosforilado, el heterotrímero STAT (constituido por las proteínas STAT-1 $\alpha$ , STAT-1 $\beta$  y STAT-2 de 91, 84 y 113 kDa, respectivamente) se une a la proteína de unión a ADN denominada p48 (de 48 kDa, también denominada IRF-9), formando un complejo de transcripción llamado ISGF3 (*IFN-stimulated gene factor-3*).

Luego de su formación, el complejo ISGF3 transloca al núcleo, donde se une a una secuencia de ADN denominada ISRE (*IFN-stimulated response element*) que se encuentra presente en las regiones promotoras de los genes estimulados por IFN, e inicia su transcripción a RNAm para sintetizar las proteínas mediante las cuales los IFN ejercen su acción biológica (Fig. 3) (Runkel y col., 1998a; Kunzi y Pitha, 2003; Bekisz y col., 2004; Billiau, 2006).

## **7. Acciones biológicas de los interferones de tipo I**

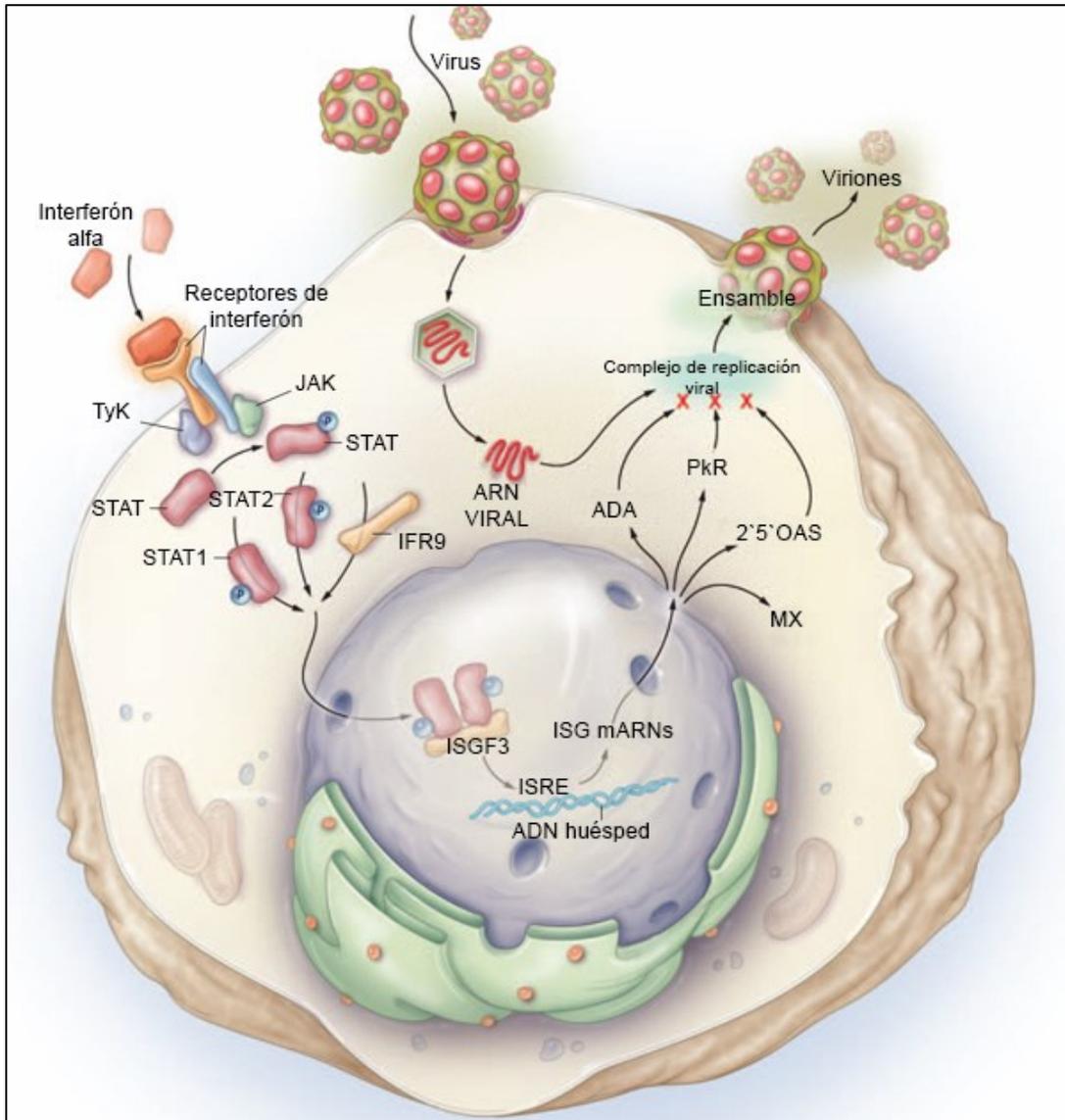
Los IFNs presentan numerosas e importantes actividades biológicas: actividad antiviral, antiproliferativa, inmunomoduladora y antitumoral. Es por ello que tienen un rol fundamental en la primera barrera de defensa del sistema inmune en el organismo humano.

### **7.1. Actividad antiviral**

La replicación de una gran variedad de diferentes virus a RNA y DNA de animales es inhibida por los IFNs, tanto en cultivos celulares como en animales (Pestka y col., 1987; Samuel y col., 1991; Stark y col., 1998).

Los IFNs tienen dos funciones diferentes para limitar la replicación viral dependiendo del estado de infección/no infección celular. En el caso de las células infectadas, los IFNs promueven la apoptosis, mientras que en las células no infectadas promueven un estado antiviral (Tanaka y col., 1998).

El sistema IFN puede afectar diferentes pasos de la replicación viral, incluyendo la penetración, la pérdida de la envoltura, la transcripción, la traducción, la maduración y la liberación de los viriones. Distintos caminos bioquímicos inducidos por IFN pueden ser responsables de la inhibición de la replicación de diferentes virus (Sen y Lengyel, 1982).



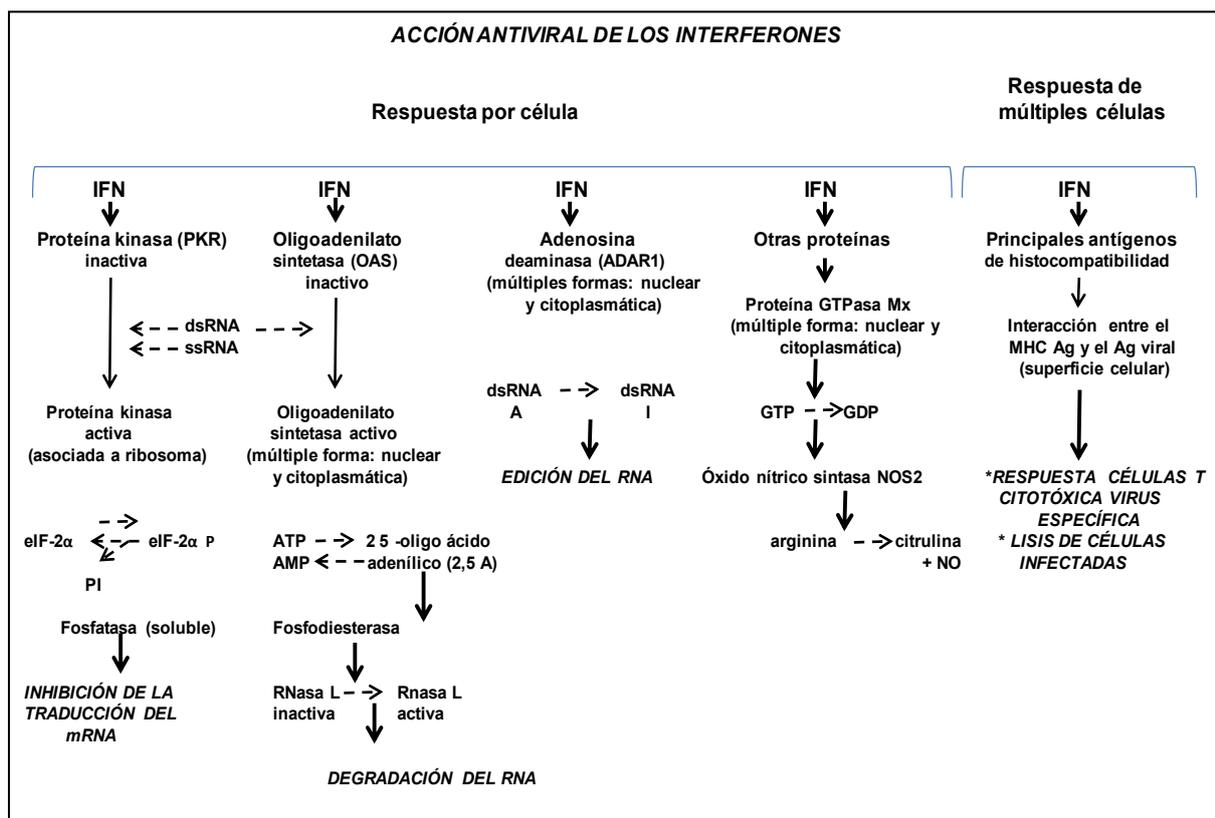
**Fig. 3:** Mecanismos de transducción de señales de los IFN- $\alpha/\beta$  humanos.

Los IFNs-I se unen a su receptor específico en la superficie celular generando la fosforilación de las proteínas involucradas en la cascada de señalización/activación del IFN, que concluye con la activación de numerosos genes de respuesta a IFN en el núcleo y, como resultado, la producción de numerosas proteínas que van a efectuar las actividades biológicas de los IFNs-I (Adaptado de Feld y col., 2005).

Además, han podido identificarse numerosas proteínas que juegan un rol importante en la inhibición de la replicación viral (Fig.4), y se ha dilucidado su mecanismo de acción. Un ejemplo es la proteína 2-5 A sintetasa, que es inducida por IFN y dependiente de dsARN. Esta cataliza la formación de un oligonucleótido inusual necesario para la activación de una endonucleasa latente RNasa L, que degrada mRNAs virales necesarios para la replicación de pequeños virus RNA (Lengyel, 1982;

Samuel, 1987; Staheli, 1990; Zhou y col., 1993). Otra de las proteínas inducidas por IFN tipo I es una proteína kinasa dependiente de dsRNA, la PKR (*protein kinase*), la cual fosforila e inactiva el factor de iniciación de la transcripción (eIF2) involucrado en la traducción poliribosomal de mRNAs virales.

En otro grupo de virus, incluyendo virus influenza, la replicación viral se encuentra inhibida por proteínas inducidas por IFNs como las proteínas Mx (Staheli, 1990; Ronni y col., 1993). Las proteínas Mx constituyen una familia de GTPasas inducibles por IFN que, a diferencia de los mecanismos anteriores, poseen actividad antiviral sobre virus específicos. Así, la proteína Mx murina provoca un estado antiviral dirigido específicamente contra la replicación del virus influenza (De Maeyer y De Maeyer Guignard, 1994; Goodbourn y col., 2000; Kunzi y Pitha, 2003). Estudios recientes demostraron que ratones simultáneamente deficientes en RNAasa L, PKR y Mx conservan su sensibilidad a la acción antiviral del IFN. Esto indicaría la existencia de ISGs adicionales con efectos antivirales (de Veer y col., 2001).



**Fig. 4:** Actividad antiviral de los IFNs: mecanismos de respuesta frente a la infección viral sobre células individuales y sobre múltiples células.

Mecanismos de producción/accción de las proteínas inducibles por IFN. Adaptado de Samuel, 2001.

Además, los IFNs-I no sólo interfieren con la replicación viral sino que también lo hacen con la duración y magnitud de la respuesta antiviral. Recientes hallazgos han demostrado que los IFNs-I regulan, adicionalmente, la expresión de diferentes receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que son proteínas presentes en las células del sistema inmunitario que identifican moléculas asociadas con patógenos microbianos o estrés celular y proteínas inhibitoras de la señalización de citoquinas (SOCs) para mantener la homeostasis celular (Bonjardim y col., 2009).

### 7.1.1. Proteína Mx

Las proteínas Mx pertenecen a una gran familia de GTPasas. Estas proteínas no están presentes constitutivamente en las células normales. Sin embargo, su inducción se produce por los IFNs-  $\alpha/\beta$  (Haller y Kochs, 2002). Todas las GTPasas presentan similitudes, tales como elevada masa molecular, capacidad para autoensamblarse, presentan relativamente baja afinidad por GTP y una alta tasa intrínseca de hidrólisis de GTP. La propiedad característica de las GTPasas Mx es su actividad antiviral frente a un amplio rango de virus RNA. En general, las GTPasas Mx detectan la infección viral censando estructuras como las nucleocápsides virales (Haller y col., 2002), bloqueando la actividad antiviral o afectando la traslocación viral entre los compartimientos subcelulares.

Las proteínas Mx constituyen un componente clave del estado antiviral inducido por IFNs-I ( $\alpha/\beta$ ) en varias especies (Haller y col., 1998) y tienen motivos conservados en diferentes especies; sin embargo, las mismas no son inducidas por IFN  $\gamma$  (Simon y col., 1991; Arnheiter y col., 1996).

El espectro de actividad antiviral proporcionada por las proteínas Mx y los mecanismos moleculares por los cuales actúan para inhibir la replicación viral son dependientes de la especificidad de la proteína Mx y su sitio de localización subcelular, entre otras condiciones.

En humanos, las proteínas MxA y MxB están codificadas en el cromosoma 21. De las dos, sólo la proteína MxA presenta actividad antiviral. En ratones, se han encontrado las GTPasas Mx1 y Mx2, ambas con actividad antiviral.

Los genes de las proteínas Mx se encuentran en el núcleo celular y están silenciados a menos que ocurra una infección viral. En ese caso, la infección viral inducirá una respuesta del sistema inmune, que se traducirá en la activación de los promotores Mx por parte de los IFNs-I. Finalmente, se generarán las GTPasas que desencadenarán sus efectos antivirales para combatir la infección viral.

La región promotora de estas proteínas contiene dos secuencias de elementos de respuesta a los IFNs (ISRE-*Interferon-stimulated response elements*), ISRE1 e ISRE2. La secuencia ISRE2 se encuentra en una zona proximal y es conservada en varias especies: humana, de pollo y murina. Esta secuencia es crítica en la activación de dicho promotor por parte de los IFNs (Asano y col., 2003).

## 7.2. Acción inmunomoduladora

Todos los IFN tienen actividad inmunomoduladora, siendo más elevada en el caso del IFN $\gamma$ .

Los IFNs inducen en la superficie de la célula tumoral, la expresión de antígenos asociados al tumor, incluidos en el sistema mayor de histocompatibilidad (HLA) de tipo I.

Una función importante que tienen los IFNs-I sobre la inmunidad inespecífica es aumentar la citotoxicidad de las células NK y la capacidad fagocítica de los macrófagos. Además, los IFNs estimulan la síntesis de las citoquinas IL-1, IL-6 y TNF, las cuales aumentan la expresión de receptores para el fragmento constante de las inmunoglobulinas (Fc) y para la fracción C3 del complemento. Estos mecanismos favorecen la fagocitosis de inmunocomplejos y la capacidad lítica de microorganismos mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Por otro lado, también poseen un importante rol sobre la inmunidad adquirida, ya sea mediante la inducción de IL-15, la cual estimula la división de las células T de memoria, o mediante el aumento de la síntesis de anticuerpos por linfocitos B (De Maeyer y De Mayer Guignard, 1994; Goodbourn y col., 2000; Meager, 2002).

## 7.3. Acción antiproliferativa

Los IFNs pueden inhibir el crecimiento celular de células normales y tumorales. Los IFNs  $\alpha/\beta$  son mediadores esenciales de la apoptosis. La apoptosis o muerte celular programada puede servir como un mecanismo de defensa en las células huésped para combatir la infección viral. La respuesta apoptótica involucra una cascada de señales intracelulares iniciadas en respuesta a una amplia variedad de estímulos, incluyendo la infección viral. Los cambios morfológicos asociados con la apoptosis de las células infectadas con virus incluyen la condensación de la cromatina y la vacuolización del citoplasma de células infectadas. Los cambios bioquímicos incluyen la activación de proteasas y nucleasas celulares y la degradación de ADN celular (Samuel, 2001). Sin embargo, la sensibilidad de las células a los efectos

antiproliferativos del IFN es extremadamente dependiente del tipo celular. Mientras que muchas líneas celulares no responden al IFN, el crecimiento de células Daudi (línea celular derivada de un linfoma de Burkitt) es completamente detenido en presencia de tan sólo 1 UI/ml de IFN- $\alpha$  (Goodbourn y col., 2000).

Estudios realizados sobre la síntesis de ADN sugieren que el IFN causa una pérdida de coordinación entre el inicio de la síntesis de ADN y los eventos subsiguientes necesarios para la división celular (Gewert y col., 1984).

Sin embargo, el principal efecto antiproliferativo de los IFNs es la prolongación del ciclo celular. Este efecto se manifiesta como la reducción o inhibición de la síntesis de RNA y proteínas durante la fase G1 (previa a la fase de síntesis), a la inhibición de la síntesis de poliaminas (necesarias para el ensamblaje del ADN), el incremento del número de células en la fase de reposo (Fase G0) y el retraso de las células en la fase G1.

Existe evidencia del rol de las proteínas PKR, 2'-5' oligoadenilato sintetasa y RNAasa L en las funciones antiproliferativas de los IFNs (De Maeyer y De Maeyer Guignard, 1994; Sotoca Momblona, 1999; Goodbourn y col., 2000).

Además, otros mecanismos que pueden contribuir a la actividad antiproliferativa inducida por IFNs-I incluyen el incremento de la rigidez celular (Wang y col., 1981), la depleción de metabolitos esenciales (Sekar y col., 1983; De la Maza y Peterson, 1988), así como la supresión de oncogenes mediante la reducción de su transcripción y expresión sobre algunos tumores (Contente y col., 1990).

## **8. Uso clínico de los interferones $\alpha$ y $\beta$ : ventajas y desventajas**

Los IFNs son citoquinas ampliamente utilizadas como fármacos debido a sus propiedades antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras.

Los IFNs de tipo I presentan un amplio espectro de actividades biológicas que han potenciado el área de investigación y desarrollo de medicamentos basados en sus formas recombinantes. En particular, los IFN- $\alpha$ 2a e IFN- $\alpha$ 2b humanos recombinantes fueron aprobados para el tratamiento de hepatitis crónica activa de tipo B y C, sarcoma de Kaposi, linfoma folicular no-Hodgkin, melanoma maligno y leucemia de células vellosas, entre otras patologías tumorales (Wang y col., 2002), mientras que las formas recombinantes del IFN- $\beta$ 1a e IFN- $\beta$ 1b fueron aprobadas solamente para el tratamiento de esclerosis múltiple (Horowski, 2002).

### 8.1. Efectos adversos de los IFNs-I

Los IFNs, como la mayoría de las citoquinas, son producidos por el individuo para actuar en forma local. Su empleo como fármaco sistémico requiere la administración de dosis elevadas y frecuentes con el fin de alcanzar la ventana terapéutica, ya que presenta una rápida inactivación y eliminación del organismo. Esta particularidad se traduce en la aparición de efectos secundarios adversos al tratamiento, que muchas veces están determinados por la vía de administración, el plan terapéutico y la dosis empleada. Estos efectos secundarios incluyen síntomas gripales tales como fiebre, fatiga, escalofríos, mialgias y artralgias y algunos efectos psicológicos como depresión e irritabilidad, entre otros (Sotoca Momblona, 1999). También se han observado importantes pérdidas de peso, alteraciones de las funciones hepáticas, lesiones herpéticas superficiales, caída del cabello, sequedad de boca y algunas alteraciones tóxicas en el sistema nervioso central.

Por otro lado, se ha demostrado en algunos pacientes que tanto el rhIFN- $\alpha$  como el rhIFN- $\beta$  resultan inmunogénicos, generando anticuerpos neutralizantes de la actividad biológica, responsables en parte de la limitada eficacia clínica durante el curso del tratamiento (Sotoca Momblona, 1999; Pachner, 2005). Como consecuencia de los efectos adversos mencionados, las dosis de IFN deben reducirse entre 10 y 40% en los pacientes, y/o el tratamiento debe suspenderse en un 5 al 10% de los mismos (Sotoca Momblona, 1999).

Por otro lado, a pesar de las propiedades terapéuticas del hIFN- $\alpha$ 2, se han descrito efectos adversos de la liberación de IFN- $\alpha$  endógeno durante el desarrollo de procesos infecciosos agudos de origen viral y en el curso de numerosas enfermedades autoinmunes, como el Lupus Eritematoso Sistémico (LES). En pacientes que manifiestan esta patología, se han detectado niveles elevados de IFN- $\alpha$  inducido por la acción de complejos inmunes sobre células mononucleadas de sangre periférica (Batteux y col., 1999). Asimismo, diferentes citoquinas, incluyendo el IFN- $\alpha$ , han sido implicadas en la patogénesis de la diabetes mellitus tipo I o insulina-dependiente (DMID) en modelos animales y humanos, reportándose la expresión de IFN en células  $\beta$  de pacientes con DMID (Foulis y col., 1987; Huang y col., 1995). En ambas patologías existen evidencias que señalan al IFN como responsable del inicio o mantenimiento de las mismas (Selmi y col., 2006) y, simultáneamente, existen numerosos reportes que documentan el desarrollo de DMID y LES en pacientes bajo tratamiento anti-tumoral con IFN- $\alpha$  (Chuntharapai y col., 2001).

Asimismo, se ha demostrado la incidencia del IFN- $\alpha$  en el desarrollo de la psoriasis (Nestle y col., 2005), en la que células plasmocitoides predendríticas

infiltrarían la piel y se activarían para producir IFN en las etapas tempranas de la enfermedad. Esta expresión produciría la activación y expansión de células T autoinmunes en la piel sana, desencadenando el desarrollo de psoriasis.

## **8.2. Posibles soluciones a los efectos adversos generados en los tratamientos con IFNs-I**

Los efectos nocivos hasta aquí expuestos, resultantes de la liberación excesiva de IFN endógeno, podrían suprimirse con la utilización de moléculas neutralizantes de la actividad biológica de la citoquina. En este sentido, con el objeto de neutralizar proteínas solubles, en las últimas décadas ha adquirido gran interés el uso de anticuerpos monoclonales terapéuticos, basados en la producción de inmunoglobulinas murinas o anticuerpos de segunda generación, tales como anticuerpos quiméricos, humanizados y completamente humanos (Stockwin-y Colmes, 2004). Sin embargo, el empleo de este tipo de terapias es limitado debido a la inmunogenicidad ampliamente registrada de los anticuerpos murinos, quiméricos y humanizados y/o a las elevadas dosis de anticuerpos que deben utilizarse en una terapia convencional con inmunoglobulinas (Song y col., 2002). Es aquí donde adquiere relevancia la búsqueda de compuestos sintéticos y/o naturales que, exhibiendo capacidad para interferir en forma antagónica con la actividad biológica de los IFNs, no demuestren los problemas asociados al empleo de inmunoglobulinas.

Por otra parte, encontrar moléculas que presenten una capacidad intrínseca de incrementar la eficiencia terapéutica de los IFNs-I para el tratamiento de patologías en las que se requieren altas y frecuentes dosis de los mismos, permitiría ampliar la ventana terapéutica de los IFNs, reduciendo los casos de limitaciones/suspensiones de tratamientos por aparición de efectos nocivos.

En resumen, tanto el IFN utilizado como medicamento como el producido en forma endógena de manera exacerbada en determinadas situaciones producen efectos adversos de diversa complejidad, que complican el tratamiento de ciertas patologías. Por lo tanto, el IFN se presenta como una molécula central cuyo accionar debe regularse para evitar los inconvenientes clínicos observados. En este sentido, surge la necesidad de incrementar su eficacia terapéutica en aquel grupo de patologías que requieran de su administración exógena y, por otro lado, bloquear sus efectos nocivos en aquel conjunto de enfermedades en las que la producción de IFN endógeno constituye parte de su etiología.

Es por ello que resultaría fundamental encontrar moléculas capaces de modular la respuesta de los IFNs-I, tanto en forma sinérgica como antagónica, para subsanar las problemáticas anteriormente expuestas.

Sin embargo, el monitoreo del efecto de diferentes compuestos (a partir de diversas bibliotecas) sobre la actividad biológica de los IFNs, requiere de métodos versátiles, sencillos, robustos y que puedan realizarse a una elevada velocidad de procesamiento. Por lo tanto, contar con un ensayo biológico basado en una línea celular que responda a IFNs-I y que presente las mencionadas características resultaría trascendental para el cumplimiento del objetivo propuesto.

## **9. Ensayos biológicos para determinar la potencia de los IFNs-I**

Los IFNs son moléculas pleiotrópicas, es decir, que ejercen una variedad de actividades biológicas. Por ese motivo, son ampliamente utilizados en la clínica para el tratamiento de diversas patologías. En consecuencia, sus formas recombinantes de interés terapéutico deben ser purificadas a homogeneidad y su potencia exactamente cuantificada para su posterior administración a los pacientes. Para cumplir con este último objetivo, a lo largo del tiempo se han desarrollado distintas metodologías empleadas para la cuantificación de los IFNs.

En un comienzo, se generaron diversos ensayos que permitieron detectar y cuantificar la citoquina de interés. En este sentido, numerosos ELISAs utilizando anticuerpos monoclonales de alta afinidad permitieron contar con ensayos sensibles, específicos y reproducibles. Sin embargo, este tipo de ensayos no resultan útiles para determinar la potencia de los IFNs. Es por ello que han sido desarrolladas diferentes metodologías para poder cumplir con este propósito. En la actualidad se cuenta con ensayos de diferentes características para determinar la potencia de los IFNs-I: ensayos de actividad antiviral, ensayos de actividad antiproliferativa, bioensayos y ensayos reporteros.

### **9.1. Ensayo de actividad antiviral (AVA)**

Este tipo de ensayos se basa fundamentalmente en la cuantificación de la actividad inhibitoria de dicha citoquina en los procesos de replicación y propagación viral. En relación a ellos, existe un gran número de parámetros de respuesta incluyendo reducción del rendimiento viral, disminución del efecto citopático, formación de placas virales, reducción de proteínas virales y síntesis de RNA, entre otros (Grossberg y Sedmak, 1984; Lewis, 1987; Meager, 1987).

Para esta técnica, se utilizan líneas celulares que sean susceptibles a la infección con un determinado virus y que presenten sensibilidad a los IFNs-I; es decir, que expresen los receptores específicos para la citoquina en cuestión sobre su superficie celular. Existen numerosos pares de líneas celulares/virus para constituir un eficiente ensayo AVA (Meager, 2002).

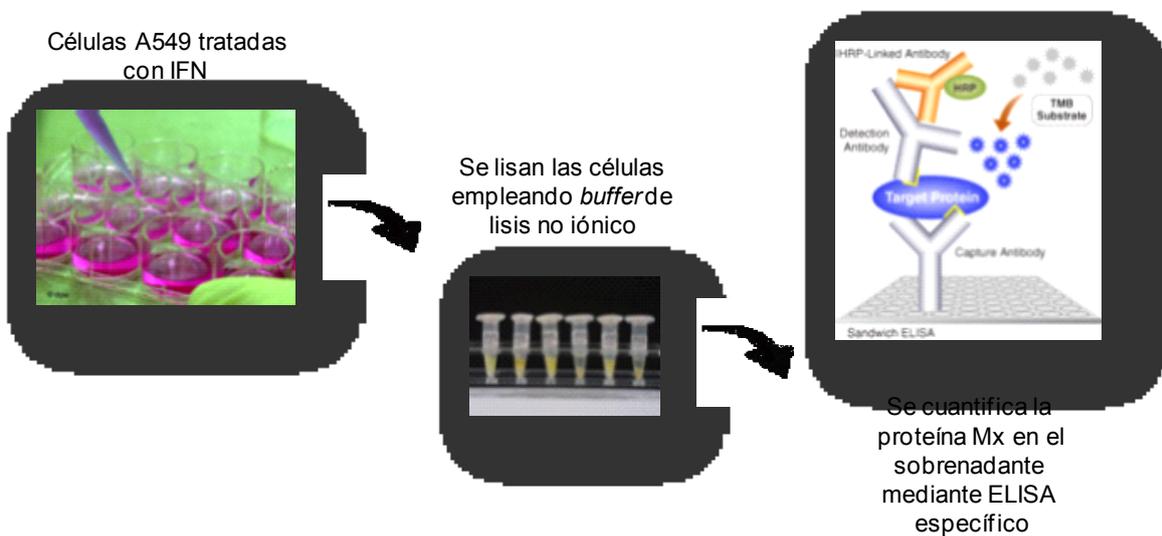
Para este ensayo se utiliza una plataforma de cultivo de células en adherencia en placas de 96 pozos. La línea celular escogida, sensible a IFN, es incubada con distintas diluciones de IFN durante un tiempo prudencial (6 h) para que las citoquinas puedan desencadenar su actividad biológica y generar en las células un estado protector frente a la infección viral posterior. A continuación, las células expuestas al IFN se infectan con el virus durante 18-24 h. Finalmente, el ensayo es revelado mediante fijación y tinción con un colorante supravital de las células que no han sido lisadas por la infección viral y permanecen adheridas a la placa, como consecuencia de la protección celular mediada por los IFNs. Las células viables incorporan el colorante y luego lo liberan durante la etapa de lisis y solubilización del mismo. Posteriormente, se determinan las absorbancias de tales soluciones, que serán directamente proporcionales a la cantidad de células que permanecieron viables durante la infección viral. Se grafican curvas dosis-respuesta para el estándar de IFN, cuya concentración es conocida, y se comparan con las curvas correspondientes a cada muestra analizada. La comparación será posible si las curvas cumplen el criterio de paralelismo, lo cual es una condición que avala que la muestra y el estándar son químicamente homogéneos e idénticos (Billiau, 2006).

Comparado con otras metodologías, este ensayo presenta algunas desventajas: es necesario determinar el título de infección viral y monitorearlo periódicamente para asegurarse que no haya pérdida de la infectividad; se requiere el empleo de cabinas de seguridad tipo II para la manipulación del virus; presenta altas variaciones intra- e inter-ensayos, tornándolo poco reproducible y, en algunos casos, requiere varias repeticiones para poder calcular una potencia (Rubinstein y col., 1981). Para solucionar los problemas recientemente mencionados, se ha propuesto estandarizar el uso de un virus determinado, emplear estándares internacionales, siguiendo una metodología particular y utilizar una única línea celular considerada modelo. Habitualmente se utiliza el virus de la estomatitis vesicular (VSV) conjuntamente con la línea celular WISH, derivada del amnios humano, para cuantificar la potencia de los subtipos de hIFN- $\beta$ , mientras que para determinar la actividad de los subtipos de hIFN- $\alpha$ , comúnmente se utiliza el par VSV/línea celular bovina MDBK (*Madin-Darby Bovine kidney*), según las recomendaciones de la Farmacopea Europea.

## 9.2. Bioinmunoensayos

A lo largo de la historia del descubrimiento y estudio de los IFNs y a causa de las desventajas encontradas en el modelo de ensayo analizado anteriormente, se han desarrollado otro tipo de ensayos, en los cuales se ha incorporado una etapa de inmunodetección para hacer que resulten ensayos más específicos.

De esta forma, Files y col., (1998) desarrollaron un bioensayo en el cual se cuantifica una proteína inducible específicamente por hIFNs-I mediante una reacción de inmunodetección. Para llevar a cabo dicho objetivo, células A549 humanas fueron incubadas con hIFN. Luego de un tiempo prudencial, las células fueron lisadas empleando un *buffer* no iónico, y mediante un ELISA, empleando anticuerpos específicos contra la proteína, se procedió a la cuantificación de la proteína Mx. Esta es una proteína con acción antiviral inducida específicamente por la actividad de los IFNs-I (Fig.5). De esta forma, se correlacionó la cantidad de proteína Mx producida con la cantidad de IFN en la muestra. Este ensayo mostró bajo *background*, un amplio rango dinámico y alta especificidad.

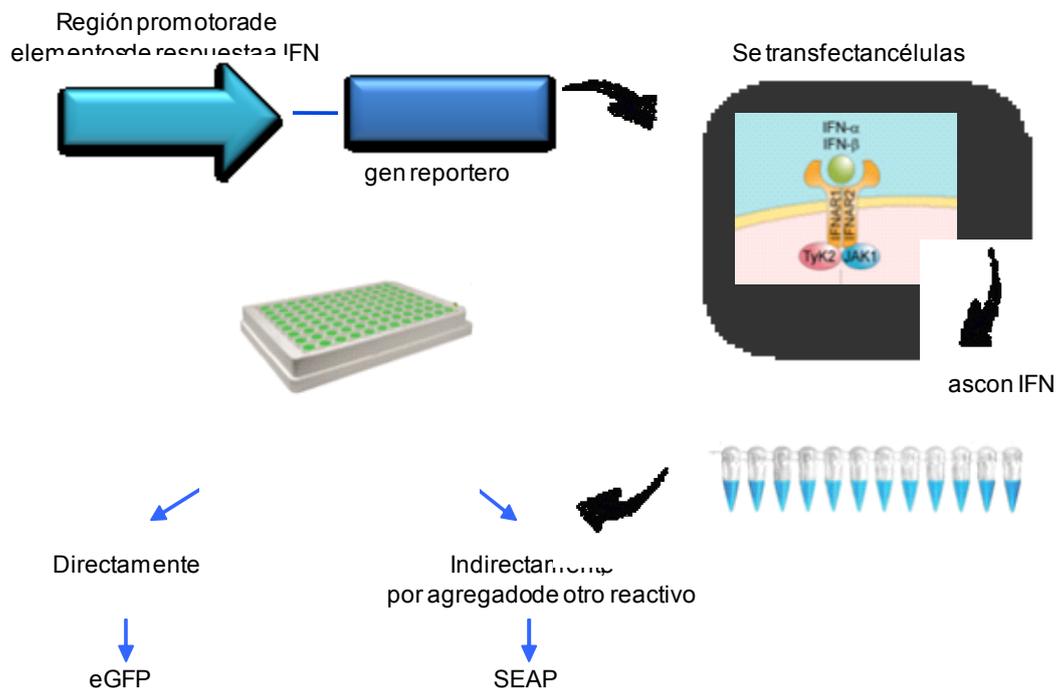


**Fig. 5:** Esquema del bioinmunoensayo desarrollado por Files y col., (1998) para determinar la actividad de los IFNs-I.

Las células reporteras son estimuladas con IFN. A continuación, son lisadas para permitir la liberación de la proteína Mx producida intracelularmente como consecuencia de la activación causada por de los IFNs-I. Finalmente, se cuantifica la proteína Mx en el sobrenadante mediante un ELISA específico indirecto.

### 9.3. Ensayos reporteros

Con el advenimiento de nuevos conocimientos y tecnologías, nuevas metodologías fueron desarrolladas para cuantificar la potencia de los IFNs-I. Es así como surgieron los ensayos de genes reporteros (EGR). Los nuevos descubrimientos de la ciencia referidos a la tecnología del ADN recombinante han permitido la construcción de secuencias híbridas de ADN, constituidas por promotores que sean inducibles específicamente por IFN, acoplados a una enzima, cuyo producto sea fácilmente detectable y no lo produzca la misma célula. Estas construcciones son empleadas para obtener líneas celulares reporteras de la actividad de los IFNs-I, mediante transfección de líneas celulares sensibles a IFN, que expresen sus receptores específicos. De esta forma, al incubar las líneas celulares recombinantes con dosis crecientes de la citoquina de interés, el promotor se activará y se producirán cantidades proporcionales de genes reporteros (Canosi y col., 1996). Estas metodologías son sencillas, muy sensibles y específicas y proporcionan resultados confiables (Fig. 6).



**Fig. 6:** Esquema de la construcción de sistemas genes reporteros, particularmente, de la actividad de los IFNs-I.

Se construye el transgen conteniendo la región promotora de elementos de respuesta a IFN, gobernando la expresión del gen reportero. Seguidamente, esta secuencia de ADN es utilizada para transfectar líneas celulares que expresen los receptores para la citoquina de interés en su superficie. Una vez obtenidas las líneas reporteras, se estimulan con IFN y luego de un determinado período de tiempo se cuantifica la cantidad de gen reportero desarrollado, de forma directa o indirecta, según la proteína reportera del sistema.

Lleonardt y col. (1990) desarrollaron un sistema reportero basado en la generación de la línea reportera VERO, transfectada con la secuencia híbrida del promotor murino inducible específicamente por IFNs-I (Mx1) y hormona de crecimiento humana (hGH). De esta forma, la interacción del IFN con su receptor activa el promotor específico y, como consecuencia, se produce la hormona de crecimiento. A continuación, la hormona es cuantificada mediante un ELISA específico, empleando anticuerpos específicos para la hormona de crecimiento.

**Tabla III:** Ensayos de gen reportero desarrollados a lo largo del tiempo para determinar la potencia de los IFNs.  
ND: no determinado.

Autor	Denominación de la línea celular	Tipo de IFN a cuantificar	Duración ensayo	Rango en la zona de respuesta lineal (UI/ml)	Especificidad
<i>Lleonardt y col. 1990</i>	VERO-Mx-hGH	$\alpha$ , $\beta$ humanos	48 h + ELISA	3-100 ( $\alpha$ ) 30-100 ( $\beta$ )	Sí
<i>Canosi y col. 1996</i>	VERO-Mx-Luc	$\beta$ humano	52 h	1 - 16	Sí
<i>Fray y col. 2001</i>	MDBK-Mx-CAT	$\alpha$ bovino	24 h + 80s	0,25-125	ND
<i>Bollati y Müller 2005</i>	MxRAGE	$\alpha$ , $\beta$ murinos	164 h	20-300 ( $\alpha$ ) 10-500 ( $\beta$ )	ND
<i>Caserman y col. 2006</i>	Hek293-ISRE-SEAP	$\alpha$ humano	68 h	ND	ND
<i>Jorgensen y col. 2007</i>	CHSE214-Mx-Luc	IFN de salmón	96 h	38-151	Sí
<i>Smilovic y col. 2008</i>	CHO-ISRE-SEAP	$\alpha$ , $\beta$ , $\omega$ humanos	68 h	ND	Sí
<i>Seo y col. 2009</i>	HeLa Mx2-Luc	Humano tipo I	ND	1-10.000 ( $\alpha$ )	Sí
<i>Kugel y col. 2010</i>	Mx2-Luc Transgenic mice	Murino I y III	8 h post inducción	10-50 ( $\alpha$ )	Sí

Con el objetivo de generar un ensayo más rápido y más directo, y basándose en el modelo de Lleonardt (1990), Canosi y col. en 1996 sustituyeron la hGH por la secuencia de la proteína reportera luciferasa. Este sistema fue optimizado para determinar la potencia del hIFN- $\beta$  demostrando mayor precisión y rapidez durante el procedimiento de revelado del ensayo. Sin embargo, esta nueva metodología presenta

las siguientes desventajas: el reportero utilizado en este sistema se produce intracelularmente y como un precursor de la luciferasa; por ello, para poder medir la intensidad de luz generada por la luciferasa es necesario lisar las células y agregar el sustrato sobre el que actúa la enzima. Además, la duración de la emisión de luz es extremadamente corta, por lo que la determinación debe realizarse rápidamente.

En 2001, Fray y col. generaron un sistema reportero MDBK-MxA-CAT (enzima cloroacetiltransferasa) para determinar la potencia de los IFN-I bovinos.

Más tarde, fueron desarrollados otros modelos reporteros: Glio GFAP/lacZ (Hammerling y col., 1998), HEK293 ISRE SEAP (LaFleur y col., 2001; Meager, 2002), Mx1 CRE tk EGFP (Bollati Fogolín y Müller, 2005) para determinar la potencia de los interferones vía activación del gen reportero, cuyas características se resumen en la Tabla III.

### 9.3.1. Sistemas de genes reporteros

Los sistemas de genes reporteros han contribuido ampliamente al estudio de la expresión y regulación de genes eucariotas.

Los genes reporteros son frecuentemente utilizados como indicadores de la actividad transcripcional en las células, para el estudio de promotores y secuencias *enhancer*, para monitorear eficiencias de transfección, estudiar interacciones proteína-proteína y eventos de recombinación (Rosental, 1987).

Comúnmente, el gen reportero o cDNA se une a una secuencia promotora en un vector de expresión que luego se transfiere a las células. Luego de la transfección, dependiendo del modelo reportero, se activa por incubación de las células con enzimas o alguna molécula involucrada en la activación del reportero, y se analiza en términos de cantidad de mRNA obtenido, cantidad de proteína reportera generada o actividad enzimática del reportero. Idealmente, el reportero no debe ser expresado endógenamente por la célula huésped, y el sistema de ensayo de gen reportero debe presentar las siguientes características: ser sensible, cuantitativo, rápido, fácil de realizar, reproducible y seguro.

La enzima cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) de *E. coli*, fue la primera proteína reportera utilizada en un vector reportero, con el cual se diseñó un ensayo para el análisis de la regulación transcripcional en células de mamífero (Gorman, 1982). Desde ese momento, varios sistemas de genes reporteros han sido desarrollados incluyendo:  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal), luciferasa, hormona de crecimiento (GH),  $\beta$ -glucuronidasa (GUS), fosfatasa alcalina (AP-*alkaline phosphatase*), fosfatasa

alcalina secretada (SEAP-*secreted alkaline phosphatase*) y, más recientemente, proteínas reporteras como la proteína de fluorescencia verde (GFP-*green fluorescence protein*).

Si bien existen numerosas opciones para diseñar un ensayo de gen reportero que permita obtener resultados exitosos, es fundamental conocer y estudiar las ventajas y las limitaciones que presenta cada una de las proteínas utilizadas como reporteras. En la Tabla IV se resumen las características de las proteínas reporteras estudiadas y más utilizadas en la actualidad.

**Tabla IV:** Ventajas y limitaciones de los genes reporteros comúnmente utilizados. (Adaptado de Groskrutz y Schurborn, 1997)

Gen reportero	Ventajas	Limitaciones
<b>CAT</b>	*Estándar ampliamente aceptado en la literatura *Actividad enzimática visible	*Baja sensibilidad *Costoso por los isótopos
<b>Luciferasa</b>	*Rápido y sencillo *Alta sensibilidad *Amplio rango en la zona de respuesta lineal	*Requiere luminómetro para ensayos de alta sensibilidad *Proteína lábil *Requiere de sustrato
<b><math>\beta</math>-gal</b>	*Fácil de utilizar *Variedad de formato de ensayos para usar con extractos celulares *Ampliamente usado para tinción <i>in situ</i>	*Actividad endógena en algunos tipos celulares *Baja sensibilidad en ensayos no-quimioluminiscentes
<b>GUS</b>	*Amplia variedad de formatos *Usado para tinción <i>in situ</i> *Fusión a proteínas	*Actividad endógena en células de mamífero
<b>hGH</b>	*Se secreta *Bajo <i>background</i>	*Requiere detección por inmunoensayos *Baja sensibilidad
<b>AP</b>	*Amplia variedad de métodos de ensayo *Alta sensibilidad en algunos ensayos *Amplio rango en la zona de respuesta lineal en algunos ensayos	*Actividad endógena en la mayoría de las células
<b>SEAP</b>	*Se secreta *Bajo <i>background</i>	*Requiere de un sustrato para su detección
<b>GFP</b>	*No requiere sustrato *Proteína reportera estable *Aplicaciones <i>in situ</i> e <i>in vivo</i>	*Requiere microscopio de fluorescencia o citómetro de flujo

La explotación de la proteína verde fluorescente (GFP) como reportero *in vivo* para localización subcelular y expresión de proteínas ha revolucionado la biología celular en las últimas décadas (Chalfie y col., 1994). La GFP se pliega autocatalíticamente sin la necesidad de sustratos externos o co-factores. La mutagénesis de la GFP, producida por la medusa *Aequorea victoria*, ha mejorado notablemente distintos aspectos como la fotoestabilidad, el uso de codones, la termosensibilidad, la eficiencia cuántica y la amplia gama de fluorescencia emitida, desde el azul hasta el amarillo (Jakobs y col., 2000). Además, las ventajas de la aplicación de EGFP en células de mamíferos incluyen la mejorada sensibilidad de detección, mejor solubilidad y un *fold*ing más eficiente, entre otros.

## 10. High throughput screening (HTS)

*High throughput screening* (HTS) es una de las nuevas tecnologías utilizadas fundamentalmente para el diseño y búsqueda de nuevas drogas terapéuticas. Dicha metodología puede ser aplicada tanto en ciencias biológicas como químicas. Este es un procedimiento de análisis simultáneo de un gran número de moduladores y efectores biológicos frente a un objetivo específico. La principal ventaja de esta tecnología es que permite acelerar el descubrimiento de drogas mediante el análisis de grandes bibliotecas de compuestos a una razón que puede exceder miles de compuestos por día o por semana (Szymanski y col., 2012).

Los sistemas de detección en HTS se basan, frecuentemente, en la medición de fluorescencia o luminiscencia, dado que facilitan un procesamiento de las muestras de forma simple y proveen altos niveles de sensibilidad.

Si bien esta metodología tiene su principal objetivo en la búsqueda de nuevas drogas, también presenta numerosas aplicaciones, entre las cuales se destacan: análisis de toxicidad, identificación de genes con una actividad determinada, análisis de la actividad metabólica de una enzima, evaluación de la actividad de receptores celulares, análisis de la actividad de un promotor, entre otras.

Para la identificación de nuevas drogas o de compuestos con una actividad determinada, se han desarrollado numerosos bioensayos basados en el empleo de células, que exponen una particularidad que las convierte en células blanco para evaluar un gran número de compuestos que pueden ser naturales, sintéticos o una combinación de ambos. Ese sistema debe ser específico para poder, rápidamente, identificar los compuestos líderes o candidatos, los cuales son caracterizados por poseer un cierto grado de selectividad por el sitio blanco. Una vez identificados, son

analizados en términos de su potencia, selectividad, propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas, así como de su toxicidad. De esta forma, el HTS facilita la eliminación temprana de los compuestos no deseados (Gribbon y col., 2005; Martis y col., 2011). Por este motivo, en los últimos tiempos esta técnica ha sido ampliamente utilizada no sólo por centros de investigación y desarrollo, sino también por empresas farmacéuticas. Además, diversos estudios han podido corroborar que el HTS contribuye al ahorro de 130 millones de dólares y aproximadamente 0,8 años de trabajo para el desarrollo de cada nueva droga (Ekins y col., 2006). Por todos estos motivos, dicha metodología se encuentra en continua expansión.

Esta metodología está basada en la miniaturización del *screening*, lo que implica el monitoreo con la menor cantidad de muestra posible, de manera de garantizar la disponibilidad de recursos y disminución de costos de análisis, así como el empleo de tecnología robotizada para el análisis de las micromuestras en las cantidades mencionadas por día/semana (Mishra y col., 2008).

### 10.1. Desarrollo de un ensayo para HTS

Este tipo de ensayos comenzó a realizarse sobre placas de 96 cavidades. Más tarde, con los avances tecnológicos, el sistema se miniaturizó, y comenzaron a realizarse monitoreos empleando placas de 384 pozos. Hoy en día, mediante sistemas robotizados se ha logrado optimizar y miniaturizar aún más los *screenings*, permitiendo realizarlos sobre placas de 1.586 pozos, lo que representa mayor velocidad de análisis, menor volumen de compuestos a estudiar y menor costo de análisis.

Para el desarrollo de un exitoso HTS, la primera consideración es identificar una estrategia de monitoreo que mantenga el contexto biológico apropiado, mientras sea factible un balance en términos de disponibilidad de reactivos y adaptación a la automatización. Para ensayos basados en células, esto implica la elección del sistema biológico (líneas celulares primarias, nativas o líneas celulares modificadas por ingeniería genética u organismos modelos), elección del ensayo apropiado (funcional, gen reportero o fenotípico) y elección de la modalidad de lectura final del ensayo. Es fundamental contar con un modelo biológico que presente alta especificidad, para asegurar que no se obtendrán falsos resultados positivos en los análisis. Además, es necesario considerar los problemas inherentes a la línea celular escogida y, por supuesto, basar el análisis en información parcial sobre la calidad y aptitud del mismo para seleccionar las moléculas de interés.

Con respecto a los compuestos a analizar, muchas veces son potencialmente más importantes que el ensayo en sí mismo. Es por ello que, para seleccionar una biblioteca de compuestos, no deben ignorarse factores como las características de las drogas y el número de *clusters* en la biblioteca, es decir, compuestos que presentan cierta similitud estructural y funcional, y que la cantidad de compuesto para continuar los ensayos de caracterización sea accesible y suficiente (Mishra y col., 2008).

Para la optimización de ensayos basados en el empleo de células es necesario, pero no limitante, incluir ensayos previos de titulación de la densidad celular a utilizar, titulación de los reactivos empleados, determinación de la concentración óptima de modulador (si corresponde) y determinación del tiempo de incubación óptimo con los compuestos.

Asimismo, es importante evaluar la sensibilidad de la línea celular empleada en el bioensayo frente a los reactivos utilizados, como los solventes en los que se encuentran resuspendidos los compuestos. Generalmente, los compuestos están disueltos en solventes orgánicos como el dimetilsulfóxido (DMSO) que, dependiendo de su concentración, resulta tóxico para las células.

Por su parte, es necesario ajustar los instrumentos que se utilizarán en el monitoreo de los compuestos: pipetas utilizadas, volúmenes empleados, así como la correcta configuración de los sistemas robotizados para aspirar y dispensar las muestras, y los equipos utilizados para la lectura final del ensayo (luminómetros, citómetros de flujo, entre otros) (Frank y Tolliday, 2010).

Teniendo en cuenta las consideraciones mencionadas, es factible el desarrollo de sistemas de análisis basados en HTS que permitan obtener resultados confiables y reproducibles, de una manera sencilla, rápida y a menor costo.

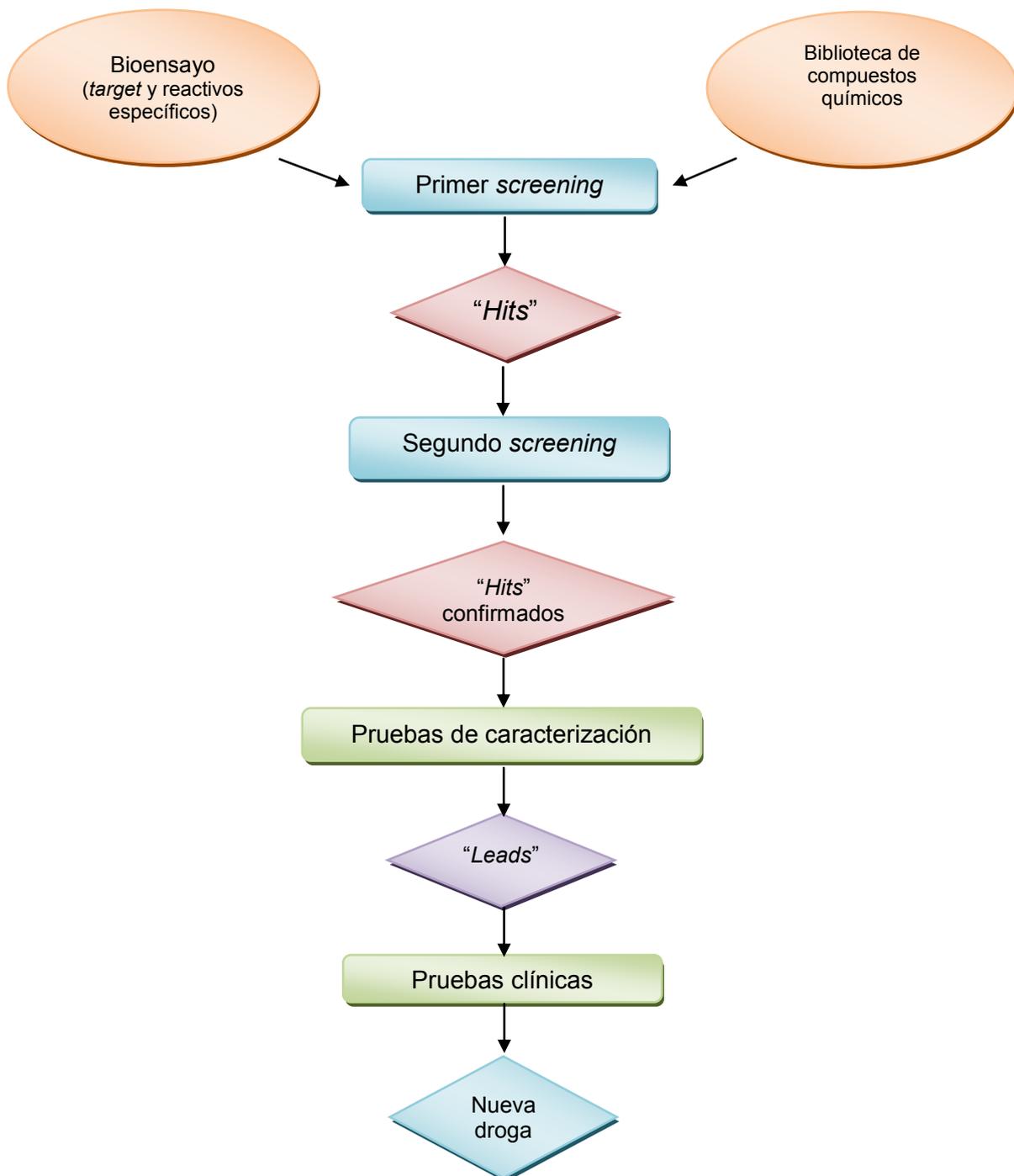
## **10.2. Estadística aplicada al análisis de datos en HTS**

Algunos autores aseguran que cuando se procesan muchos compuestos a la vez es suficiente analizarlos por duplicado en una misma placa, realizando un único *screening*. Sin embargo, otros sugieren en una primera etapa realizar un análisis primario de la biblioteca de compuestos, evaluando cada uno de ellos por uniplicado. Luego, se deben procesar los datos empleando los correspondientes análisis estadísticos que proporcionen la información adecuada para la identificación de los compuestos denominados "*hit*" (posibles "compuestos candidatos"). En una segunda etapa, se procede a reiterar el ensayo, dado que la estimación de actividades basadas en medidas repetidas son menos variables que aquéllas basadas en una única

medida. Los replicados reducen el número de falsos positivos sin incrementar el número de falsos negativos. De esta forma, luego de efectuar el análisis correspondiente de los datos obtenidos y comparando con los datos del primer monitoreo, es posible discriminar aquellos compuestos que arrojan valores erróneos en el primer análisis de los que muestran un comportamiento congruente a lo largo de las diferentes mediciones, denominados “compuestos candidatos”. A continuación, estos compuestos candidatos son sometidos a una serie de pruebas que permiten su caracterización: determinación de la toxicidad y de la dosis efectiva, entre otras. Luego del estudio de los compuestos candidatos, y una vez confirmado su potencial, los compuestos denominados “hit” pasan a llamarse “leads”, y serán los líderes a ser analizados en fases clínicas de análisis para asegurar el descubrimiento de una nueva droga (Fig.7).

En todo ensayo deben incluirse controles positivos y negativos, fundamentales para ayudar a identificar variaciones entre placas y establecer el nivel de *background* para el ensayo.

Por otro lado, es requisito primordial evaluar la calidad del ensayo, de forma de asegurar su aptitud para medir la respuesta biológica deseada empleando el procedimiento desarrollado. Para ello, es necesario evaluar un factor que determina tales propiedades y que es ampliamente utilizado en HTS, el parámetro estadístico  $Z'$  (Fig. 8). Este factor utiliza las desviaciones estándar y medias de los controles negativos y positivos del ensayo, y mide la amplitud que existe entre la media de los controles positivos y la media de los controles negativos del ensayo evaluando el solapamiento que presenta el ensayo entre ambos valores. Una mayor superposición de positivos y negativos implica mayor probabilidad de contemplar falsos positivos y falsos negativos en los resultados obtenidos. Sin embargo, para contar con ensayos que brinden resultados confiables y representativos se debe asegurar que la diferencia entre la muestra (compuesto) y los controles del ensayo desarrollado sea lo suficientemente amplia, permitiendo identificar aquellos compuestos que presenten el efecto buscado y, a su vez, minimizar los falsos positivos. El factor  $Z'$  toma valores entre 0 y 1. La interpretación del valor  $Z$  se muestra en la Tabla V (Zhang y col., 1999).

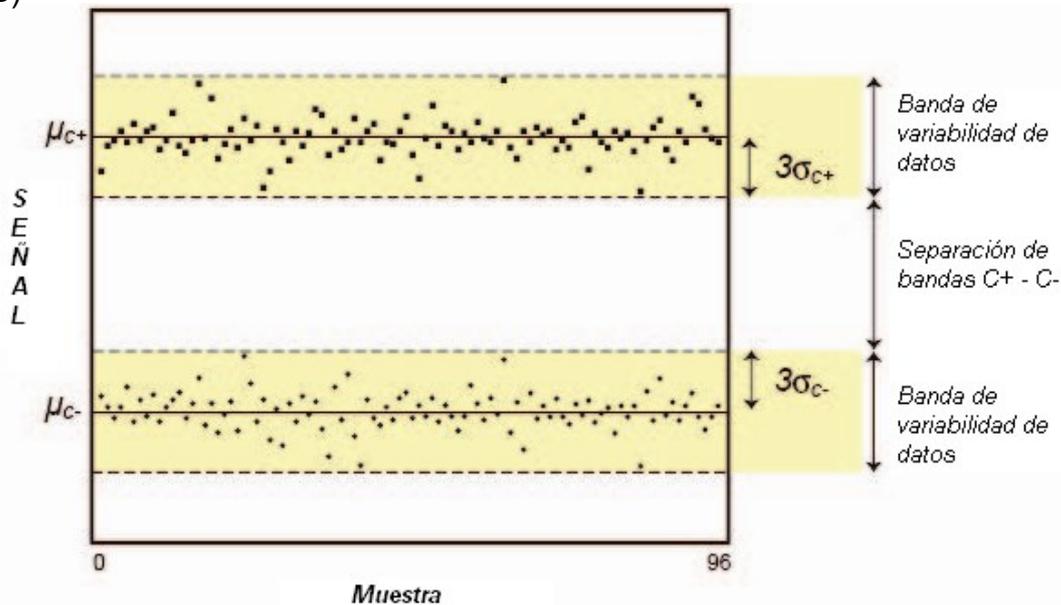


**Fig. 7:** Desde un eventual procedimiento de HTS hasta el descubrimiento de una nueva droga (Adaptado de Malo y col., 2006).

(A)

$$Z' = 1 - \frac{3 \times (\sigma_{C+} + \sigma_{C-})}{|\mu_{C+} - \mu_{C-}|}$$

(B)

**Fig. 8:** Factor  $Z'$ .

(A) ecuación para el cálculo del factor  $Z'$ :  $\sigma_{C+}$ ,  $\sigma_{C-}$  desviación estándar de los controles positivos y negativos, respectivamente;  $\mu_{C+}$ ,  $\mu_{C-}$ : promedio de los controles positivos y negativos, respectivamente.

(B) Representación de la señal obtenida para cada muestra analizada utilizando un ensayo de HTS. Se observan claramente la separación adecuada entre los valores obtenidos para los controles positivos y negativos (C+ y C-). Cada banda de variabilidad de datos se calcula como el valor promedio de cada control ( $\mu_{C+}$ ,  $\mu_{C-}$ )  $\pm 3\sigma$  de cada control. De esta forma, aquellos compuestos que muestren una señal comprendida entre dichas bandas serán considerados compuestos sin efecto, mientras que aquellos que exhiban señales por afuera de dichos rangos, y que, por lo tanto, muestren una respuesta diferente a la obtenida con los controles, serán considerados compuestos candidatos.

**Tabla V:** Interpretación de los valores  $Z'$  para un ensayo de HTS.

Factor $Z'$	Interpretación del ensayo
1	<b>Ideal:</b> no existe superposición entre los valores positivos y negativos detectados por el ensayo
0,5 -1	<b>Excelente:</b> existe una buena separación entre los valores positivos y negativos detectados por el ensayo
0 - 0,5	<b>Marginal:</b> es aceptable pero debería mejorarse, la superposición entre positivos y negativos es elevada y puede arrojar valores falsos positivos y falsos negativos
< 0	<b>No es útil</b> dado que existe demasiada superposición entre los valores positivos y negativos detectados por el modelo

Como conclusión, cualquier ensayo a emplear en HTS debe idealmente presentar un valor  $Z'$  superior a 0,5 y tan próximo a 1 como sea posible.

### 10.3. Uso de bibliotecas de compuestos

Uno de los objetivos esenciales de la química medicinal es el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos. Durante siglos, los químicos aislaron los principios activos de sus fuentes naturales como extractos y los estudiaron, lo que dio origen a esta nueva ciencia. Sin embargo, con el desarrollo de nuevos métodos de separación se demostró que, generalmente, un solo compuesto presente en estos extractos era el responsable de la acción curativa.

Los productos naturales presentan la habilidad de interactuar con más de un *target*, lo cual representa un importante punto de inspiración para el diseño de análogos estructurales que cuenten con una mejora en el perfil farmacológico (Belluti y col., 2010).

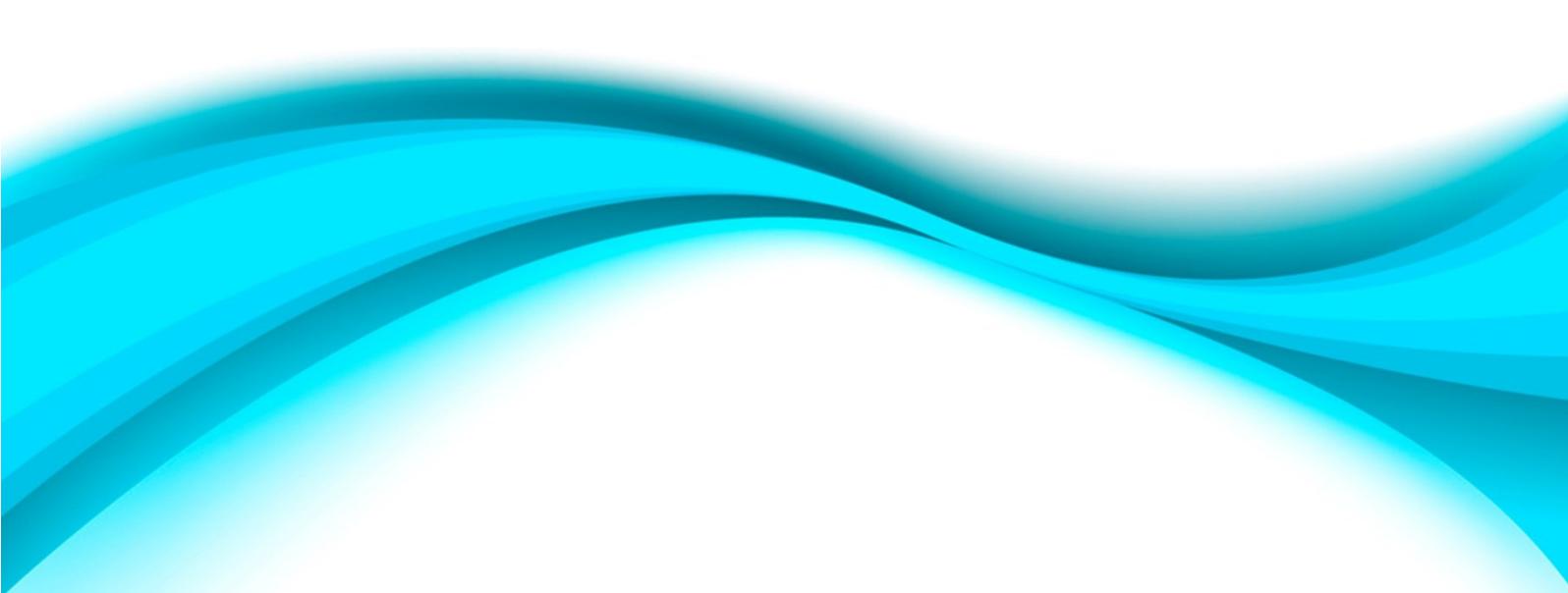
El alto nivel de integración entre la química, la física y la biología en los últimos tiempos ha hecho que la búsqueda de compuestos con propiedades curativas se realice de manera más racional, mediante el estudio más detallado de las bases moleculares de las enfermedades. Este fenómeno ha hecho posible la generación de medicamentos cada vez más específicos y con reducido número de efectos colaterales. Mediante la síntesis de nuevas moléculas con propiedades más puras y conocidas se ha podido simular el comportamiento de compuestos naturales.

Una vez identificado el blanco, uno de los pasos críticos del proceso es encontrar nuevos compuestos que se unan a él en forma selectiva. Históricamente, este descubrimiento era un proceso en serie en el que se evaluaban y optimizaban los compuestos uno por uno, a través de ensayos biológicos a partir de una biblioteca de compuestos químicos sintéticos. Poseer una biblioteca de este tipo lo más grande posible garantizaba la diversidad y variabilidad que permitía encontrar algún compuesto y utilizarlo para mejorar sus propiedades con el objetivo de su comercialización. Este compuesto que sirve de punto de partida se conoce como compuesto líder.

Simultáneamente, el surgimiento de nuevas tecnologías como es el caso de la química combinatoria, que permite la síntesis química de bibliotecas conteniendo entre 1.000 y 100.000 compuestos (Ellman y col., 1997), ha hecho que las bibliotecas se puedan generar para su utilización en estudios específicos, de manera que no sea necesario depender sólo de la biblioteca acumulada históricamente. A esta metodología se le unió otra tecnología conocida como *HTS*, que cambió en forma

significativa la manera de enfrentar el problema. Este método consiste en la utilización de robots para ensayar varios cientos de miles de compuestos en forma simultánea.

En la actualidad se han combinado robots para la síntesis de bibliotecas combinatorias con aquéllos que realizan los ensayos biológicos. De esta forma, se concibe un proceso cada vez más masivo. La generación y evaluación rápida de bibliotecas combinatorias es una tecnología ampliamente difundida que ha permitido seleccionar una gran variedad de moléculas como potenciales candidatos a medicamentos (Gallop y col., 1994; Gordon y col., 1994; Warr, 1997).



# OBJETIVOS

“Establecer metas es el primer paso para convertir lo invisible en visible”  
Anthony Robbins

## **OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general del presente trabajo de tesis consiste en la generación de una nueva línea celular reportera que responda a los interferones (IFNs) de tipo I humanos. Esta herramienta biológica será empleada para la identificación y caracterización de nuevas moléculas, seleccionadas a partir de bibliotecas de compuestos naturales y sintéticos, que demuestren capacidad para interferir en forma sinérgica o antagónica con la actividad de los IFNs de tipo I. Dado que el IFN, desde el punto de vista clínico, presenta un comportamiento disociado, se busca, por un lado, incrementar su eficacia terapéutica en aquel grupo de patologías que requieran su administración como medicamento y, por el contrario, bloquear sus efectos adversos en aquel conjunto de enfermedades en las que el IFN producido por el propio individuo constituye parte de su etiología. En conclusión, el hallazgo de moléculas con las mencionadas propiedades contribuiría a mejorar las terapias actuales aplicadas al tratamiento del cáncer y de las enfermedades virales y autoinmunes.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- A- Generación de nuevas líneas celulares que respondan a los IFNs humanos de tipo I (hIFNs-I). Para ello, se expresará en líneas celulares de origen humano, la proteína de fluorescencia verde mejorada (EGFP) bajo el promotor Mx2 murino, inducible por hIFNs-I.
- B- Puesta a punto del bioensayo denominado ensayo de gen reportero (EGR) para la cuantificación biológica de los hIFNs-I. Validación de las nuevas líneas celulares obtenidas (Mx2/EGFP) con respecto a su capacidad para responder frente a la adición de los principales hIFNs-I (hIFN- $\alpha$  e hIFN- $\beta$ ).
- C- Comparación del nuevo EGR con los bioensayos realizados con las líneas celulares habitualmente utilizadas *in vitro* para cuantificar actividad biológica antiproliferativa y antiviral de los hIFNs-I..
- D- Monitoreo de bibliotecas de compuestos naturales y sintéticos proporcionados por el Dr. Florenz Sasse (*Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung (HZI), Braunschweig, Alemania*) y el Dr. Dieter Kaufmann (*Institut für Organische Chemie der TU Clausthal, Hannover, Alemania*) y los Dres. Mercedes González y Hugo

Ceretto (Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay), empleando los bioensayos basados en las nuevas líneas celulares obtenidas, susceptibles a estimulación con los hIFNs-I.

- E- Caracterización de los compuestos que modulen la actividad biológica del hIFN-I. Para ello, se evaluará la acción sinérgica o antagónica *in vitro* sobre la actividad antiproliferativa y antiviral del hIFN-I. Paralelamente, para aquellos compuestos seleccionados, se analizará su toxicidad a nivel de líneas celulares, su efecto sobre las fases del ciclo celular y su capacidad para inducir o inhibir la apoptosis.

# MATERIALES Y MÉTODOS

“Cada logro que vale la pena, grande o pequeño, tiene sus etapas y el triunfo; un principio, una lucha y una victoria”

*Mahatma Gandhi*

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Reactivos y soluciones

Excepto en los casos donde se aclara expresamente, todas las soluciones acuosas fueron preparadas con agua ultra pura obtenida por osmosis inversa (resistividad 18,2 M $\Omega$ .cm) y filtración (0,22  $\mu$ m), empleando un equipo Milli Q<sup>UF</sup> (Millipore, Francia). Todos los reactivos fueron de grado de pureza analítica.

### 2. Medios de cultivo

#### 2.1. Para células de mamíferos

Los medios de cultivos utilizados para el crecimiento de células de mamíferos fueron esterilizados mediante filtración utilizando filtros estériles con un tamaño de poro de 0,22  $\mu$ m (Steritop, Millipore). Para controlar la esterilidad, una vez filtrados, se realizaron controles de cada medio de cultivo durante 48 h a 37°C y temperatura ambiente.

El suero fetal bovino (SFB) (PAA, EE.UU) empleado para la suplementación de los medios de cultivo se descomplementó mediante incubación en baño de agua termostatzado a 56°C durante 30 min.

Los medios de cultivo utilizados para cada línea celular se describen a continuación:

- **Células HeLa y A549**

Para el crecimiento de las células se utilizó el medio de cultivo D-MEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) suplementado con SFB 10% (V/V), glutamina 2mM, sulfato de gentamicina 0,050 mg/ml. Para la mayoría de los ensayos, se utilizó el mismo medio suplementado con 2% (V/V), glutamina 2 mM, sulfato de gentamicina 0,050 mg/ml.

- **Células WISH, HEp-2 y MDBK**

Para el crecimiento de las células se utilizó el medio de cultivo MEM (*Minimum Essential Medium*, Gibco) suplementado con SFB 10% (V/V), glutamina 2mM, sulfato de gentamicina mg/ml. Para la mayoría de los ensayos, se utilizó el mismo medio suplementado con 2% (V/V), glutamina 2 mM, sulfato de gentamicina mg/ml.

- **Células HEL 92.1.7**

Para el crecimiento de las células se utilizó el medio de cultivo RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*, Gibco) suplementado con SFB 10% (V/V), glutamina 2mM, sulfato de gentamicina 0,050 mg/ml.

- **Células MCF7 y Caco-2**

Para el crecimiento de las células se utilizó el medio de cultivo EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*, Gibco) suplementado con SFB 10% (V/V), glutamina 2mM, sulfato de gentamicina 0,050 mg/ml.

- **Células NIH3T3S1CS2YIRF7mCherry**

Para el crecimiento de las células se utilizó el medio de cultivo D-MEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) suplementado con SFB 10% (V/V), glutamina 2mM, sulfato de gentamicina 0,050 mg/ml, G-418 1 mg/ml, puromicina 2,5 µg/ml.

## 2.2. Para cepas bacterianas

La esterilización de los medios de cultivo para cepas bacterianas se realizó en autoclave durante 15 min a 1 atmósfera a 120°C.

El medio LB (Luria-Bertani) compuesto por triptona (Sigma) 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 10 g/l, ajustado a pH a 7,2 con NaOH 4 N, fue utilizado para el crecimiento bacteriano en medio líquido.

Para el crecimiento de clones resistentes a Kanamicina (IVAX, Argentina) se utilizó el caldo LB suplementado con Kanamicina 100 µg/ml.

Para el crecimiento de cepas bacterianas en medio sólido, se utilizó medio LB Agar (Sigma) 2% (P/V). Este medio se preparó mediante el agregado de agar al caldo LB descrito previamente. El medio agar LB fue suplementado con kanamicina 100 µg/ml para la selección de clones bacterianos. El agregado del antibiótico se realizó sobre el medio estéril fundido y atemperado hasta una temperatura próxima a los 50°C, ya que el mismo es termolábil. Una vez homogeneizado correctamente, se procedió a adicionar 15 ml del mismo sobre placas de petri de 90 mm de diámetro.

## 3. Líneas celulares, cepas bacterianas y cepas virales

- **WISH** (ATCC® CCL-25™) (Hayflick L., 1961): Es una línea celular epitelial adherente, derivada de tejido amniótico humana, susceptible a la infección con el virus de la estomatitis vesicular (VSV). Esta línea celular fue cedida gentilmente por el

Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas “Dr. Julio Maiztegui” Buenos Aires, Argentina. La misma fue utilizada para la generación de la línea reportera así como para los controles necesarios para validar el ensayo de gen reportero desarrollado.

- **MDBK** (*Madin-Darby Bovine Kidney*) (ATCC® CCL-22™) (Madin y Darby, 1958): Son células bovinas epiteliales adherentes, derivadas de riñón de un animal adulto normal, susceptibles a la infección con el virus VSV. Fueron obtenidas de la Asociación Banco Argentina de Células (ABAC, Buenos Aires, Argentina). Se utilizaron para la valoración biológica de IFN- $\alpha$ 2a e IFN- $\alpha$ 2b y para la validación de las líneas reporteras generadas.

- **A549** (ATCC® CCL-185™) (Giard DJ., 1972): Es una línea celular epitelial adherente, derivada de adenocarcinoma alveolar humano, susceptible a la infección con el virus VSV. Fueron cedidas gentilmente por el Instituto Pasteur de Montevideo (Montevideo, Uruguay). Esta línea fue utilizada para la generación de la línea reportera y para su validación.

- **HEp-2** (Moore AE., 1955) (ATCC® CCL23™): Es una línea celular epitelial adherente, derivada de carcinoma epitelial humano, susceptibles a la infección viral con adenovirus humano 3, poliovirus 1 y VSV. Fueron cedidas gentilmente por el Instituto Pasteur de Montevideo (Montevideo, Uruguay), y se utilizaron para la generación de la línea celular reportera y para su validación.

- **HeLa** (*Henrieta Lacks*) (ATCC® CCL2™) (Scherer WF., 1953): Es una línea celular epitelial adherente, proveniente de adenocarcinoma cervical humano, susceptibles a la infección viral con virus VSV, poliovirus humano 1,2 y 3, adenovirus humano 3 y virus de la encefalomiocarditis. Fueron cedidas gentilmente por el Instituto Pasteur de Montevideo (Montevideo, Uruguay) y se emplearon para generar la línea celular reportera y su validación.

- **Caco-2** (ATCC® HTB37™) (Fogh J., 1975): Es una línea celular epitelial adherente, derivada de un adenocarcinoma colorectal humano, susceptible a la infección viral con virus de la inmunodeficiencia humana 1 (HIV). Fueron cedidas muy gentilmente por el Instituto Pasteur de Montevideo (Montevideo, Uruguay) y se utilizaron para generación de líneas reporteras.

- **MCF7** (*Michigan Cancer Foundation-1*) (ATCC® HTB22™) (Soule HD., 1973): Es una línea celular epitelial adherente proveniente de un adenocarcinoma de glándulas mamarias humano. Fueron cedidas por el Instituto Pasteur de Montevideo (Montevideo, Uruguay) y se utilizaron para la generación de líneas reporteras.

- **HEL 92.1.7** (ATCC® TIB 180™) (Papayannopoulou T., 1983): Es una línea celular de eritroblastos de médula ósea humana. Su crecimiento es en suspensión. La línea celular fue gentilmente cedida por el Instituto Pasteur de Montevideo (Montevideo, Uruguay) y la misma se empleó para la generación de las líneas celulares reporteras.

- **NIH3T3S1CS2YIRF7mCherry**: Es una línea celular de fibroblastos murinos. Su crecimiento es en adherencia. Esta línea celular es reportera de la actividad de los IFNS-I y de su vía de activación. La misma fue modificada genéticamente y contiene una construcción BAC, con las secuencias IRF7→mCherry, STAT1-YFP y STAT2-CFP. La misma fue cedida gentilmente por el Dr. Mario Köster del Instituto HZI (Braunschweig, Alemania)

- La cepa bacteriana *Escherichia coli* DH5αF'1q fue cedida gentilmente por el Dr. Jorge Zorzópolos (Fundación Pablo Cassará; Ciudad autónoma de Buenos Aires, Argentina). Se empleó para el aislamiento y la amplificación de los plásmidos.

- El virus de la estomatitis vesicular (VSV), cepa Indiana, fue cedido gentilmente por el Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui" y fue utilizado para los ensayos de valoración biológica antiviral *in vitro* de los rhIFNs para validar el ensayo de gen reportero desarrollado.

#### 4. Sistemas de cultivo de células

Todas las líneas celulares eucariotas se cultivaron en estufa gaseada a 37°C, en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% saturada de humedad (Nuair, EE.UU).

Para el cultivo de las mismas, se emplearon los siguientes sistemas de cultivo:

- Placas multipozos de poliestireno (Greiner, Alemania) de 96, 24, 12 y 6 pozos con una superficie de 0,4; 2,0; 5,0 y 9,6 cm<sup>2</sup> por pozo respectivamente.
- Frascos T (Greiner, Alemania) de 25, 75 y 175 cm<sup>2</sup> de superficie.

En todos los casos se mantuvo una relación constante de 0,4 ml de medio de cultivo por cada  $\text{cm}^2$  de superficie según lo establecido por Freshney (2000a).

Las células que presentan un crecimiento en adherencia a un sustrato, forman una monocapa. Para su propagación es necesario liberarlas del sustrato por medios mecánicos o enzimáticos. Cuando los cultivos alcanzaron la confluencia, es decir, crecieron formando una monocapa en la totalidad de la superficie de los frascos o placas sobre los cuales estaban multiplicándose, se procedió a retirar el sobrenadante y lavar la monocapa celular con una solución de tripsina-EDTA, compuesta por tripsina (Gibco) 0,05% (P/V) y  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (Gibco) 0,02% (P/V) en buffer fosfato salino [PBS:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma) 0,60 g/l,  $\text{NaHPO}_4$  (Sigma) 0,78 g/l, NaCl 8,80 g/l, pH 7,4] durante 15 s a temperatura ambiente con el objetivo de neutralizar los factores antitripsina presentes en el SFB. Se respetó una relación de 20  $\mu\text{l}$  de solución de tripsina-EDTA por cada  $\text{cm}^2$  de superficie. Luego de eliminar la solución de lavado, se agregó nuevamente la misma proporción de la solución de tripsina-EDTA, dejándola actuar el tiempo necesario para cada línea celular empleada, que permita el desprendimiento completo de las células adheridas a la superficie. A continuación, se agregó el medio de cultivo correspondiente, suplementado con SFB, para neutralizar la tripsina y homogeneizar la suspensión celular de tal forma de obtener las células en suspensión.

Las células procariontas se cultivaron en estufa a  $37^\circ\text{C}$ , utilizando placas de Petri de 90 mm de diámetro para el cultivo en medio sólido y tubos cónicos de 50 ml o erlenmeyers de 250 ml y 500 ml para el crecimiento en medio líquido.

## **5. Determinación de la concentración de células viables, muertas y totales**

El recuento celular se realizó en cámara de Neubauer, estimando la proporción de células muertas por el método de exclusión con azul de tripán, un colorante supravital (Cook y Mitchell, 1989). Esta técnica está basada en la permeabilidad de la membrana celular a los colorantes. Las células no viables tienen alterada la permeabilidad de su membrana y por consiguiente permiten el ingreso de ciertos colorantes a su interior. Como resultado se las observa de color celeste o azul; mientras que aquellas células que se están viables, mantienen intacta su membrana celular y no son permeables a dichos colorantes, motivo por el cual se las observa blancas y refringentes al microscopio óptico.

Con este fin, la suspensión celular se incubó con una solución de tripán 0,4% (V/V) en PBS durante aproximadamente 1 min y luego se sembró la misma sobre una cámara de recuento, empleando cada caso particular, la dilución conveniente según la densidad

celular de la muestra. Se contaron las células vivas y muertas, contenidas en cada uno de los cuadrantes de los extremos.

La concentración de células ( $X$ ), (ecuación 1) ya sean vivas o muertas, se determinó según la siguiente ecuación:

$$X \left( \frac{\text{cél}}{\text{ml}} \right) = N^{\circ} \text{ de células contadas} \times 10^4 \times \frac{1}{4} \times \frac{1}{\text{dilución}} \quad (1)$$

La viabilidad del cultivo 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 ( $X_M$ ) y vivas ( $X_V$ ).

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{X_V}{X_T} \times 100 \quad (2)$$

## 6. Criopreservación de líneas celulares de mamífero

Una vez que se ha obtenido una línea celular o bien un clon celular con las características deseadas y libre de contaminación, es fundamental su conservación. La criopreservación constituye un método eficaz de conservación de células que garantiza el mantenimiento de sus propiedades metabólicas iniciales (Hasegawa, 1996; Freshney, 2000b). La conservación en nitrógeno líquido es uno de los métodos usualmente empleado para preservar líneas celulares (Freshney, 2000c).

El daño celular inducido por el congelamiento y la descongelación es causado por la formación de cristales de hielo intracelulares y por efectos osmóticos (Hay, 1986). La adición de un agente crioprotector, como el glicerol o el dimetil sulfoxido (DMSO) (Lovelock y Bishop, 1959), y el empleo de una velocidad lenta de enfriamiento, aproximadamente 1°C por min (Leibo y Mazur, 1971), minimizan éstos efectos negativos.

La conservación de las líneas y clones celulares se realizó en nitrógeno líquido, ya que a temperaturas de -196°C se observaron deterioros celulares mínimos (Green y col., 1967). Para dicho fin, se utilizó el dispositivo MrFrosty® (Nalgene®, EE.UU.) que permite el enfriamiento gradual y escalonado desde temperatura ambiente hasta -196°C con una velocidad de enfriamiento de -1°C/min.

La criopreservación de líneas y clones celulares se llevó a cabo durante la etapa de crecimiento exponencial de dichas células. Para ello, se obtuvieron las suspensiones celulares y se les realizó el recuento celular correspondiente, de forma de determinar el

volumen necesario de dicha suspensión a ser centrifugada. Las suspensiones celulares se centrifugaron a 800 rpm durante 10 min a temperatura ambiente en una centrífuga eppendorf 5403, rotor 16A4-44 (Alemania). Este procedimiento se realizó a baja velocidad para asegurar una buena viabilidad celular. Luego de la centrifugación, se descartó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en una solución de SFB y DMSO (Sigma) en una relación 95:5 (V/V), de manera de obtener una concentración de  $1-2 \times 10^6$  cel/ml. La suspensión celular se distribuyó a razón de 1 ml por criotubo (Greiner). Los criotubos se colocaron inmediatamente en el dispositivo MrFrosty® (Nalgene®) y el mismo se conservó a  $-70^\circ\text{C}$  durante 24 h. Finalmente, los criotubos se almacenaron en termos de  $\text{N}_2$  líquido a  $-196^\circ\text{C}$ .

## 7. Criopreservación de cepas bacterianas

Para la conservación de bacterias, ya sea *wild type* o recombinantes, se procedió a cultivarlas durante 18 h a  $37^\circ\text{C}$  en medio LB o medio LB suplementado con ampicilina o kanamicina, respectivamente. Posteriormente se tomaron 800  $\mu\text{l}$  del cultivo y se le adicionaron 200  $\mu\text{l}$  de glicerol (Merck, Alemania) estéril, homogeneizando para asegurar la distribución del glicerol. Finalmente fueron conservadas a  $-70^\circ\text{C}$  (Sambrook y col., 1989<sup>a</sup>).

## 8. Revitalización de líneas celulares de mamífero

La descongelación rápida de la suspensión celular es esencial para su óptima recuperación. Para la revitalización de las líneas celulares criopreservadas se retiró el criotubo del termo de  $\text{N}_2$  líquido y se lo sumergió inmediatamente en un baño de agua a  $37^\circ\text{C}$ . La suspensión celular descongelada se transfirió a un tubo cónico con 40 ml de medio de cultivo y se centrifugó a 800 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Este procedimiento se llevó a cabo con el objetivo de lavar las células, eliminando el DMSO que es un reactivo tóxico para las células en cultivo. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular se resuspendió en un volumen de medio de cultivo apropiado. Finalmente, se realizó el recuento celular con el objetivo de evaluar la recuperación y la viabilidad celular.

## 9. Revitalización de cepas bacterianas

Para recuperar las bacterias congeladas, se tomó una pequeña porción del material con un ansa o con un tip desde la superficie del cultivo celular congelado e

inmediatamente se sumergió en medio de cultivo LB para bacterias *wild type* y LB suplementado con el antibiótico correspondiente para cepas recombinantes. El criotubo se conservó nuevamente a  $-70^{\circ}\text{C}$  y el cultivo se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. (Sambrook y col., 1989a).

## **10. Construcción de vectores para expresión en células eucariotas conteniendo el promotor Mx2, inducible por IFNs-I (IFNs-I), dirigiendo la expresión de la proteína verde fluorescente (EGFP)**

### **10.1. Técnicas de biología molecular para clonado**

#### **10.1.1. Preparación de células de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ F'1q competentes**

La mayoría de los métodos para transformar bacterias están basados en las observaciones de Mandel e Higa (1970), quienes demostraron que las bacterias tratadas con soluciones frías de  $\text{CaCl}_2$  y sometidas inmediatamente a un breve shock con calor se transformaban con el ADN del bacteriófago  $\lambda$ . El mismo método fue subsecuentemente empleado para transformar bacterias con ADN plasmídico (Cohen y col., 1972). Aparentemente, dicho tratamiento induce un estado transitorio de "competencia" de las bacterias receptoras, durante el cual son capaces de incorporar ADN de diferentes orígenes. Se han desarrollado muchas variantes de la técnica original con el objetivo de optimizar la eficiencia de transformación de diferentes cepas.

Para la generación de las bacterias competentes DH5 $\alpha$ F'1q se comenzó con la preparación de un cultivo *starter* a partir de un stock de *E coli* DH5 $\alpha$ F'1q conservado a  $-70^{\circ}\text{C}$ , generado previamente, en medio de cultivo LB sin antibiótico y se lo hizo crecer a  $37^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche con agitación a 200 rpm. A continuación, se tomaron 500  $\mu\text{l}$  de dicho cultivo y se colocaron en un frasco erlenmeyer con 50 ml de caldo LB suplementado con 10 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 0,2% de glucosa, efectuando de esta forma una dilución 1:100 desde el cultivo *starter*. El  $\text{Mg}^{++}$  10 mM presente en el medio favorece la eficiencia de transformación y la glucosa incrementa la tasa de crecimiento. El cultivo se desarrolló durante 2 h 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ , en un agitador *shaker* a 200 rpm, monitoreando el crecimiento mediante la lectura de la densidad óptica (DO) a 550 nm. Una vez que el cultivo alcanzó una DO igual a 0,5 las células fueron trasvasadas asépticamente a un tubo de centrifuga estéril, previamente enfriado, y se incubaron durante 10 min en baño de hielo. Las bacterias se cosecharon mediante centrifugación a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 min a una velocidad de 1.500 rpm. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular se resuspendió en 500  $\mu\text{l}$  de medio LB suplementado con 10 mM

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y 0,2% de glucosa frío. Luego se agregaron 2,5 ml de “*storage solution*” [caldo LB suplementado con 36% de glicerol, 12% polietilenglicol (PEG) (MW7500), 12 mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O]. Esta solución se esterilizó mediante filtración y se homogeneizó adecuadamente sin emplear vortex. Finalmente, la suspensión de bacterias competentes fue fraccionada en tubos eppendorf en un volumen de 50 µl y conservadas a -70°C hasta su utilización.

Para corroborar que durante el preparado de las bacterias competentes no haya habido contaminación con otras cepas bacterianas, alícuotas de las mismas fueron sembradas sobre placas de: medio LB agar; medio LB agar suplementado con ampicilina y medio LB agar suplementado con kanamicina.

### 10.1.2. Transformación de células competentes

Para llevar a cabo la transformación de células competentes, se descongeló uno de los viales preparados previamente y conservados a -70°C y se mezclaron con 1 µl del plásmido a amplificar, en el presente trabajo el vector pEGFP-C1 (Clontech) o bien con 10 µl de la mezcla de ligación, y se incubaron durante 30 min en baño de hielo. Posteriormente, cada uno de los tubos se colocó durante 2 min en un baño a 42°C e inmediatamente se transfirió a un baño de hielo durante otros 2 min para generar el *shock* térmico. Se adicionaron 700 µl de medio LB sin antibiótico y se las incubó durante 1 h a 37°C con agitación a 200 rpm con el objetivo de permitir la recuperación de las células luego del estrés al que fueron sometidas. Transcurrido dicho tiempo, las células se recuperaron mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante dejando 100 µl del mismo con el que se resuspendió el *pellet* celular. Finalmente, la suspensión celular, correctamente homogeneizada, se distribuyó en forma homogénea sobre una placa de petri conteniendo agar LB suplementado con kanamicina, de forma tal de poder seleccionar las bacterias transformadas. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C.

### 10.1.3. Preparación de ADN plasmídico

Los plásmidos fueron purificados a partir de cultivos en medio líquido conteniendo el antibiótico apropiado. Todos los métodos de purificación de ADN plasmídico se basan en el tamaño relativamente pequeño y la naturaleza circular de los plásmidos, en comparación con las moléculas lineales y de gran tamaño molecular del ADN cromosómico celular.

### 10.1.3.1. Minipreparación de ADN plasmídico

Con el fin de obtener cantidades suficientes del vector de expresión para realizar el clonado molecular del Mx2/EGFP, se realizó una preparación de ADN plasmídico a pequeña escala (miniprep) empleando el *kit* comercial WIZARD® Plus SV Minipreps DNA purification system (Promega, EE.UU). Para ello, se descongeló un criotubo de células transformadas con el plásmido pEGFP-C1, se tomó una pequeña alícuota y se inoculó un frasco conteniendo 5 ml de medio LB suplementado con kanamicina, amplificando de esta forma, el cultivo. El mismo se incubó durante 18 h a 37°C en agitación. Luego, se procedió a la preparación del ADN plasmídico, siguiendo las instrucciones del fabricante, detalladas a continuación:

1. Se tomaron 3 ml del cultivo en un tubo eppendorf y se centrifugó a 10.000 *g* durante 10 min. Se descartó el sobrenadante.
2. Se resuspendió el *pellet* celular con 250  $\mu$ l de *Solución de Resuspensión* y posteriormente se adicionaron 250  $\mu$ l de *buffer de Lisis Celular*, invirtiendo el tubo 4 veces e incubando a temperatura ambiente entre 3-5 min.
3. Luego se adicionaron 10  $\mu$ l de *Solución de Proteasa Alkalina* y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min.
4. Se agregaron 350  $\mu$ l de *Solución de Neutralización*, invirtiendo el tubo varias veces. Se dejó reposar durante 3 min y se centrifugó a 13.000 *g* durante 5 min.
5. Luego se tomó el sobrenadante (aproximadamente 850  $\mu$ l) y se transfirió a una columna de purificación, colocada dentro de un tubo colector. Se centrifugó a 13.000 *g* durante 1 min y se descartó el *flowthrough*.
6. Se agregaron a la columna 750  $\mu$ l de *Solución de Lavado*, se centrifugó 1 min a 13.000 *g* y se repitió el lavado con 250  $\mu$ l, centrifugando durante 2 min.
7. Posteriormente se transfirió la columna de purificación a un tubo eppendorf nuevo y el ADN plasmídico fue eluido mediante el agregado de 100  $\mu$ l de agua Milli Q autoclavada sobre la resina de la columna y centrifugando 1 min a 13.000 *g*.

Este procedimiento fue llevado a cabo con el objetivo de obtener una pureza y concentración adecuada de los vectores construidos para secuenciar los mismos y emplearlos posteriormente, en experimentos de transfección de células eucariotas.

### 10.1.3.2. Maxipreparación de ADN plasmídico

Una vez generado el plásmido de expresión en sistemas eucariotas, el mismo se purificó y amplificó mediante preparación de ADN plasmídico a gran escala (Maxipreparación), cuyo protocolo se detalla a continuación.

1. A partir de colonias individuales de cultivos en medio Agar-LB suplementado con kanamicina, se inocularon frascos conteniendo 5 ml de medio LB-kanamicina y se dejaron crecer 16-20 h a 37°C con agitación a 180 rpm. Con este cultivo se inoculó un erlenmeyer conteniendo 250 ml de medio LB suplementado con kanamicina y nuevamente se incubó durante 16-20 h a 37°C con agitación a 180 rpm.
2. Se centrifugó el cultivo a 400 g y a 4°C. El *pellet* de bacterias fue resuspendido en 10 ml de TEG (Tris-HCl 25 mM pH 8,30; EDTA 10 mM, glucosa 1% (P/V)) y luego transferido a un tubo falcón de 50 ml e incubado en baño de hielo por 5 min. Se agregaron 20 ml de solución de NaOH 0,2 M, SDS 1% (preparado en el momento), se homogeneizó suavemente y se incubó en hielo durante 3-5 min.
3. Se agregaron 15 ml de solución de NaAc 3 M y se incubó en hielo durante 10-15 min. Se centrifugó durante 10 min a 400 g a 4°C y el sobrenadante se trasvasó a otro tubo falcón de 50 ml filtrando previamente con papel de filtro.
4. Se precipitó el ADN plasmídico agregando 27 ml de isopropanol y centrifugando 20 min a 400 g a 4°C.
5. Se descartó el sobrenadante y el ADN precipitado se resuspendió con 1 ml de solución al 80% Etanol-TN (TN: Tris-HCl 10 mM pH 8,00, NaCl 100 mM), y trasvasado a un tubo eppendorf de 1,5 ml. Se centrifugó durante 1 min a 400 g.
6. Se resuspendió el DNA en 0,8 ml de 0,5 X TE (TE: Tris-HCl 25 mM pH 8,30; EDTA 10 mM) agregando 200 µl de LiCl 10 M (concentración final 2 M) y se dejó en baño de hielo durante 10 min. Se centrifugó 2 min a 13.000 g y se agregaron 0,5 ml de fenol/cloroformo 1:1.
7. Se centrifugó 2 min a 13.000 g y se volvió a precipitar el ADN plasmídico presente en el sobrenadante agregando 600 µl de isopropanol y centrifugando durante 5 min a máxima velocidad.
8. Se lavó el *pellet* con 0,5 ml de 80 % Etanol-TN. El precipitado se disolvió en 0,5 ml de 0,5 X TE conteniendo 100 µg/ml RNase A (Promega, EE.UU.) y se incubó durante 30 min a 37°C.
9. Posteriormente se realizaron dos extracciones sucesivas con fenol/cloroformo y una extracción con cloroformo. Se centrifugó 2 min a 13.000 g y se agregó al

sobrenadante 50  $\mu\text{l}$  de NaAc 3 M (pH 7,00) y 0,5 ml de isopropanol. Luego de una centrifugación de 5 min a 13.000  $g$  se lavó el *pellet* con 0,5 ml de 80% Etanol-TN y finalmente se resuspendió en 0,5 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ .

#### 10.1.4. Determinación de la concentración y pureza del ADN

Los ácidos nucleicos absorben luz ultravioleta debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de sus cadenas. Ésta es una característica propia de la molécula. Los ácidos nucleicos presentan un máximo de absorción a una longitud de onda de 260 nm; por lo tanto, a dicha longitud de onda la absorción es proporcional a la concentración de ADN. Una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a una concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ADN doble cadena (ADNdc).

Se preparó una dilución 1/200 de las muestras de ADN a cuantificar y se determinó la absorbancia a 260 y 280 nm utilizando un espectrofotómetro UV-visible (Ultrospec 2000). Con estos valores se calculó la concentración y pureza de las muestras utilizando las ecuaciones 3 y 4 (Sambrook y col., 1989c)

$$\text{Concentración de ADN} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = DO_{260\text{nm}} \times 50 \frac{\mu\text{gADN}}{\text{ml}} \times \frac{1}{(\text{dilución})} \quad (3)$$

$$\text{Pureza} = \frac{DO_{260\text{nm}}}{DO_{280\text{nm}}} \quad (4)$$

El valor de pureza debe estar comprendido en el rango entre 1,8 y 2,0. Fuera del mismo, la solución no es apta para su uso en transfección de células eucariotas ya que posee una cantidad considerable de contaminantes (proteínas, reactivos utilizados en la purificación del ADN, entre otros) que podrían afectar la eficiencia de la misma.

En ambos casos, la integridad de los plásmidos se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa (sección 10.1.6).

### 10.1.5. Digestiones enzimáticas

Las endonucleasas de restricción reconocen secuencias específicas sobre las hebras de ADN, denominados sitios de restricción. Bajo determinadas condiciones de temperatura y concentración salina, son capaces de digerir el ADN en dichos sitios específicos. Las digestiones con endonucleasas de restricción se realizaron respetando los medio y condiciones recomendados por los proveedores de cada enzima. En todos los casos, la reacción se llevó a cabo durante 2 h a 37°C, empleándose de 1 a 5 U de enzima por cada µg de ADN, en un volumen final de 20 µl.

Luego de las digestiones enzimáticas, los fragmentos se analizaron y separaron mediante electroforesis en geles de agarosa (sección 10.1.6) para su posterior análisis y/o purificación.

### 10.1.6. Electroforesis en geles de agarosa

La separación de ADN en geles de agarosa se realizó empleando el sistema submarino (Sambrook y col., 1989d). Para la preparación del gel, se pesó 1 g de agarosa (Sigma, EE.UU.) y se disolvió en 100 ml de *buffer* TAE (Tris 242 g/l, Na<sub>2</sub>EDTA 19,01 g/l, ácido acético 6 M) en horno microondas hasta completa disolución. Se enfrió la solución a 60°C y se adicionaron 10 µl de bromuro de etidio (Baker, EE.UU.) 10 mg/ml, logrando una concentración final de 0,5 µg/ml. Esta solución se colocó sobre un soporte adecuado y se le colocó un peine de 1 mm de espesor para formar los carriles de siembra, el cual se retiró una vez solidificado. El gel se colocó en una cuba electroforética y se cubrió con *buffer* TAE 1X.

Las muestras de ADN fueron mezcladas con *buffer* de siembra 6X [Ficoll 400 10% (P/V), azul de bromofenol 0,25% (P/V), Na<sub>2</sub>EDTA 50 mM, Tris 10 M pH 7,50] y se sembraron cuidadosamente sobre cada una de las calles del gel. Se tapó la cuba correctamente y se aplicó un voltaje de 80 V hasta observar que los colorantes del *buffer* de siembra migraron a lo largo del gel.

Finalmente, el gel fue examinado utilizando un transluminador UV (UVP, EE.UU.) 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 visible del espectro, correspondiente a 590 nm (rojo-naranja).

Para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN separados se empleó el marcador de masa molecular Benchtop DNA 1 Kb Ladder (Promega).

#### 10.1.7. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Los productos de digestión de peso molecular esperados fueron escindidos del gel de agarosa con un bisturí y purificados utilizando el *kit* comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, EE.UU.), siguiendo las recomendaciones del fabricante, como se describe a continuación:

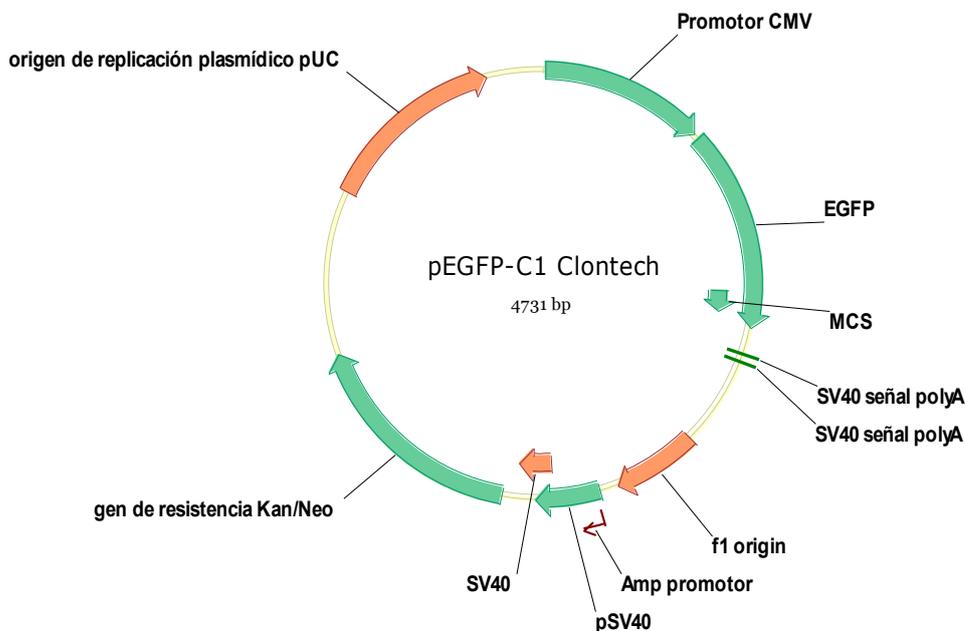
1. Se colocó la fracción de gel separada con bisturí dentro de un tubo eppendorf y se agregaron 3 volúmenes de *buffer QG* por cada volumen de gel (100 mg de gel equivalen aproximadamente a 100  $\mu$ l).
2. Se incubó durante 10 min en baño de agua a 50°C, mezclando por inversión cada 2-3 min.
3. Una vez que el gel de agarosa se disolvió por completo, se adicionó 1 volumen de isopropanol.
4. Se transfirió la muestra a una columna de purificación (*QIAquick spin column*) dentro de su respectivo tubo colector y se centrifugó durante 1 min a 13.000 *g*.
5. Se descartó el *flowthrough* y se agregaron 0,5 ml de *buffer QG* a la columna, volviendo a centrifugar de la misma manera.
6. Para lavar, se agregaron 0,75 ml de *Buffer PE* centrifugando durante 1 min a 13.000 *g*. Se descartó el *flowthrough* y se volvió a centrifugar de la misma manera, para descartar todo el *buffer PE* residual.
7. Se transfirió la columna a otro tubo eppendorf y el ADN fue eluido con 50  $\mu$ l de agua Milli Q autoclavada.

Se chequeó la purificación analizando una alícuota mediante electroforesis en gel de agarosa y se determinó su concentración y pureza mediante lectura espectrofotométrica.

#### 10.1.8. Estrategia diseñada para la generación del vector de expresión pMx2/EGFP

##### 10.1.8.1. Esquema y descripción del plásmido de expresión pEGFP-C1

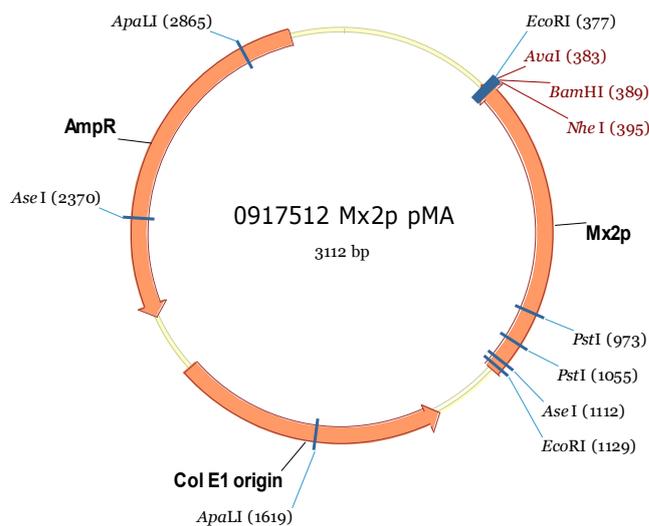
Para generar el vector de expresión pMx2/EGFP se utilizó el plásmido de expresión para células eucariotas denominado pEGFP-C1 (Clontech) (Fig. 9). El mismo tiene una longitud de 4731 pb. El mismo contiene un origen de replicación pUC, un gen de resistencia a kanamicina (Kan R) para la amplificación y selección del ADN en células procariontas, y un sitio de múltiple clonado (*polylinker*) para la inserción del gen o secuencia exógena. Además cuenta con un origen f1 para la producción de DNA simple cadena. Posee además el promotor temprano de citomegalovirus (CMV) precedido por su secuencia enhancer (CMV enh), las cuales van a permitir una alta expresión de la secuencia codificante insertada. Contiene el gen de la proteína reportera *enhancer green fluorescence protein* (EGFP). Las secuencias que flanquean el gen de la EGFP fueron convertidos en secuencias consenso Kosak, que posteriormente favorecerán la eficiencia de traducción en células eucariotas. El sitio de multiple clonado se encuentra entre la secuencia codificante para la EGFP y el sitio SV40 polyA. De esta manera, las secuencias que se clonen en dicha región, se expresarán como proteínas de fusión al sitio C-terminal de la EGFP. Contiene un gen de resistencia a Neomicina (Neo R) que permitirá la selección de las transfectantes con G-418 (neomicina) en células eucariotas. Este antibiótico bloquea la síntesis proteica tanto en células procariontas como eucariota, provocando de esta forma la muerte celular.



**Fig. 9:** Esquema del vector de expresión en células eucariotas, pEGFP-C1 (Clontech, EE.UU).

### 10.1.8.2. Obtención de la secuencia codificante del promotor Mx2

La secuencia correspondiente al promotor Mx2 murino fue sintetizada por GENEART, EE.UU., según la secuencia génica AB086958 (NCBI Genebank). El promotor Mx2 es inducible específicamente por interferones tipo I, ya que contiene dos secuencias consenso de elementos de respuesta a interferón (ISRE1 e ISRE2). El ISRE2 se encuentra en una zona proximal y es conservada en el promotor Mx de varias especies: humana, murina y de pollo entre otros. Esta secuencia es crítica en la activación de dicho promotor por parte de los IFNs (Asano y col., 2003). A continuación se esquematiza el vector 0917514 Mx2p pMA conteniendo la secuencia promotora Mx2 murina (Fig. 10).



**Fig.10:** Secuencia promotora Mx2 murina sintetizada por GENEART.

### 10.1.8.3. Clonado del promotor Mx2 en el vector pEGFP-C1 para obtener el vector de expresión pMx2/EGFP

Para generar el vector de expresión pMx2/EGFP se desarrolló la estrategia esquematizada en la Fig. 11. Para ello, tanto el vector pEGFP-C1 como el vector conteniendo la secuencia del promotor Mx2 fueron digeridos secuencialmente con las enzimas de restricción AseI (New England Biolabs, Inglaterra) y NheI (Promega, EE.UU), mezclando en un tubo de reacción los reactivos que se mencionan en la Tabla VI.

Cada una de las digestiones se realizó en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ , durante 3 h a 37°C.

Luego de la primera digestión, se precipitó el ADN. Para ello, se llevó el volumen de digestión a 200  $\mu\text{l}$  con agua Milli Q estéril, se agregaron 20  $\mu\text{l}$  de NaAc 3 M pH 7,4 y 500  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto. Luego se incubó durante 1 h a -20°C. Se lavó el *pellet* dos veces con etanol 70% (V/V) frío y finalmente, se resuspendió en 17  $\mu\text{l}$  de agua Milli Q autoclavada. A este volumen se le adicionaron 2  $\mu\text{l}$  de *buffer* 10X y 1  $\mu\text{l}$  de la enzima de restricción *NheI*, para llevar a cabo la segunda digestión, incubando nuevamente durante 3 h a 37°C.

**Tabla VI:** Reacción general de digestión de ADN

	Vector pEGFP-C1	Promotor Mx2
<b>Buffer</b>	2 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$
<b>ADN</b>	3,8 $\mu\text{g}$	3,9 $\mu\text{g}$
<b>Enzima</b>	10 UI	10 UI
<b>H<sub>2</sub>O</b>	csp 20 $\mu\text{l}$	csp 20 $\mu\text{l}$

Cada una de las digestiones se realizó en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ , durante 3 h a 37°C.

Luego de la primera digestión, se precipitó el ADN. Para ello, se llevó el volumen de digestión a 200  $\mu\text{l}$  con agua Milli Q estéril, se agregaron 20  $\mu\text{l}$  de NaAc 3 M pH 7,4 y 500  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto. Luego se incubó durante 1 h a -20°C. Se lavó el *pellet* dos veces con etanol 70% (V/V) frío y finalmente, se resuspendió en 17  $\mu\text{l}$  de agua Milli Q autoclavada. A este volumen se le adicionaron 2  $\mu\text{l}$  de *buffer* 10X y 1  $\mu\text{l}$  de la enzima de restricción *NheI*, para llevar a cabo la segunda digestión, incubando nuevamente durante 3 h a 37°C.

Luego, las bandas del ADN digerido se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (sección 10.1.6). A continuación, la banda correspondiente al vector pEGFP-C1 sin el promotor CMV y la banda correspondiente al promotor Mx2 se purificaron desde el gel utilizando el *kit* comercial *QIAquick Gel Extration kit* (sección 10.1.7).

Una vez obtenidos los fragmentos de ADN de interés purificados, se realizó la ligación de los mismos utilizando la enzima T4 DNA Ligasa (Promega, EE.UU). Las ligaciones se incubaron a 16°C durante 18 h. La proporción de vector mas inserto (V+I)

utilizada en las ligaciones fue de 1:2 respectivamente. También se realizó un control de vector religado ( $V_R$ ) (Tabla VII).

Transcurrido dicho tiempo, se utilizó la totalidad de la mezcla de ligación para transformar células competentes *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ F'lq, como se describe en la sección 10.1.8.

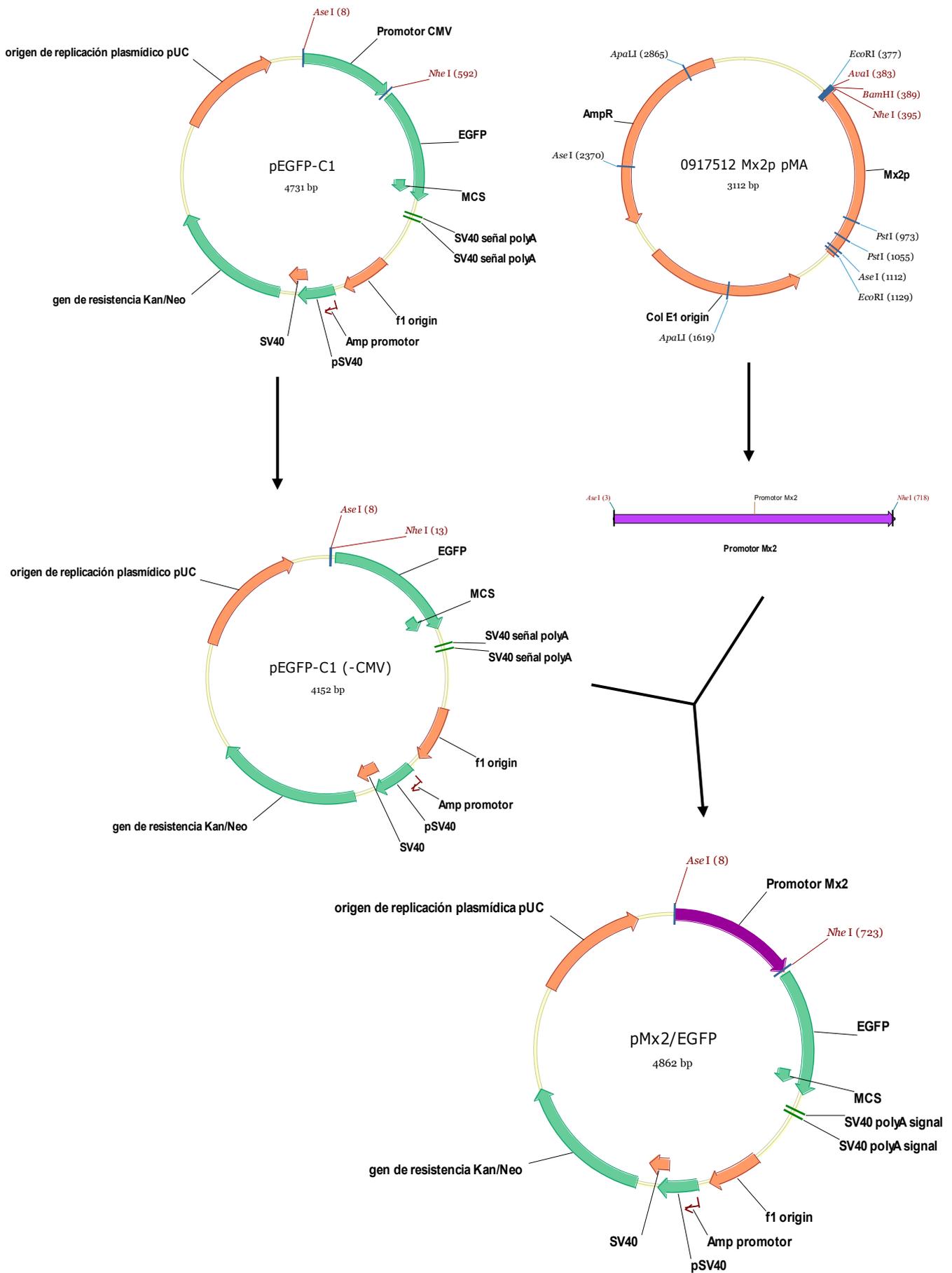
Seguidamente, se seleccionaron colonias individuales de la placa de transformación V+I y se incubó cada una de ellas en 5 ml de medio LB-Ampicilina. Los cultivos se incubaron con agitación a 37°C durante 16-20 h. Luego, se purificó ADN plasmídico de las colonias recombinantes positivas, utilizando el kit comercial *WIZARD® Plus SV Minipreps DNA purification system* (Promega, EE.UU) (sección 10.1.3.1) y se sembraron 5  $\mu$ l de cada preparación en el gel de agarosa. Aquellos plásmidos que presentaron un cambio en la movilidad con respecto al control fueron analizados con enzimas de restricción para confirmar la presencia del inserto correspondiente. Una alícuota de cada uno de los vectores que mostraron diferencia en la migración respecto del control, fue digerido utilizando la enzima *SacI* (Promega, EE.UU).

La secuencia genética del plásmido generado contiene dos sitios de restricción para dicha enzima. De esta forma, luego de la digestión y corrida electroforética deberían observarse un patrón de 2 fragmentos de ADN.

**Tabla VII:** Reacción general de ligación. Se utilizaron los volúmenes de ADN necesarios para las proporciones molares deseadas de vector e inserto, según cuantificación de las muestras.

	V+I	$V_R$
<b>Buffer 5X</b>	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l
<b>T4 DNA Ligasa</b>	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
<b>Vector</b>	x $\mu$ g	x $\mu$ g
<b>Inserto</b>	x $\mu$ g	x $\mu$ g
<b>H<sub>2</sub>O</b>	csp 20 $\mu$ l	csp 20 $\mu$ l

Una vez caracterizados los vectores de expresión generados pMx2/EGFP, se realizaron purificaciones de ADN plasmídico a gran escala (maxipreparación) descrita en la sección 10.1.3.2. de forma de preparar cantidad de plásmido de expresión con alto grado de pureza, suficiente para realizar posteriormente la transfección de las células eucariotas y obtener las líneas celulares reporteras.



**Fig. 11:** Estrategia de clonado para la generación del vector de expresión pMx2/EGFP.

## 11. Transfección de células eucariotas

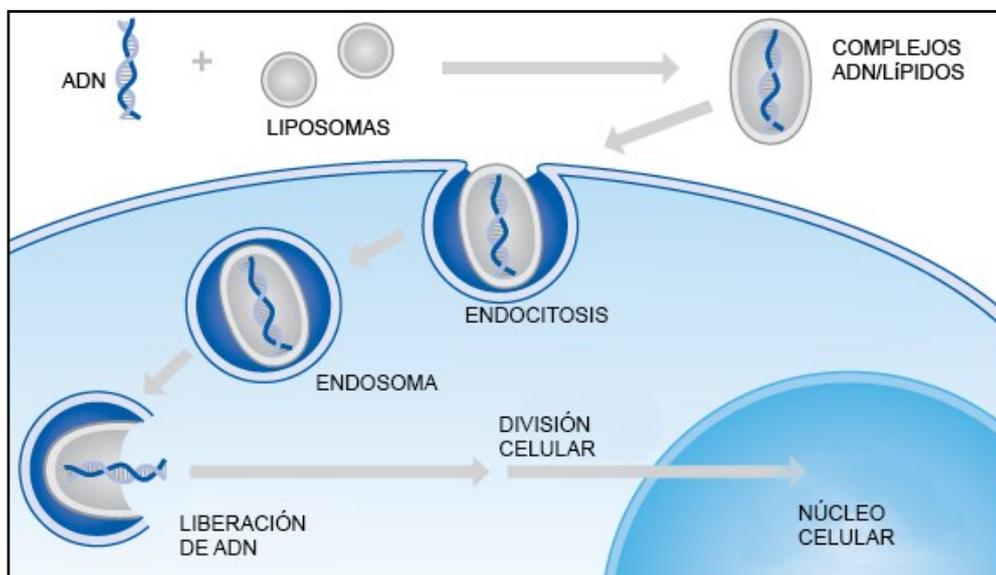
La introducción de ADN exógeno en células eucariotas se realizó empleando la técnica de transfección mediada por lípidos catiónicos o lipofección (Felgner y col., 1987). En soluciones acuosas, los lípidos catiónicos forman pequeñas vesículas unilaminares (liposomas), con un tamaño promedio entre 600 y 1.200 nm. El método se basa en la interacción iónica de estos liposomas, cuya superficie se encuentra cargada positivamente, tanto con los grupos fosfatos del ADN como con las cargas negativas de la superficie celular. El ADN en solución no es encapsulado dentro del liposoma sino que se une espontáneamente a las cargas positivas de los mismos formando complejos que son captados por las células en cultivo. El método original fue mejorado mediante el reemplazo del lípido monocatiónico por reactivos policatiónicos, como el Lipofectamine™ (Hawley-Nelson y col., 1993).

Para llevar a cabo las transfecciones de las líneas celulares se respetó el protocolo de ensayo que se detalla a continuación.

1. Cada una de las líneas celulares a ser transfectadas fueron cultivadas en sus correspondientes medios de crecimiento, según lo mencionado en la sección 2 y 3 de Materiales y Métodos. Cuando el cultivo alcanzó una etapa de crecimiento exponencial, las células se cosecharon mediante desprendimiento enzimático con tripsina, se contaron y se resuspendieron en medio de crecimiento en una densidad celular de  $1,5 \times 10^5$  cel/ml. Se sembraron 2 ml de dicha solución en las cavidades de una placa de cultivo estéril de 12 pozos y se incubaron durante 24 h a 37°C de modo de alcanzar un 80% de confluencia.
2. Se retiró el sobrenadante de cada pozo y con el objetivo de eliminar el SFB, las células se lavaron con 2 ml de cada uno de los medios basales, sin ser suplementados con SFB, dejando en cada uno de los pozos un volumen final de 500  $\mu$ l.
3. Los complejos ADN-lípidos fueron generados en una relación 1:1, respectivamente. Para ello, por cada cavidad, se preparó: un tubo conteniendo 2  $\mu$ g de vector en 100  $\mu$ l de medio de cultivo basal y por otro lado 2  $\mu$ l de *Lipofectamine 2000 Reagent* (Invitrogen, EE.UU.) en 100  $\mu$ l de medio de cultivo basal.
4. Ambos volúmenes se mezclaron y se dejaron reposar 20 min a temperatura ambiente para la formación de los complejos ADN-lípido. Como control de la toxicidad del lípido se mezclaron 100  $\mu$ l de la solución de lípidos y 100  $\mu$ l de medio de cultivo basal.

5. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, el total del volumen de la mezcla ADN-lípidos fue colocado lentamente, gota a gota, a cada pocillo conteniendo el cultivo celular en un volumen de 1 ml de medio de cultivo basal.
6. El cultivo celular se incubó en estufa gaseada a 37°C durante 4 h.
7. Una vez transcurrida la incubación con la mezcla ADN-lípido, se agregó 1 ml de medio de cultivo suplementado con 20% SFB de forma tal de completar el volumen final por pozo de cultivo a 2 ml, con una concentración de SFB final en el pozo, equivalente a 10% (V/V), necesario para el crecimiento de cada una de las células transfectadas. Las células fueron incubadas a 37°C durante 24 h hasta la activación del sistema reportero con rhIFNs-I.

Aclaración: Las líneas celulares A549 y HeLa fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM; mientras que las líneas HEp-2 y WISH se trabajaron en medio MEM. Por su parte, las células MCF7 y Caco2 se cultivaron en medio EMEM y las células HEL 92.1.7 en medio de cultivo RPMI.



**Fig. 12:** Mecanismo de transfección mediante lipofección.

El ADN forma junto a los lípidos catiónicos, por atracción de cargas, complejos ADN/lípidos, los cuales ingresan a la célula por endocitosis. Una vez dentro de la célula, el ADN se libera y se integra al azar en el cromosoma de la célula transfectada.

### **11.1. Transfección transitoria de células eucariotas para el análisis del funcionamiento del vector de expresión generado**

Para evaluar la integridad de la construcción plasmídica y el funcionamiento del sistema reportero Mx2/EGFP desarrollado, se realizaron transfecciones transitorias de células WISH con el vector pMx2/EGFP, siguiendo el protocolo descrito en la sección 11. Luego de 24 h de transfección se retiró el sobrenadante de cada uno de los pozos y se prosiguió con el protocolo de activación de las líneas reporteras con los rhIFNs-I como se menciona a continuación.

1. Se retiró el sobrenadante de cada pozo y se lavó con medio de cultivo MEM basal.
2. Se sembraron 1.000 UI/ml de cada uno de los rhIFN- $\alpha$ 2a y rhIFN- $\beta$ 1a, preparados en medio de cultivo MEM suplementado con 2% SFB, de forma de mantener el cultivo de células en una densidad relativamente constante. Uno de los pocillos fue utilizado como control negativo de activación, también conocido como control de expresión basal, al cuál se le agregó medio de cultivo MEM suplementado con 2% de SFB. Las células se incubaron durante 24 h a 37°C.
3. Transcurrido dicho tiempo, las células de cada uno de los pozos fue tratada con tripsina para desprenderlas de la superficie de la placa y resuspendidas en medio de cultivo sin SFB o PBS 1X para de obtener una suspensión homogénea de células en suspensión para analizarlas por citometría de flujo. De esta forma, se evaluó cada una de las condiciones del ensayo analizando mediante citometría de flujo el porcentaje de células verdes positivas como consecuencia de la activación del promotor Mx2 inducible específicamente por IFNs-I.

Este ensayo sólo se realizó con las células WISH, dado que el objetivo era determinar la efectividad del sistema reportero generado, para luego, en una etapa posterior y con la certeza del funcionamiento del sistema reportero, generar las líneas celulares reporteras provenientes de distintos linajes celulares.

### **11.2. Obtención de líneas celulares reporteras en forma estable**

Obtener una línea celular recombinante estable a partir de una transfección, implica el tratamiento de las células transfectadas con un medio de cultivo selectivo. De esta forma se seleccionarán solamente aquellas células que sean resistentes al medio de cultivo empleado. Esta resistencia se adquiere una vez que el vector utilizado se haya incorporado al genoma de la célula en forma estable.

Para dar origen a las líneas celulares reporteras estables, se llevó a cabo el protocolo descrito en la sección 11. Se generaron líneas celulares reporteras transfectando las líneas celulares A549, HeLa, HEP-2, WISH, MDBK, Caco2, MCF7 y HEL 92.1.7 mediante transfección con *Lipofectamine™ 2000 Reagent* y posterior selección.

Para llevar a cabo la selección, 48 h post transfección se cambió la totalidad del medio de cultivo por medio MEM 10% SFB, DMEM 10% SFB, EMEM 10% SFB o RPMI 10% SFB, según corresponda, conteniendo el agente de selección Geneticin o G-418 sulfato (Gibco), el cual es un aminoglucósido de estructura similar a la neomicina. El mismo se utilizó en una concentración final de 400 µg/ml. De esta manera, sólo aquellas células transfectadas con el plásmido pMx2/EGFP que hayan incorporado en su genoma el gen de la neomicina fosfotransferasa, codificado en este vector, sobrevivirán en presencia de dicho antibiótico durante períodos de tiempo prolongados. Una fracción de estas células también expresará el gen de interés, constituyendo una línea celular estable. Paralelamente, se realizó un control negativo de selección, incubando cada una de las líneas celulares no transfectadas con el antibiótico en las mismas condiciones. Una vez que el control negativo de selección mostró 100% de células no viables (aproximadamente 7-10 días de selección), se cambió el medio de cultivo de las células transfectadas por medio de cultivo MEM 10% SFB, DMEM 10% SFB, EMEM 10% SFB o RPMI 10% SFB y se mantuvo en condiciones de cultivo hasta alcanzar la densidad celular necesaria para su criopreservación (sección 6).

## **12. Clonado de las líneas celulares recombinantes generadas**

Las líneas celulares transfectadas en forma estable constituyen un grupo heterogéneo de células que presentan diferencias en sus características de crecimiento así como en los niveles de expresión. Las marcadas diferencias en los niveles de expresión se deben fundamentalmente a dos factores: diferente número de copias e integración en sitios con distinta actividad transcripcional (Hauser, 1997). El propósito del clonado es asegurar que todas las células de un cultivo descendan de una única célula, es decir, sean genéticamente idénticas. Esto permite aislar células altamente productoras de aquellas que no lo son, luego de eventos de transfección y selección iniciales (Mather, 1991).

El momento en el que se realiza el clonado es de vital importancia. Es importante realizar el clonado en el menor lapso de tiempo desde la generación de la línea celular, dado que los múltiples clones presentan distintas velocidades de crecimiento, pudiendo perderse clones con altos niveles de expresión y baja tasa de crecimiento.

El clonado celular de las líneas obtenidas se realizó por el método de dilución límite (Freshney, 2000c; Mather, 1991). El mismo consiste en preparar una suspensión celular que permita obtener una célula única en un volumen de medio de cultivo, el cual luego es dispensado en pozos de una placa de microtitulación. La probabilidad de obtener una única célula por pocillo aumenta a medida que se realizan suspensiones celulares de menor densidad celular que permitan sembrar una sola célula cada 5 o 10 pozos. Dado que se trabaja con densidades celulares realmente bajas, es necesario enriquecer el medio de cultivo en el que son cosechadas las células, ya que los factores de crecimiento y nutrientes aportados por las células vecinas no estarán presentes. Estas deficiencias nutricionales suelen suplantarse por un enriquecimiento del medio de cultivo con una proporción mayor de SFB y/o medios condicionados con el crecimiento de otras células o capas de células alimentadoras. El clonado resulta efectivo si se observa crecimiento, como máximo en el 30% de los pozos en los cuales se sembró una proporción de una célula cada 10 pozos o una célula por pozo.

Siguiendo el fin planteado previamente, se prepararon suspensiones celulares de las líneas a clonar en medio de cultivo MEM o DMEM, según corresponda, suplementados con 20% de SFB (V/V), de concentraciones 0,5 cél/ml, 5 cél/ml y 50 cél/ml. Cada una de estas suspensiones celulares se sembró sobre la 1/3 parte de cada una de 2 placas de 96 pozos a razón de 200  $\mu$ l por pozo. De esta forma, se espera obtener zonas con 0,1; 1 y 10 células por pozo, respectivamente. Los pozos correspondientes a las suspensiones celulares de 0,1 y 1 cél/pozo, que evidenciaron el crecimiento de un único clon, fueron seleccionados y amplificados en forma gradual. Para ello, se utilizaron sucesivamente placas de 12, 24 y 6 pozos y frascos T de 25 cm<sup>2</sup>, hasta llegar a obtener una cantidad suficiente de células de cada clon para su análisis. Los clones seleccionados fueron evaluados en cuanto a su capacidad para responder a la activación con los rhIFNs-I. Para ello, se sembraron  $2,5 \times 10^5$  cél/ml de cada clon sobre cada cavidad de placas de 96 pozos. Luego de 24 h a 37°C los mismos fueron tratados con los rhIFNs-I e incubados durante otras 24 h a 37°C. Finalmente los clones celulares fueron analizados mediante citometría de flujo para poder obtener el porcentaje de células verdes positivas como resultado de la mayor o menor activación del promotor Mx2, inducible específicamente por IFNs-I. Los mejores clones respondedores de cada una de las líneas celulares reporteras generadas fueron criopreservados y caracterizados.

### 13. Métodos de valoración de la actividad biológica in vitro de los rhIFNs-I

Los ensayos de valoración biológica de citoquinas pueden realizarse de diversas formas, pero todas ellas se basan en la capacidad de la proteína para inducir alguna actividad cuantificable en células o tejidos (Mire-Sluis, 1999).

Los ensayos más utilizados para la medición de la potencia biológica de los IFNs se basan en su actividad antiviral. Sin embargo, estos ensayos no predicen la actividad biológica de los IFNs en terapias antitumorales o inmunomoduladoras. Por lo tanto se han desarrollado otros bioensayos basados en la inhibición de la proliferación celular, en la regulación de funciones celulares y en la detección de la expresión de proteínas inducidas por IFN mediante inmunoensayos (Meager, 2002; Mire-Sluis y col., 1996).

#### 13.1. Valoración de la actividad biológica antiviral

Los ensayos de valoración biológica antiviral de los IFNs cuantifican la actividad inhibitoria que ejercen las citoquinas sobre la propagación o replicación viral. El procedimiento más simple y conveniente consiste en medir la capacidad del IFN de proteger a las células susceptibles del efecto citopático de un virus lítico para un rango determinado de concentraciones de IFN.

Existen una gran variedad de sistemas línea celular/virus sugeridos por la Farmacopea Europea para este tipo de estudio. Particularmente, en este caso se ensayaron distintos sistemas: línea celular WISH/virus de la estomatitis vesicular (VSV), HeLa/VSV; HEp-2/VSV y A549/VSV. Cada uno de estos sistemas debió ser optimizado. El procedimiento básico consiste en sembrar una cantidad determinada de células capaces de formar una monocapa celular y posteriormente incubar las mismas con diluciones seriadas de cada uno de los rhIFNs para inducir un estado antiviral. Luego de un determinado período de tiempo, estas células son expuestas al virus citopático hasta observar efecto lítico total sobre aquellas células que no fueron protegidas por el IFN. En este momento, las células que no han sido lisadas y que, por lo tanto, continúan adheridas al sustrato, son teñidas con un colorante. Finalmente, el colorante es disuelto y a continuación se realiza la lectura espectrofotométrica (Fig.13).

La metodología desarrollada fue la siguiente:

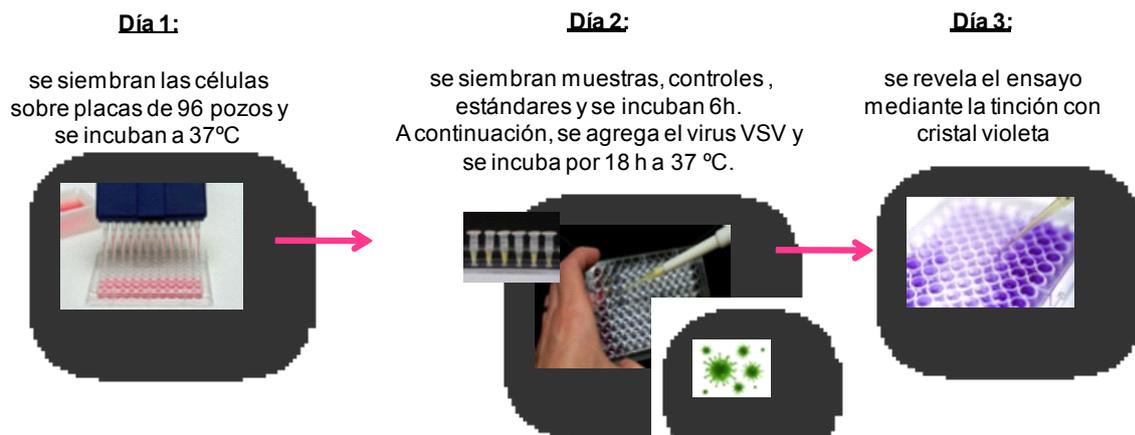
1. Las células empleadas en el ensayo fueron desprendidas del sustrato sobre el que estaban adheridas utilizando tripsina y resuspendidas en medio de cultivo MEM/DMEM 10% SFB (V/V), según corresponda. Se preparó una suspensión

celular de  $2,5 \times 10^5$  cél/ml y se sembraron 100  $\mu$ l de la misma sobre las cavidades de una placa de 96 pozos. Las mismas fueron incubadas durante 24 h a 37°C.

2. Se descartó el sobrenadante de la placa por inversión, se escurrió y se colocaron 100  $\mu$ l por pozo de sucesivas diluciones de rhIFN- $\alpha$ 2a, rhIFN- $\alpha$ 2b desde una potencia 20 UI/ml hasta 0,16 UI/ml y diluciones de rhIFN- $\beta$ 1a, rhIFN- $\beta$ 1b desde una potencia 80 UI/ml hasta 0,625 UI/ml y se incubaron por 6 h a 37°C. Cada una de las diluciones de IFN fue preparada en medio de cultivo DMEM/MEM 2% (V/V) SFB, según corresponda.
3. Nuevamente se eliminó el sobrenadante por inversión de la placa, y se realizaron 2 lavados con medio de cultivo basal sin SFB. Seguidamente, se colocaron 100  $\mu$ l por pozo de una dilución apropiada de virus VSV en medio DMDM o MEM 2% SFB (V/V) en cada uno de los pozos y se los incubó durante 18-20 h a 37°C. Se realizaron dos tipos de controles:

- a. Control celular: En ausencia de virus e IFN, para evaluar máxima proliferación celular cuando no se produce infección viral. Para ello, se incubaron las células con 100  $\mu$ l por pozo de medio de cultivo 2% SFB.
- b. Control de lisis: En ausencia de IFN, para evaluar el efecto del virus sobre las células. En lugar de IFN se sembraron 100  $\mu$ l por pozo de medio de cultivo 2% SFB y luego se infectaron con virus VSV de la misma forma que se procedió para las muestras y los estándares.

4. Finalmente, para revelar el ensayo, se eliminó el sobrenadante de cultivo por inversión de la placa, se escurrió y se agregaron 50  $\mu$ l por pozo de una solución de cristal violeta 0,75% (P/V) en metanol 40% (V/V), incubándose durante 15 min a 37°C. Posteriormente, se eliminó el colorante, y se realizaron sucesivos lavados con agua destilada hasta verificar ausencia del colorante en los lavados. El colorante fijado fue disuelto mediante el agregado de 200  $\mu$ l de ácido acético 20% (V/V) en cada cavidad y se homogeneizó. La lectura del color generado se efectuó a una  $\lambda = 540$  nm en un lector de placa de microtitulación.
5. Una vez revelado el ensayo, se efectuaron las comparaciones correspondientes entre las curvas dosis-respuesta de cada muestra con respecto a su correspondiente curva estándar y se calcularon las actividades correspondientes, así como si hubo efecto sobre la misma cuando las células fueron incubadas con cada uno de los compuestos.



**Fig.13:** Esquema del ensayo de actividad antiviral para cuantificar la actividad biológica de los IFNs-I.

### 13.2. Valoración de la actividad biológica antiproliferativa

Otra de las propiedades de los IFNs-I es su actividad antiproliferativa. El ensayo de valoración de la actividad biológica antiproliferativa *in vitro* de los rhIFNs se basa en la cuantificación de los efectos que esta citoquina induce sobre la viabilidad y proliferación de la línea celular en estudio.

El procedimiento básico consiste en sembrar un número determinado de células en placas de microtitulación e incubarlas con diluciones seriadas del IFN durante un determinado tiempo. Posteriormente, mediante un método colorimétrico se mide la proliferación celular, poniendo en evidencia la presencia de enzimas deshidrogenasas que se encuentran en las células metabólicamente activas y cuya actividad se relaciona en forma directa con la cantidad de células viables presentes en el cultivo (Nederman y col., 1990) (Fig.14).

Con este fin, se empleó el *Kit Cell Titer 96™ AQueous Non-Radiactive Cell Proliferation Assay* (Promega, EE.UU.), el cual se compone de dos reactivos:

- **MTS**[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxi-fenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium)] 2 mg/ml.
- **PMS** [metasulfato de fenazina] 0,92 mg/ml.

Las enzimas deshidrogenasas catalizan la biorreducción del MTS en un cromógeno soluble (azul de formazán) que absorbe a una longitud de onda equivalente a 490 nm. El PMS actúa como dador de electrones en la reacción de óxido-reducción. La cantidad

de producto generado es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas en el cultivo.

Habitualmente, para este bioensayo se utilizan células Daudi. Sin embargo, como en este trabajo de tesis se pretende evaluar, en una etapa posterior, el efecto de los compuestos posibles moduladores de la actividad biológica de los IFNs-I, sobre las líneas celulares previamente generadas, de forma de evaluar y comparar el comportamiento de los compuestos seleccionados sobre la actividad biológica de los IFNs y ver la consistencia de los resultados a lo largo de los diferentes ensayos empleados para medir la actividad biológica de las moléculas en estudio, se utilizaron las 4 líneas celulares reporteras Mx2EGFP en lugar de las células Daudi.

Para ello, debieron optimizarse las condiciones del ensayo para cada línea celular utilizada. Se evaluó:

- El inóculo inicial de células, para lo cual se ensayaron las siguientes densidades celulares:  $1,5 \times 10^3$ ;  $3,0 \times 10^4$ ;  $6,0 \times 10^4$ ;  $12,0 \times 10^4$ ;  $24,0 \times 10^4$ ;  $48,0 \times 10^4$ ;  $96,0 \times 10^4$ ;  $192,0 \times 10^4$  cél/ml..
- El tiempo de revelado del ensayo: luego del agregado del reactivo MTS/PMS se realizó la lectura espectrofotométrica después de 3 y 5 h.

Posteriormente, una vez optimizado el protocolo de ensayo para cada línea celular, se utilizó el mismo para determinar la potencia biológica antiproliferativa de los rhIFN- $\alpha$ 2a y rhIFN- $\beta$ 1a en presencia de los compuestos seleccionados utilizando las 4 líneas celulares reporteras generadas como se describe a continuación.

El estándar, las muestras y los controles fueron analizados por duplicado.

1. En placas estériles de fondo plano de 96 cavidades se colocaron 25  $\mu$ l por pozo de sucesivas diluciones 1:2 de los estándares de rhIFN- $\alpha$ 2a o rhIFN- $\beta$ 1a en medio de cultivo MEM o DMEM, según corresponda, suplementados con 10% SFB (V/V).

En la tabla VIII se muestran las concentraciones de cada IFN ensayadas para cada línea celular. Las muestras analizadas corresponden a los mismos estándares de IFN en presencia de los compuestos seleccionados.

En el caso de los estándares se sembraron 25  $\mu$ l del IFN correspondiente y 25  $\mu$ l de medio de cultivo. Para las muestras se sembraron 25  $\mu$ l de IFN y 25  $\mu$ l de la dilución correspondiente de cada compuesto en estudio.

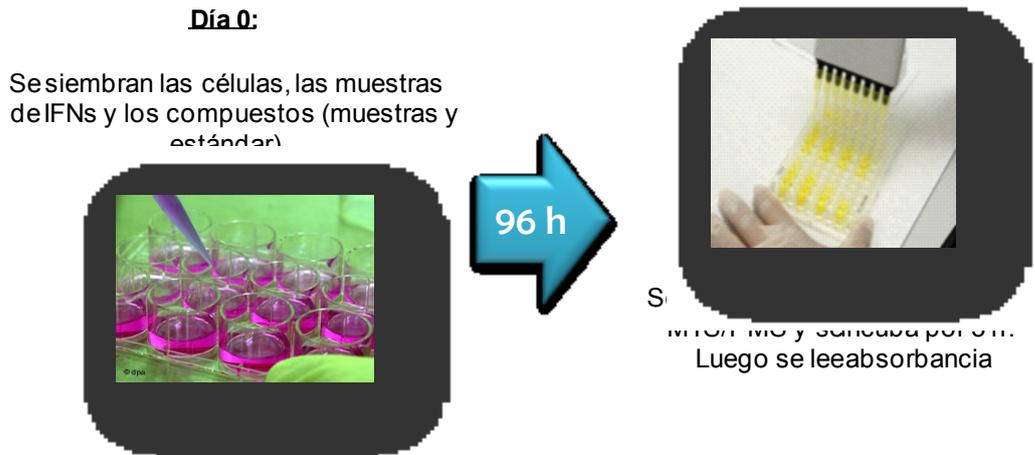
2. Cada una de las líneas celulares empleadas en el ensayo fue cultivada en su medio de crecimiento correspondiente: MEM 10% SFB (V/V) para las líneas reporteras

WISH y HEp-2; y DMEM 10% SFB (V/V) para las líneas A549 y HeLa. Cuando cada uno de los cultivos se encontraba en fase de crecimiento exponencial, las células se cosecharon y se centrifugaron a 1.000 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular se resuspendió en el medio de crecimiento correspondiente, preparando las suspensiones celulares con las densidades correspondientes, descriptas en la tabla VIII.

**Tabla VIII:** Densidades celulares y rangos de potencias de IFN correspondientes a cada línea celular, para el ensayo de actividad antiproliferativa.

Línea celular	Densidad celular (cél/ml)		Rango de potencias (UI/ml)	
	rhIFN- $\alpha$ 2a	rhIFN- $\beta$ 1a	rhIFN- $\alpha$ 2a	rhIFN- $\beta$ 1a
<b>HeLa-Mx2/EGFP</b>	1,25x10 <sup>4</sup>	1,25x10 <sup>4</sup>	39-1.250	39-1.250
<b>WISH-Mx2/EGFP</b>	1,25x10 <sup>4</sup>	1,25x10 <sup>4</sup>	94-3.000	9-300
<b>A549-Mx2/EGFP</b>	5,00x10 <sup>4</sup>	5,00x10 <sup>4</sup>	156-5.000	156-5.000
<b>HEp2-Mx2/EGFP</b>	2,50x10 <sup>4</sup>	2,50x10 <sup>4</sup>	156-5.000	156-5.000

3. Posteriormente, se adicionaron 50  $\mu$ l de cada suspensión celular sobre cada cavidad, donde previamente se sembraron los IFNs y los IFNs + compuestos, incubándose durante 96 h a 37°C.
4. Transcurrido dicho período de tiempo, se agregaron 20  $\mu$ l por cavidad del reactivo de color, preparado en el momento, el cuál fue preparado mezclando 2 ml de solución de MTS con 100  $\mu$ l de solución de PMS por cada placa. Se incubó durante 3 h a 37°C. La absorbancia del cromógeno se midió a una  $\lambda = 492$  nm contra lectura de fondo de placa a  $\lambda = 690$  nm.  
Se realizó el control de proliferación celular correspondiente como se describe a continuación:
  - Para evaluar la máxima proliferación celular en ausencia de rhIFN. Se reemplazaron los 25  $\mu$ l del IFN correspondiente por medio de crecimiento.
5. Una vez revelado el ensayo, se efectuaron las comparaciones correspondientes entre las curvas de dosis-respuesta de cada muestra con respecto a su correspondiente curva estándar y se calcularon las actividades correspondientes, así como si hubo efecto sobre la misma cuando las células fueron incubadas con cada uno de los compuestos.



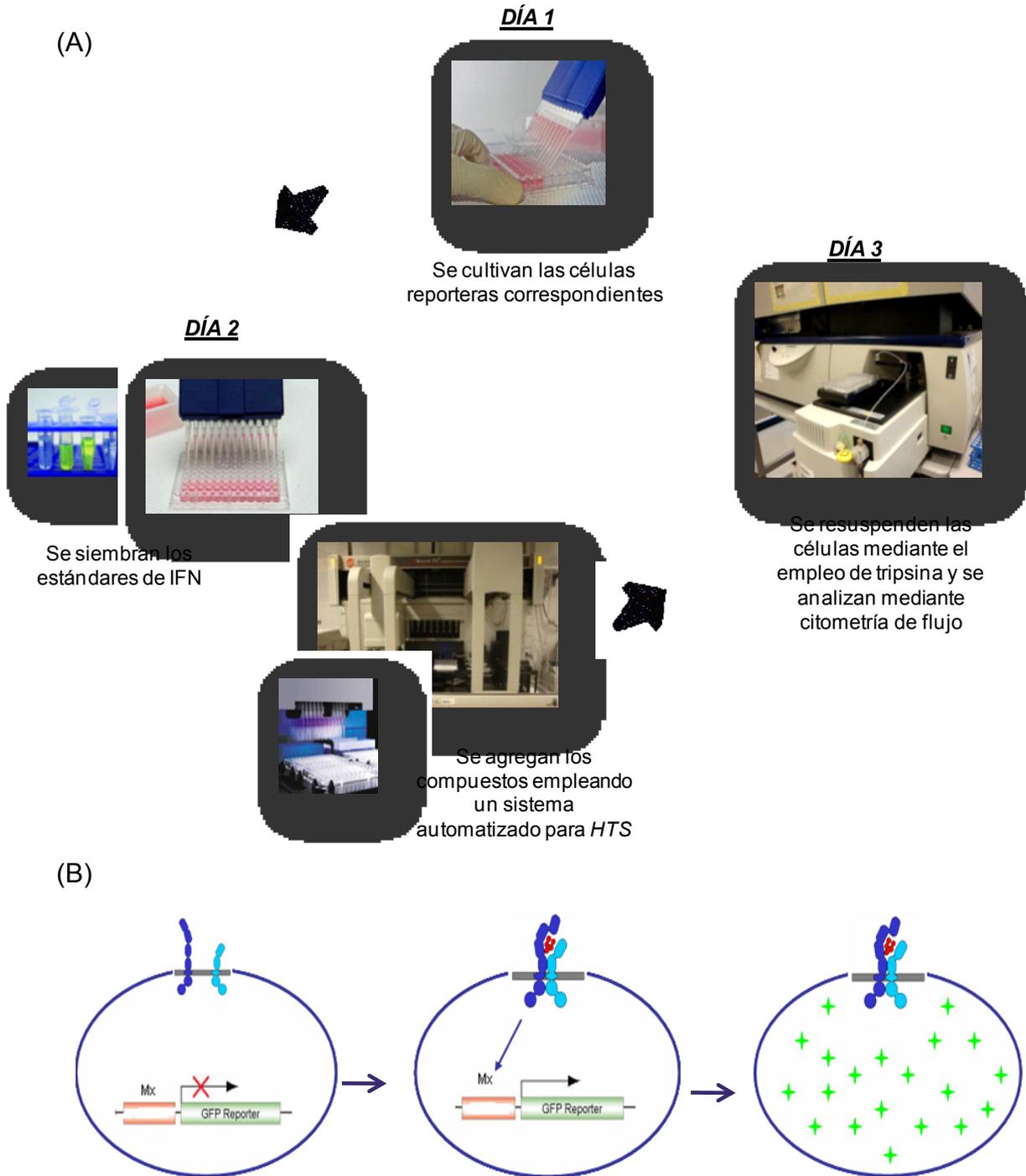
**Fig. 14:** Esquema del ensayo de actividad antiproliferativa para evaluar potencia de los IFNs-I.

#### 14. Desarrollo de un nuevo ensayo de gen reportero para cuantificar la potencia de los rhIFNs-I

Como se explicó previamente, habitualmente, la potencia de los IFNs es determinada mediante ensayos de actividad antiviral. Estos ensayos, requieren del empleo de un virus, así como de su manipulación bajo condiciones de bioseguridad de nivel 2. Además presentan variaciones intra- e inter- ensayos realmente altas y las curvas de dosis-respuesta obtenidas para cada estándar de rhIFN tienen un rango lineal muy acotado (Girad y Fleischaker, 1984). Por dichos motivos, se desarrolló un nuevo ensayo de gen reportero basado en el empleo de las líneas celulares humanas reporteras, desarrolladas anteriormente. Las mismas han incorporado en su genoma, la secuencia codificante del promotor Mx2 inducible específicamente por IFNs-I, el cual gobierna la expresión de la proteína reportera de fluorescencia verde mejorada (EGFP) (Bürgi y col., 2012). En estas líneas reporteras, el IFN de las muestras a analizar se une a sus receptores específicos presentes en la superficie celular y desencadena una cascada de fosforilaciones que concluye con la activación del promotor Mx2 en el núcleo celular. Como consecuencia, la proteína reportera se expresa intracelularmente. De esta forma, el porcentaje de células verdes positivas es analizado por citometría de flujo. El porcentaje de EGFP obtenido es directamente proporcional a la cantidad de IFN presente en la muestra a analizar (Fig. 15).

La metodología seguida para este bioensayo se describe a continuación:

1. Las células reporteras empleadas en el ensayo son desprendidas del sustrato mediante el uso de tripsina. Luego se prepara una suspensión celular homogénea en MEM o DMEM 10% SFB (V/V), según corresponda, en una densidad celular de  $2,5 \times 10^5$  cél/ml y se deposita sobre cada una de las cavidades de placas de 96 pozos, en un volumen final de 100  $\mu$ l. Las células se incuban durante 24 h a 37°C.
2. El sobrenadante se descarta por inversión de la placa, y se incuban las células en presencia de diluciones sucesivas 1:2 del estándar de rhIFN correspondiente y de igual manera, diluciones sucesivas de las muestras conteniendo IFN en medio de cultivo MEM o DMEM 2% SFB (V/V). Tanto las muestras como los estándares son analizados por duplicado. Las células se incuban nuevamente durante 24 h a 37°C.
3. Transcurrido dicho tiempo, se remueve el sobrenadante de cada pozo y se despegan las células reporteras del sustrato al cual se encuentran adheridas mediante el empleo de tripsina. A continuación, las células se resuspenden en medio de cultivo sin SFB o en PBS 1X, para ser analizadas mediante citometría de flujo.
4. El porcentaje de células EGFP positivas de cada muestra y estándar, así como la intensidad de fluorescencia verde fue evaluado por citometría de flujo empleando el citómetro Guava® EasyCyte™ (Guava Technology, EE.UU). La adquisición y el análisis de los datos fueron realizados utilizando el *software* GuavaCytoSoft™ 3.6.1. Para cada muestra se analizaron 5.000 eventos, los cuales fueron colectados dentro del *gate* en la gráfica de puntos FSC vs SCC. Con los porcentajes obtenidos se confeccionan curvas de dosis-respuesta y se cuantifica la potencia de rhIFN presente en cada muestra, comparando contra su correspondiente curva estándar.



**Fig.15:** Desarrollo de un nuevo ensayo de gen reportero para determinar la potencia de los IFNs-I y para el análisis de bibliotecas de compuestos, posibles moduladores de la respuesta de los IFNs.

(A) Esquema correspondiente al protocolo de ensayo de gen reportero desarrollado  
 (B) Representación esquemática del ensayo de gen reportero: Los IFNs-I presentes en la muestra a cuantificar se unen a sus receptores IFNAR-1/ IFNAR-2 en la superficie de las células Mx/EGFP reporteras. Se desencadena una cascada de señalización, que concluye con la activación del promotor Mx, el cuál dirige la expresión de EGFP.

## 15. Validación del ensayo de gen reportero desarrollado

El ensayo de gen reportero desarrollado se validó en cuanto a la precisión, selectividad, sensibilidad, linealidad y robustez de la línea celular reportera empleada. En todos los casos, se respetó el protocolo descrito en la sección 14. Sólo se realizaron modificaciones sobre el punto de la evaluación-validación.

### 15.1. Optimización del ensayo de gen reportero desarrollado

Con el objetivo de contar con un ensayo robusto, que permita obtener curvas dosis respuesta con amplios rangos de linealidad, se evaluaron diferentes aspectos. Para su optimización se estudiaron:

- Diferentes densidades celulares iniciales:  $1,2 \times 10^6$ ;  $6 \times 10^5$ ;  $3 \times 10^5$  cél/ml.
- Rangos de potencias de cada uno de los rhIFNs para confeccionar las curvas estándares.
- Límite de detección para cada sistema reportero.
- Tiempo óptimo de revelado para alcanzar la máxima respuesta de EGFP.
- Reproducibilidad del ensayo mediante el cálculo de los CV % intra- e inter- ensayo.

Como se mencionó previamente, cada uno de estos parámetros fue analizado siguiendo el protocolo detallado en la sección 14, modificando únicamente la variable en estudio.

### 15.2. Evaluación de la especificidad del promotor Mx2 por los IFNs-I

El promotor Mx2 es de origen murino y esta directamente vinculado con la expresión de las proteínas Mx que presentan actividad antiviral. Dicho promotor contiene dos secuencias de elementos de respuesta a interferon (ISRE), las cuales se presentan como secuencias consenso en varias especies; entre ellas, murina, humana, de pollos. Se sabe que la secuencia ISRE2 es indispensable para la activación del promotor, luego de la inducción por los IFNs-I.

Con el objetivo de evaluar la especificidad del promotor Mx2 por los IFNs-I, se realizó el ensayo de gen reportero, empleando la línea celular reportera WISH-Mx2/EGFP. Se siguió el mismo protocolo descrito en la sección 14, pero las células fueron incubadas también en presencia de otras citoquinas, de forma tal de

verificar que la activación del promotor ocurra solo en presencia de los IFNs-I y no frente a la inducción con otras moléculas biológicas. Para ello, se incubaron las células reporteras con 50 UI/ml de IL-2, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ 2a, IFN- $\alpha$ 2b, IFN- $\beta$ 1a, IFN- $\beta$ 1b y luego de 24 h de incubación, se procedió a la lectura final del ensayo mediante citometría de flujo. Cada una de las muestras fue analizada por triplicado, al igual que los controles.

### **15.3. Evaluación de la estabilidad del clon reportero WISH-Mx2/EGFP L1G3**

La robustez del ensayo de gen reportero fue evaluada, comparando la cuantificación de la potencia de muestras de IFN- $\alpha$ 2a, IFN- $\alpha$ 2b, IFN- $\beta$ 1a, IFN- $\beta$ 1b, empleando el clon reportero WISH-Mx2/EGFP L1G3 de diferentes generaciones. Es decir, con este ensayo se pretendió estudiar la estabilidad del clon reportero, para lo cual se le realizaron subcultivos sucesivos del clon celular hasta asegurar 29, 57 y 84 generaciones. Cuando cada cultivo celular alcanzó el número de generación previamente mencionado, el mismo fue fraccionado en dos partes, una de las cuales se criopreservó para su posterior análisis y la otra se continuó mediante pasajes sucesivos en cultivo. Finalmente, los clones de diferentes edades fueron revitalizados al mismo tiempo, y todos ellos fueron empleados para analizar las mismas muestras de IFNs-I utilizando el ensayo de gen reportero desarrollado (sección 14). Se analizó mediante citometría de flujo, el porcentaje de células verdes positivas obtenidas para cada muestra.

A continuación, se compararon las curvas dosis-respuesta evaluando las pendientes, el límite de detección y el porcentaje máximo de EGFP alcanzado.

Es de esta manera, como se puede visualizar si existen diferencias en la cuantificación de una misma muestra de IFN con clones celulares que tengan distintas edades.

### **15.4. Cuantificación de la potencia de rhIFN empleando el sistema de gen reportero y el modelo AVA**

Se prepararon muestras de IFN y se analizaron mediante el ensayo de gen reportero (sección 14) y el ensayo de actividad antiviral (sección 13.1) empleando para ambos ensayos el clon L1G3 de la línea reportera WISH-Mx2/EGFP. Para determinar la potencia de cada una de las muestras de IFN, se compararon las curvas de dosis-respuesta de las muestras respecto de su respectivo control estándar, obtenidas en cada ensayo.

En cada una de las técnicas desarrolladas fueron incluidos los controles pertinentes: control negativo y control positivo para el ensayo de gen reportero y control celular y control de lisis para el ensayo AVA. Todos ellos, muestras, estándares y controles, se evaluaron por triplicado.

### 15.5. Estudio *in vivo* de la expresión de EGFP en células A549-Mx2/EGFP

Este ensayo se diseñó con el objetivo de evaluar en tiempo real la respuesta generada por el sistema reportero Mx2/EGFP, luego de la inducción de las células reporteras con hIFNs-I.

Las células reporteras A549-Mx2/EGFP clon L2G9 fueron sembradas sobre una placa de cultivo de poliestireno rectangular de 8 cavidades (IBIDI, Alemania) (Fig. 16) en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% SFB (V/V) en una densidad celular  $2,5 \times 10^5$  cél/ml, y se incubaron durante 24 h a 37°C. Seguidamente, se eliminó el sobrenadante de cada una de las cavidades y las células se incubaron con IFN  $\beta$ 1a, 400 UI/ml.

Para realizar el monitoreo en tiempo real de la expresión de EGFP, una vez agregado el IFN a las células, la placa de cultivo conteniendo las células reporteras tratadas, se colocó dentro de un incubador térmico (minitüb Ibérica, España), sobre el objetivo del microscopio de fluorescencia OLYMPUS BX51 (OLYMPUS, EE.UU), utilizado para detectar la fluorescencia verde a diferentes tiempos posteriores a la incubación con la citoquina. De esta forma, se ajustaron los parámetros necesarios para tomar las imágenes de las células reporteras tratadas con IFN cada 20 min durante un período total de 40 h.



**Fig. 16:**  *$\mu$ -Slide 8 well, IBIDI- Alemania.*  
Placas de 8 cavidades utilizadas para evaluación de cultivos celulares por microscopía de fluorescencia.

## 16. Monitoreo de bibliotecas de compuestos, potencialmente moduladores de la actividad de los IFNs-I. Análisis mediado por el ensayo de gen reportero

El IFN se presenta como una molécula central cuyo accionar debe regularse para evitar los inconvenientes clínicos mencionados previamente en este trabajo. En este sentido, es indispensable incrementar su eficacia terapéutica en aquel grupo de patologías que requieran de su administración exógena y, por otro lado, bloquear sus efectos nocivos en aquel conjunto de enfermedades donde la producción de IFN endógeno constituye parte de la etiología o curso de las mismas. En consecuencia, se ha propuesto la identificación y caracterización de nuevas moléculas, que actúen en forma sinérgica o antagonica con la actividad de los IFNs-I.

El monitoreo del efecto de diferentes compuestos sobre la actividad biológica de los IFNs requiere de métodos versátiles, sencillos, robustos y que contribuyan con una elevada velocidad de procesamiento. Por lo tanto, contar con un ensayo biológico basado en una línea celular que responda a IFNs-I y que exhiba tales características resultaría trascendental para el cumplimiento del objetivo propuesto.

El ensayo de gen reportero Mx2EGFP, diseñado con este objetivo, será utilizado para analizar compuestos posibles moduladores de la respuesta de IFN.

Para identificar compuestos naturales o sintéticos que presenten las mencionadas características, no alcanza solo con tener un método analítico adecuado, sino que es necesario diagramar una secuencia de pasos experimentales que permita obtener resultados fiables y certeros; sin contar con falsos positivos. Es por ello, que en la figura 17 se muestra la sucesión de pasos seguidos para el monitoreo de todas las bibliotecas de compuestos, empleando las 4 líneas celulares reporteras en presencia de ambos rhIFNs- $\alpha$ 2a y rhIFNs- $\beta$ 1a.



**Fig. 17:** Secuencia de pasos experimentales seguidos para el monitoreo e identificación de compuestos naturales y sintéticos, posibles moduladores de la respuesta de los IFNs-I

### 16.1. Monitoreo de una biblioteca de 176 compuestos naturales cedida por el Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung (HZI) Braunschweig, Alemania (HZI nat)

Se analizó una biblioteca de 176 compuestos naturales completa empleando el sistema reportero previamente descrito. La misma fue cedida gentilmente para su análisis por el Dr. Florenz Sasse y la bioquímica Bettina Hinkelmann del Departamento de Química Orgánica del instituto HZI.

Para su estudio se emplearon las 4 líneas celulares reporteras en presencia de IFN- $\alpha$ 2a o IFN- $\beta$ 1a. Se realizaron dos *screenings* por uniplicado, realizándose los controles negativos y positivos por cuadruplicado. La metodología seguida se basó en el ensayo de gen reportero descrito en la sección 14. Se incluyó una variante en dicho protocolo se trabajó con una potencia constante de cada uno de los IFNs capaz de desarrollar una respuesta de EGFP aproximada al 50% (Tabla IX), en presencia de una concentración constante de cada compuesto. En el caso particular de la HZI nat este valor fue 1,25  $\mu$ M.

**Tabla IX:** Potencia de rhIFN seleccionada para desarrollar una respuesta de expresión de EGFP del 50% empleando los distintos EGRs

rhIFN	Potencia rhIFN (UI/ml)			
	A549	HeLa	WISH	HEp2
IFN- $\alpha$ 2a	2,5	2,5	40,0	250,0
IFN- $\beta$ 1a	2,5	1,5	12,0	50,0

Los compuestos se sembraron utilizando un sistema robotizado para dispensar líquidos, que es el Beckman Coulter FX Robotic Liquid Handler (Beckman Coulter, Inc). La lectura final del ensayo se realizó utilizando el citómetro de flujo BD<sup>TM</sup> LSR II (Beckton Dickinson, EE.UU), que incluye un sistema para lectura de BD<sup>TM</sup> HTS (Beckton Dickinson, EE.UU).

Luego los datos fueron analizados con el objetivo de seleccionar los compuestos candidatos para su posterior caracterización, empleando el *software* adecuado para tal fin.

### 16.2. Monitoreo de una biblioteca de 288 compuestos sintéticos cedida por el Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung (HZI) Braunschweig, Alemania (HZI sint)

Se evaluaron 288 compuestos sintéticos, de una biblioteca de un total de 2.500 compuestos mediante el ensayo de gen reportero, utilizando las 4 líneas celulares reporteras desarrolladas en este trabajo de tesis, en presencia de IFN- $\alpha$ 2a o IFN- $\beta$ 1a. El protocolo de ensayo fue el mismo descrito en el inciso 16.1 para el monitoreo de la biblioteca de compuestos naturales.

La biblioteca de compuestos sintéticos fue cedida muy generosamente por el Dr. Dieter Kaufmann, del Instituto de Química Orgánica de la Universidad Técnica Clausthal (Hannover, Alemania),

### **16.3. Monitoreo de una biblioteca de 88 compuestos sintéticos cedida por la Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay (QuiMed-FCien)**

Se analizaron 88 compuestos sintetizados por el grupo de trabajo de los Dres. Mercedes González y Hugo Cerecetto de la Facultad de Ciencias, (Montevideo, Uruguay), mediante el ensayo de gen reportero, utilizando las 4 líneas celulares reporteras desarrolladas en el presente trabajo, en presencia de IFN- $\alpha$ 2a o IFN- $\beta$ 1a. El protocolo de ensayo seguido fue el mismo descrito previamente en el inciso 16.1 para el monitoreo de la biblioteca de compuestos naturales.

### **16.4. Selección de compuestos respondedores**

Luego del monitoreo de los compuestos se procedió al análisis de los datos obtenidos. El mismo se realizó para cada sistema reportero, siguiendo el mismo lineamiento.

Por un lado, se calculó el promedio del %EGFP de los controles positivos ( $\mu_{C+}$ ) y su correspondiente desviación estándar ( $\sigma_{C+}$ ). Con estos datos se determinaron los límites de respuesta del sistema, mediante el cálculo de los valores de %EGFP correspondientes a  $\mu_{C+} \pm 3\sigma_{C+}$ ; correspondiendo al límite superior e inferior de respuesta. Todos los compuestos cuyo valor de % EGFP estuvo comprendido entre dichos límites fue considerado un compuesto no respondedor, por tener un comportamiento semejante al del control del ensayo, mientras que aquéllos cuyo %EGFP se observó por afuera de los límites mencionados, fueron considerados compuestos respondedores, por presentar una respuesta realmente diferente a la del control positivo del ensayo (células tratadas con IFN solamente). Es decir, fueron capaces de incrementar o disminuir el %EGFP correspondiente al control positivo, lo cual se traduce en un incremento o disminución de la respuesta del IFN.

Por otra parte, se calcularon las diferencias entre el %EGFP de cada compuesto y el %EGFP obtenido para el promedio del control positivo. De esta forma, cuanto mayor es la diferencia en el porcentaje de EGFP, mayor es el efecto del compuesto en estudio sobre la actividad del IFN.

Finalmente, se seleccionaron una serie de compuestos, los cuales cumplen con las siguientes condiciones:

- Exhibieron %EGFP fuera de los límites dados en el rango  $\mu_{C+} \pm 3\sigma_{C+}$
- Mostraron mayores diferencias del %EGFP (muestra-control positivo)
- Mantuvieron el mismo comportamiento en ambos ensayos de *screening*
- Presentaron un comportamiento semejante sobre todas las líneas celulares reporteras evaluadas, en presencia de ambos IFNs-I

Una vez seleccionados, se procedió a la caracterización de los mismos.

## 16.5. Caracterización de los compuestos seleccionados

La caracterización de los compuestos seleccionados, tanto naturales como sintéticos, se basó en estudiar más detalladamente sus propiedades, con el objetivo de identificar compuestos capaces de disminuir o incrementar la respuesta de los IFNs-I, confirmar el efecto visualizado previamente mediante el ensayo de gen reportero y determinar las condiciones en las que el efecto vislumbrado es mayor.

### 16.5.1. Evaluación de la toxicidad

La *toxicidad* es la capacidad inherente de una sustancia o molécula de producir efectos adversos en los organismos vivos o en este caso, sobre las líneas celulares utilizadas. Éste es un parámetro crítico y debe ser tempranamente determinado, dado que si los compuestos son tóxicos en las concentraciones utilizadas, su efecto modulador queda inhibido y deben ser descartados.

La susceptibilidad de cada línea celular con respecto a la toxicidad hacia un determinado compuesto puede variar dependiendo del tipo celular.

Para evaluar la toxicidad, cada una de las líneas celulares reporteras se sembró en placas de 96 cavidades en una concentración celular  $2,5 \times 10^5$  cél/ml en el medio de cultivo de crecimiento correspondiente a dicha línea, e incubadas durante 24 h a 37°C. Luego, el sobrenadante se eliminó por volcado y se sembraron 7 diluciones sucesivas 1:2 de cada compuesto (Tablas X, XI y XII). Se incubaron nuevamente las células en

presencia de distintas diluciones de compuesto, a 37°C durante 24 h. Finalmente, para revelar el ensayo, se eliminó el sobrenadante de cultivo por inversión de la placa, se escurrió y se agregaron 50 µl por pozo de una solución de cristal violeta 0,75% (P/V) en metanol 40% (V/V), incubándose durante 15 min a 37°C. Posteriormente, se eliminó el colorante, y se realizaron sucesivos lavados con agua destilada hasta verificar ausencia del colorante en los lavados. El colorante fijado fue disuelto mediante el agregado de 200 µl de ácido acético 20% (V/V) en cada cavidad y se homogeneizó. La lectura del color generado se efectuó a una  $\lambda = 540$  nm en un lector de placa de microtitulación.

Particularmente, para los compuestos sintéticos provenientes de QuiMed-FCien, la evaluación de la toxicidad se realizó previa al monitoreo del efecto de los compuestos sobre la actividad biológica de los IFNs-I mediante ensayo de gen reportero. Esta diferencia, respecto de las bibliotecas HZI nat y HZI sint, se debe particularmente al número de compuestos a analizar. Es decir, esta biblioteca de compuestos contiene un número reducido de compuestos, lo que hace factible el análisis previo de su toxicidad.

**Tabla X:** Correlación entre la dilución y la concentración estudiada para cada compuesto seleccionado de la biblioteca HZI nat. D1, D2, D3, D4, D5, D6 Y D7: Dilución 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, respectivamente.

Compuesto	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
<b>VioB (ng/ml)</b>	800,00	400,00	200,00	100,00	50,00	25,00	12,50
<b>ChoB (ng/ml)</b>	400,00	200,00	100,00	50,00	25,00	12,50	6,25
<b>Tubl (ng/ml)</b>	80,00	40,00	20,00	10,00	5,00	2,50	1,25
<b>ChiA (ng/ml)</b>	689,00	344,50	172,25	86,12	43,10	21,53	10,76
<b>Sula (mM)</b>	1,00	0,50	0,25	0,12	0,06	0,03	0,01
<b>GepA (ng/ml)</b>	416,00	208,00	104,00	52,00	26,00	13,00	6,50
<b>AuroD (ng/ml)</b>	580,00	290,00	145,00	72,50	36,25	18,12	9,06
<b>Pella (mM)</b>	1,00	0,50	0,25	0,12	0,06	0,03	0,01
<b>DisD1 (mM)</b>	1,00	0,50	0,25	0,12	0,06	0,03	0,01
<b>RhiA (ng/ml)</b>	571,00	285,50	142,75	71,37	35,69	17,84	8,92
<b>ChoC (ng/ml)</b>	980,00	490,00	245,00	122,50	61,25	30,62	15,31
<b>ChoA (ng/ml)</b>	260,00	130,00	65,00	32,50	16,25	8,12	4,06

**Tabla XI:** Correlación entre la dilución y la concentración estudiada para cada compuesto seleccionado de la biblioteca de compuestos HZI sint. D1, D2, D3, D4, D5, D6 Y D7: Dilución 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, respectivamente.

Compuesto	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
P5D7 ( $\mu\text{M}$ )	14	7	3,5	1,75	0,875	0,4375	0,21875
P5H10 ( $\mu\text{M}$ )	14	7	3,5	1,75	0,875	0,4375	0,21875
P6H1 ( $\mu\text{M}$ )	14	7	3,5	1,75	0,875	0,4375	0,21875
P6C11 ( $\mu\text{M}$ )	14	7	3,5	1,75	0,875	0,4375	0,21875
P28E1 ( $\mu\text{M}$ )	14	7	3,5	1,75	0,875	0,4375	0,21875
P28E9 ( $\mu\text{M}$ )	14	7	3,5	1,75	0,875	0,4375	0,21875
P28F7 ( $\mu\text{M}$ )	14	7	3,5	1,75	0,875	0,4375	0,21875
P28G6 ( $\mu\text{M}$ )	14	7	3,5	1,75	0,875	0,4375	0,21875
P28H3 ( $\mu\text{M}$ )	14	7	3,5	1,75	0,875	0,4375	0,21875
P28H7 ( $\mu\text{M}$ )	14	7	3,5	1,75	0,875	0,4375	0,21875

**Tabla XII:** Correlación entre la dilución y la concentración estudiada para cada compuesto seleccionado desde la biblioteca de compuestos QuiMed-FCien. D1, D2, D3, D4, D5, D6 Y D7: Dilución 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, respectivamente.

Compuesto	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
F13 ( $\mu\text{g/ml}$ )	30,6	15,3	7,7	3,8	1,9	1,0	0,5
PHD81 ( $\mu\text{g/ml}$ )	13,3	6,7	3,3	1,7	0,8	0,4	0,2
PHD100 ( $\mu\text{g/ml}$ )	68,0	34,0	17,0	8,5	4,3	2,1	1,1
PHD101 ( $\mu\text{g/ml}$ )	18,7	9,4	4,7	2,3	1,2	0,6	0,3
FVII ( $\mu\text{g/ml}$ )	35,0	17,5	8,8	4,4	2,2	1,1	0,5
PHD111 ( $\mu\text{g/ml}$ )	15,3	7,7	3,8	1,9	1,0	0,5	0,2
PHD121 ( $\mu\text{g/ml}$ )	6,7	3,4	1,7	0,8	0,4	0,2	0,1
PHD122 ( $\mu\text{g/ml}$ )	15,0	7,5	3,8	1,9	0,9	0,5	0,2
CH14BEN ( $\mu\text{g/ml}$ )	14,0	7,0	3,5	1,8	0,9	0,4	0,2
FV4Br ( $\mu\text{g/ml}$ )	21,3	10,7	5,3	2,7	1,3	0,7	0,3
FV17 ( $\mu\text{g/ml}$ )	20,0	10,0	5,0	2,5	1,3	0,6	0,3
CH4Br ( $\mu\text{g/ml}$ )	8,0	4,0	2,0	1,0	0,5	0,3	0,1
FV18 ( $\mu\text{g/ml}$ )	5,8	2,9	1,5	0,7	0,4	0,2	0,1
FV10 ( $\mu\text{g/ml}$ )	3,5	1,8	0,9	0,4	0,2	0,1	0,1
FII ( $\mu\text{g/ml}$ )	6,2	3,1	1,6	0,8	0,4	0,2	0,1
AM1 ( $\mu\text{g/ml}$ )	1,8	0,9	0,5	0,2	0,1	0,1	0,0
CDUB ( $\mu\text{g/ml}$ )	1,0	0,5	0,3	0,1	0,1	0,0	0,0
DU1 ( $\mu\text{g/ml}$ )	2,0	1,0	0,5	0,3	0,1	0,1	0,0

### 16.5.2. Evaluación de la dosis efectiva

La dosis efectiva de cada compuesto representa la mínima concentración de cada uno de ellos, que genera la mayor respuesta sobre la actividad de los rhIFNs-I. El estudio de dicho parámetro se realizó empleando el ensayo de gen reportero, evaluando cada compuesto sobre las 4 líneas reporteras en presencia de IFN- $\alpha$ 2a o IFN- $\beta$ 1a. Las potencias de cada IFN fueron constantes y correspondientes a las utilizadas en el inciso 16.1. Particularmente para este ensayo, se evaluaron diluciones sucesivas de cada compuesto en estudio. Las diluciones de compuesto analizadas fueron las mismas mencionadas en las Tablas X y XI para los compuestos provenientes del HZI, mientras que las diluciones de los compuestos sintéticos del QuiMed- FCien se detallan en la Tabla XII.

Finalizada la incubación con el IFN correspondiente y las diluciones de cada compuesto seleccionado, se analizó el porcentaje de células EGFP positivas y se realizó el análisis de datos como se explicó en la sección 16.3 mediante citometría de flujo.

Cada una de las muestras se procesó por duplicado y los controles positivos y negativos se realizaron por cuatuplicado.

### 16.5.3. Análisis del efecto de los compuestos seleccionados sobre la línea NIH3T3S1CS2YIRF7mCherry mediante microscopía de fluorescencia

La línea celular NIH3T3S1CS2YIRF7mCherry, de origen murino, es una línea reportera generada y cedida gentilmente por el Dr. Mario Köster, investigador del grupo de Regulación y Diferenciación génica del HZI (Braunschweig, Alemania).

Esta línea celular es reportera de la vía de activación de los IFNs-I ya que contiene la proteína STAT1 fusionada a la proteína reportera de fluorescencia Cyan (*CFP-Cyan fluorescence protein*) y la proteína STAT2 fusionada a la proteína reportera de fluorescencia amarilla (*YFP-yellow fluorescence protein*). Cuando las proteínas STAT están inactivas, las mismas se encuentran en el citoplasma y no fosforiladas. Éstas son proteínas involucradas en la cascada de activación/señalización de los IFNs. Es por eso que cuando los IFNs-I se unen a sus receptores específicos en la superficie celular e inician la cascada de activación, las proteínas STAT 1 y 2 se fosforilan y translocan al núcleo. Este mecanismo ocurre durante las 3-4 h posteriores a la unión de los IFNs a su receptor en la superficie celular. Dado que las proteínas STAT se encuentran unidas a proteínas fluorescentes, este sistema resulta útil para determinar si la activación de la

vía del IFN ocurre o no, la cual se evidencia mediante la traslocación de las proteínas STAT al núcleo. Este efecto es fácil de visualizar utilizando un microscopio de fluorescencia invertido, que permita ir monitoreando el cultivo de células reporteras inducidas con IFNs-I murino (mIFN-I) durante períodos de tiempo cortos.

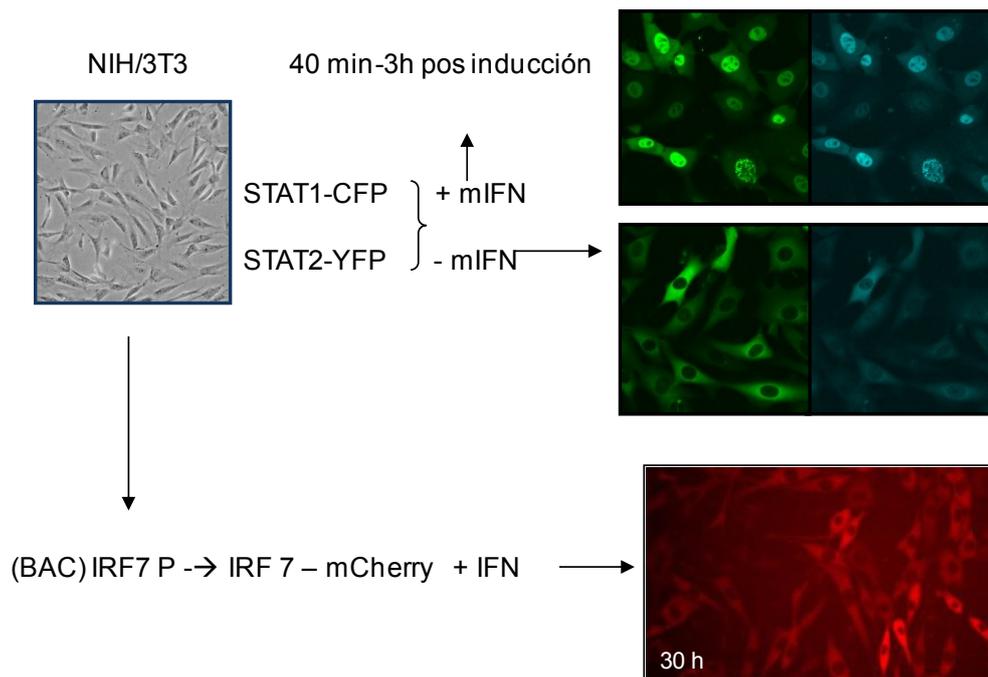
Además, esta línea reportera murina ha incorporado a su genoma una construcción BAC (*Bacterial artificial chromosome*) con el promotor IRF7 (factor de respuesta a interferon 7) gobernando la expresión de la proteína reportera mCherry, una proteína roja fluorescente. En presencia de mIFN-I se activa la cascada de fosforilación que concluye con la activación del promotor IRF7, conjuntamente con otros genes de respuesta a IFN. Luego de 30 h puede observarse la expresión de la proteína mCherry, que será proporcional a la cantidad de IFN utilizado para activar las células reporteras murinas (Fig.18).

En este trabajo, estas células se emplearon para estudiar el efecto de los compuestos naturales seleccionados, fundamentalmente, el de los compuestos inhibidores. El objetivo fue evidenciar si la inhibición de la actividad de los IFNs ocurre a nivel de unión del IFN a su receptor específico o en una instancia posterior a la translocación de las proteínas STAT al núcleo. Por su parte, el sistema IRF7-mCherry permitió determinar la actividad de los compuestos inhibidores y potenciadores, comparando la señal obtenida de la proteína reportera mCherry entre el control y las células tratadas con IFN + compuesto.

Para realizar este ensayo se utilizaron 2 controles: control positivo (células tratadas con IFN únicamente) y control de estaurosporina (células tratadas con IFN y estaurosporina). La estaurosporina es un inductor de apoptosis y, por lo tanto, un bloqueante de la actividad del IFN. Es por esto que se utiliza como control para evidenciar la inhibición de la actividad del IFN.

Para realizar el ensayo se sembraron las células reporteras en una densidad celular  $2 \times 10^5$  cél/ml sobre placas de 24 cavidades, utilizando un volumen final de 1 ml por pozo. Las mismas se incubaron por 24 h a 37°C. Transcurrido dicho tiempo se retiró el sobrenadante y se incubaron las células con interferón murino 1.000 UI/ml y los compuestos a evaluar. Se capturaron imágenes a los 15, 45, 75, 105 min y 22 h pos inducción con el mIFN, utilizando un microscopio de epifluorescencia OLYMPUS BX51 (OLYMPUS, EE.UU).

Este ensayo se realizó evaluando únicamente los compuestos naturales seleccionados.



**Fig. 18:** Línea celular murina reportera NIH3T3S1CS2YIRF7mCherry. Durante las 3 h siguientes al agregado del mIFN las proteínas STAT1/STAT2 se activan y traslocan al núcleo, mientras que en ausencia de IFN, las mismas se encuentran en el citoplasma. Este comportamiento puede visualizarse gracias a las proteínas reporteras CFP e YFP fusionadas a las proteínas STAT1 y STAT2, respectivamente. Luego de 30 h de agregar el mIFN puede observarse la expresión de proteína reportera mCherry, como resultado de la activación del promotor IRF7.

#### 16.5.4. Análisis del efecto residual de los compuestos sobre el cultivo celular para modular la actividad de los IFNs- I

Este ensayo se realizó con el objetivo de evaluar si los compuestos seleccionados, tanto naturales como sintéticos, presentan un efecto residual sobre la actividad de los IFNs-I. Es decir, se pretende evidenciar si son capaces de mantener su efecto inhibitor o potenciador de la actividad biológica de los IFNs-I, aún cuando los mismos ya no están en contacto con las células reporteras.

Para llevar a cabo este análisis, se utilizó el ensayo de gen reportero empleando la línea celular reportera WISH-Mx2/EGFP en presencia de IFN- $\beta$ 1a 10 UI/ml. Los compuestos analizados fueron utilizados en una concentración constante, correspondiente a la dosis efectiva de cada uno de ellos. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado, incluyendo los siguientes controles apropiados:

- control negativo (células sin tratamiento)
- control positivo (células incubadas con IFN- $\beta$ 1a)

- control de compuesto (células tratadas únicamente con el compuesto en estudio)

Se sembraron las células en placas de 96 cavidades con una densidad celular de  $2,5 \cdot 10^5$  cél.ml<sup>-1</sup> y se incubaron durante 24 h a 37°C. Se descartó el sobrenadante de cada cavidad y se agregaron las muestras como se indica a continuación, respetando las siguientes condiciones:

- a) Incubación del compuesto por 1 h, luego se descarta el sobrenadante, se lava la cavidad con medio de cultivo basal e inmediatamente se siembra el IFN. Se incuban las células durante 24 h a 37°C.

Compuesto 1 h → Lavado → IFN

- b) Incubación del compuesto por 1 h, luego se descarta el sobrenadante, se lava la cavidad con medio de cultivo basal durante 1 h, se retira el sobrenadante y se siembra el IFN. Se incuban las células durante 24 h a 37°C.

Compuesto 1 h → Lavado x 1 h → IFN

- c) Incubación del compuesto por 1 h, luego se descarta el sobrenadante, se lava la cavidad con medio de cultivo basal durante 2 h, se retira el sobrenadante y se siembra el IFN. Se incuban las células durante 24 h a 37°C.

Compuesto 1 h → Lavado x 2 h → IFN

- d) Incubación del compuesto por 1 h, luego se descarta el sobrenadante, se lava la cavidad con medio de cultivo basal durante 3 h, se retira el sobrenadante y se siembra el IFN. Se incuban las células durante 24 h a 37°C.

Compuesto 1 h → Lavado x 3 h → IFN

Transcurrido el tiempo de incubación, se analizan las muestras mediante citometría de flujo para evaluar el porcentaje de células EGFP positivas y compararlas con los controles correspondientes.

#### **16.5.5. Análisis de la reversión de la activación de los IFNs-I por parte de los compuestos**

Mediante este ensayo se evaluó la capacidad de los compuestos inhibidores de la actividad del IFN de ejercer su efecto aún después de haberse iniciado la cascada de activación/fosforilación del IFN.

Cada una de las muestras se procesó por duplicado y se realizaron los controles de ensayo correspondientes: control negativo, control positivo y control de compuesto.

Este análisis se efectuó utilizando el ensayo de gen reportero con las células WISH Mx2/EGFP, en presencia de IFN- $\beta$ 1a 10 UI/ml. Los compuestos fueron analizados en una concentración constante, correspondiente a su dosis efectiva.

Las células reporteras se sembraron sobre placas de 96 cavidades en una densidad de  $2,5 \times 10^5$  cél/ml y se incubaron durante 24 h a 37°C. Se descartó el sobrenadante de cada pozo y se agregaron las muestras según las siguientes condiciones:

- a) Pre incubación de las células con el IFN durante 1 h y luego se agrega el compuesto en estudio, continuando la incubación de las células con IFN + compuesto durante 24 h a 37°C.

IFN  $\rightarrow$  1 h después + compuesto  $\rightarrow$  IFN + compuesto 24 h

- b) Pre incubación de las células con el IFN durante 2 h y luego se agrega el compuesto en estudio, continuando la incubación de las células con IFN + compuesto durante 24 h a 37°C.

IFN  $\rightarrow$  2 h después + compuesto  $\rightarrow$  IFN + compuesto 24 h

- c) Pre incubación de las células con el IFN durante 3 h y luego se agrega el compuesto en estudio, continuando la incubación de las células con IFN + compuesto durante 24 h a 37°C.

IFN  $\rightarrow$  3 h después + compuesto  $\rightarrow$  IFN + compuesto 24 h

A continuación, se determinó el porcentaje de células EGFP positivas desarrolladas por cada muestra y los correspondientes controles mediante citometría de flujo.

#### **16.5.6. Valoración de la AVA empleando las líneas celulares reporteras para evaluar el efecto de los compuestos seleccionados**

Luego del *screening* y la selección de los compuestos potencialmente moduladores de la actividad biológica de los IFNs, se evaluó el comportamiento de los mismos, midiendo su respuesta mediante otros ensayos utilizados también para determinar la

actividad biológica de los IFNs. Para ello, fue necesario optimizar las condiciones del ensayo de actividad antiviral en cuanto a:

- El rango de concentraciones de rhIFNs necesarias para cada línea celular.
- La dilución del virus VSV necesaria para infectar cada línea celular reportera.

Estas condiciones fueron evaluadas y estandarizadas como se muestran en la Tabla XIII.

Se realizó el ensayo de actividad antiviral siguiendo la metodología descrita en la sección 13.1. El inciso 2 fue modificado, dado que se utilizaron los rangos de potencias de IFN puestos a punto anteriormente y mencionados en la Tabla XIII. De esta forma, se analizaron distintos compuestos en una dilución constante, correspondiente a la dosis efectiva de cada uno de ellos, en presencia de diluciones sucesivas de cada uno de los IFNs y éstos comparados con las curvas dosis-respuesta de cada uno de los estándares (curvas de rhIFN- $\alpha$ 2a o rhIFN- $\beta$ 1a).

**Tabla XIII:** Dilución de virus VSV óptima para generar lisis total de cada línea celular evaluada y rango de potencias de IFN que permiten obtener un rango lineal en las curvas de dosis-respuesta, para poder calcular la actividad antiviral de las muestras de IFN respecto de los estándares.

Línea celular	Dilución Virus VSV	Rango de potencias (UI/ml)	
		rhIFN- $\alpha$ 2a	rhIFN- $\beta$ 1a
HeLa-Mx2/EGFP	1/80	50 - 1,56	50 - 1,56
A549-Mx2/EGFP	1/80	100 - 3,12	100 - 3,12
HEp2-Mx2/EGFP	1/50	25 - 0,78	25 - 0,78
WISH-Mx2E/GFP	1/160	25 - 0,78	5 - 0,16

En estos ensayos se incluyó otro control, el control de compuesto, donde cada una de las líneas celulares fue tratada únicamente con el compuesto en estudio; es decir, sin IFN y luego infectadas con el virus VSV. De forma de poder dilucidar si existe un efecto sobre la actividad antiviral, que sea propia de cada compuesto.

#### **16.5.7. Análisis del efecto de los compuestos sobre la actividad antiproliferativa (AA) de los IFNs-I**

Continuando con el estudio de estos compuestos, se procedió a evaluar otra de las actividades biológicas características de los IFNs-I la actividad antiproliferativa. Es decir, el efecto inhibitor sobre el crecimiento celular que poseen estas citoquinas.

Se analizó la actividad antiproliferativa de cada compuesto en presencia de IFN- $\beta$ 1a e IFN- $\alpha$ 2a, empleando la línea celular reportera WISH-Mx2/EGFP, siguiendo el protocolo descrito en la sección 13.2. Cada una de las muestras se comparó con el control del correspondiente estándar.

#### **16.5.8. Estudio de las fases del ciclo celular de células WISH-Mx2/EGFP y HeLa-Mx2/EGFP tratadas con los compuestos seleccionados desde las bibliotecas de compuestos naturales y sintéticos.**

La determinación del contenido de ácidos nucleicos por citometría de flujo se emplea con diferentes finalidades, por ejemplo, para analizar las fases del ciclo celular, determinar la ploidía de una población, analizar la apoptosis, estimar el tamaño genómico, realizar un cariotipo citométrico, entre otras. Para medir el contenido de ADN, las células deben ser teñidas con una sonda fluorescente que refleje en forma precisa la cantidad del ácido nucleico, es decir, ésta debe unirse estequiométricamente al ADN. En general, las sondas para ácidos nucleicos son débilmente fluorescentes en soluciones acuosas, pero aumentan notoriamente la intensidad de fluorescencia cuando están unidas al ADN debido a la naturaleza hidrofóbica del ambiente. Específicamente, el ioduro de propidio (IP) es uno de los colorantes más usados para teñir el ADN, el cual se intercala entre las bases de la doble cadena de ácidos nucleicos y por lo tanto puede unirse a RNA de doble cadena (Deitch y col., 1982). Si bien esto puede constituir una desventaja, ya que tiñe ADN y RNA, en la actualidad existen protocolos optimizados donde las células son tratadas con RNAasa para remover todo el RNA, favoreciendo el incremento de la especificidad de la tinción del IP por el ADN (Fried y col. 1976; Deitch y col., 1982) y determinar en forma precisa el contenido de ADN y asociarlo a las distintas fases del ciclo celular.

Con el objetivo de evaluar si estos compuestos afectan particularmente alguna de las fases del ciclo celular, el mismo fue evaluado mediante citometría de flujo, empleando la línea celular reportera WISH-Mx2/EGFP para los compuestos provenientes del HZI, y empleando las líneas celulares reporteras WISH-Mx2/EGFP y HeLa-Mx2/EGFP para los compuestos provenientes de QuiMed-FCien. Esta diferencia se debe, particularmente, a que los compuestos provenientes de QuiMed-FCien mostraron resultados más variados sobre las diferentes líneas celulares estudiadas. Es por este motivo, que se seleccionó la línea WISH como modelo de la línea normal y la línea HeLa como representante de las líneas tumorales.

Para ello, se sembraron las células reporteras en placas de 12 pozos, en una densidad celular  $2,5 \times 10^5$  cél/ml en medio de cultivo de crecimiento MEM suplementado

con 10% SFB, en un volumen final de 1 ml por pozo y se incubaron durante 24 h a 37°C.

Transcurrido dicho tiempo, el sobrenadante de cada pozo se eliminó y se sembraron las muestras y los controles a evaluar y se incubaron nuevamente durante 24 h a 37°C:

- Control rhIFN- $\alpha$ 2a: Células tratadas únicamente con 60 UI/ml IFN- $\alpha$ 2a
- Control rhIFN- $\beta$ 1a: Células tratadas únicamente con 20 UI/ml IFN- $\beta$ 1a
- Control sin tratar: células que no recibieron ningún tipo de tratamiento
- Control de compuesto: Células tratadas únicamente con el compuesto de interés en la concentración correspondiente a su dosis efectiva
- Muestra 1: Células tratadas con el compuesto en su dosis efectiva + rhIFN $\alpha$ 2a 60 UI/ml
- Muestra 2: Células tratadas con el compuesto en su dosis efectiva + rhIFN  $\beta$ 1a 20 UI/ml

Cada una de las muestras y controles fueron ensayados por triplicado.

Transcurrido el tiempo de incubación con el compuesto y/o los rhIFNs, las células se desprendieron de la placa utilizando tripsina y se resuspendieron en PBS 1X libre de calcio y magnesio, para comenzar con el procedimiento de fijación y marcación del contenido de ADN, para el análisis posterior del ciclo celular correspondiente a cada condición.

Las células se centrifugaron a 1.000 rpm durante 10 min de forma de obtener el *pellet* celular. A continuación, se eliminó el sobrenadante, y muy lentamente, gota a gota, se agregó 1 ml de etanol frío 70% (V/V) y se incubó durante 15 min, para fijar las células. Luego, se realizó el recuento de cada muestra de forma de preparar una suspensión celular de  $1 \times 10^6$  cél/ml en PBS 1X libre de calcio y magnesio.

Posteriormente, las células fueron tratadas con RNAsa 50  $\mu$ g/ml durante 30 min a 37°C, de forma tal de degradar el RNA remanente en el núcleo y citoplasma, que luego puede interferir en la determinación del contenido de ADN. Finalmente, se marcaron los núcleos celulares con ioduro de propidio (IP) 50  $\mu$ g/ml durante 30 min como mínimo.

El IP es un fluoróforo ampliamente utilizado para determinación del contenido de ADN por diferentes técnicas como citometría de flujo. El mismo se intercala entre las bases de ADN con alta afinidad. Al ser excitado, emite una fluorescencia roja, fácilmente detectada por la mayoría de los citómetros de flujo.

El contenido celular relativo de ADN teñido fue medido empleando un citómetro de flujo CyAn™ ADP Analyzer (Beckman Coulter (DAKO, EE.UU) equipado con un láser que emite a 488 nm. La adquisición de datos se efectuó a una velocidad de 80-120 eventos por segundos y utilizando el *software* Summit v3.4. Los datos de fluorescencia fueron obtenidos de 20.000 células totales, como mínimo, por cada muestra analizada. La intensidad de la fluorescencia medida fue proporcional al contenido de ADN de una sola célula. Previo a la integración de las muestras se realizó el descarte de dobletes y detritos celulares. La proporción de células en cada una de las fases del ciclo celular, G1, G2 + M y S, fue obtenida empleando el *software* FlowJo™ versión 7.6.5, con el paquete de análisis para ciclo celular. Previamente a la adquisición de las muestras, se realizaron los ajustes adecuados empleando las células sin tratamiento como control.

Finalmente, se realizó el tratamiento estadístico de los datos obtenidos utilizando el programa GraphPad Prism 6 Demo. Se aplicó un *test* ANOVA comparando cada una de las muestras entre sí y con los controles del ensayo para evaluar si existiera o no una diferencia significativa entre cada caso de estudio.

#### **16.5.9. Análisis de compuestos potencialmente inductores de apoptosis mediante microscopía de fluorescencia**

Al evaluar ciclo celular, en algunos casos, puede visualizarse un pico previo al pico G1, el cual se denomina pico sub G1. Éste representa el grupo de células en estado apoptótico cuyo núcleo se encuentra fragmentado.

Aquellos compuestos que demostraron un incremento de la fase subG1 en el análisis de ciclo celular fueron evaluados por microscopía de fluorescencia, con el objetivo de corroborar si los mismos presentan un efecto apoptótico sobre las células. El análisis se llevó a cabo mediante la fijación celular, posterior marcación de los núcleos celulares con IP e identificación de signos de apoptosis, tales como fragmentación nuclear, formación de cuerpos apoptóticos, cambios en la morfología nuclear y celular, entre otros.

Se sembraron las células reporteras WISH-Mx2/EGFP sobre cubreobjetos en placas de 12 pozos, en una densidad celular de  $2 \times 10^5$  cél/ml y se las incubó durante 24 h a 37°C. Transcurrido dicho tiempo, se descartó el sobrenadante y se sembraron las muestras (compuestos+ IFN) y los correspondientes controles utilizando las mismas condiciones descritas para el análisis de ciclo celular en la sección 16.4.1.8. Nuevamente se incubaron las células durante 24 h.

Seguidamente, se lavaron las células utilizando PBS 1X y se fijaron empleando paraformaldehído (PFA) 4% P/V durante 30 min. A continuación, se realizaron 3 lavados consecutivos de 15 min cada uno con PBS-Tween 0,2% V/V para permeabilizar las membranas celulares y permitir de esta forma que ingrese posteriormente el colorante IP para teñir los núcleos. Se realizó el tratamiento con RNAsa 30  $\mu\text{g/ml}$  durante 30 min a 37°C. Este paso es fundamental para eliminar el RNA citoplasmático, ya que esto luego interfiere en los resultados del ensayo. Nuevamente se realizaron 2 lavados utilizando PBS-BSA 0,1% (V/V) y se incubaron las células con una solución de IP 25  $\mu\text{g/ml}$  durante 30 min. Finalmente se realizaron 2 lavados finales utilizando PBS-BSA 0,1% (V/V) y se montaron los cubreobjetos con las células tratadas sobre portaobjetos, utilizando *Vectashield® mounting medium* (Vector Laboratories, EE.UU.) como líquido de montaje. Se analizaron las muestras utilizando el microscopio de fluorescencia invertido Eclipse Ti-S (NIKON, EE.UU), y las imágenes fueron capturadas empleando el software NIS-Elements (NIKON, EE.UU).

#### **16.6. Evaluación del efecto combinado de compuestos sintéticos provenientes de la biblioteca de QuiMed FCien sobre la actividad del IFN- $\alpha$ 2a**

De acuerdo con lo descrito en la introducción, un objetivo terapéutico es disminuir la actividad biológica del IFN- $\alpha$ 2a, producido de manera exacerbada por el propio organismo en algunas patologías. Es por ello que resulta muy importante encontrar moléculas capaces de cumplir con este propósito; es decir, compuestos que inhiban, o al menos disminuyan, la actividad biológica del IFN. Una vez encontradas tales moléculas, resulta interesante investigar si el efecto demostrado por cada compuesto se ve potenciado al ser combinado con otros compuestos que muestren comportamientos similares. Con este propósito se estudió si existía un efecto potenciado, en cuanto a la inhibición de la actividad de los rhIFNs, al combinar diferentes compuestos, evaluándolos en simultáneo. Para ello, se procedió al diseño de un ensayo de superficie de respuesta, empleando el software *Design Expert*. A su vez, se seleccionaron 5 compuestos para este nuevo screening: F13, FV4Br, FVII, PHD101 y FV10. La selección se realizó en base a datos estructurales de estos compuestos cedidos por los responsables de las bibliotecas. De esta manera, se buscó trabajar con compuestos representantes de distintos grupos químicamente estructurales.

En este primer ensayo de superficie de respuesta se utilizaron únicamente las células WISH-Mx2/EGFP y el rhIFN- $\alpha$ 2a. Una vez más, se utilizó el ensayo de gen reportero, siguiendo el mismo protocolo que el utilizado para el monitoreo de compuestos (Sección 16).

Se trabajó con una potencia constante de rhIFN- $\alpha$ 2a equivalente a 60 UI/ml final por pozo en presencia de las combinaciones de compuestos indicadas por el programa de superficie de respuesta que se muestran en la Tabla XIV. Las mismas resultaron combinaciones de 3 compuestos. Además se evaluaron cada uno de los 5 compuestos solos y la combinación de los 5. Los controles positivos (células tratadas únicamente con rhIFN- $\alpha$ 2a 60 UI/ml final por pozo) y negativos (células sin tratar) fueron evaluados por cuadruplicado.

Una vez realizado el ensayo, evaluando cada combinación por duplicado, se compararon los porcentajes de células EGFP positivas obtenidas para cada una de las combinaciones con los correspondientes controles.

**Tabla XIV:** Combinación de compuestos sintéticos sugeridos por el programa *Design Expert*, para el estudio del efecto combinado de los mismos sobre la actividad del rhIFN- $\alpha$ 2a.

Std	Run	Factor 1 A: F13	Factor 2 B: PHD101	Factor 3 C: FVII	Factor 4 D: FV4Br	Factor 5 E: FV10
4	1	10,00	10,00	0,00	0,00	10,00
14	2	10,00	0,00	10,00	10,00	0,00
5	3	0,00	0,00	10,00	0,00	0,00
8	4	10,00	10,00	10,00	0,00	0,00
6	5	10,00	0,00	10,00	0,00	10,00
10	6	10,00	0,00	0,00	10,00	10,00
16	7	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
11	8	0,00	10,00	0,00	10,00	10,00
9	9	0,00	0,00	0,00	10,00	0,00
3	10	0,00	10,00	0,00	0,00	0,00
7	11	0,00	10,00	10,00	0,00	10,00
12	12	10,00	10,00	0,00		0,00
1	13	0,00	0,00	0,00	0,00	10,00
13	14	0,00	0,00	10,00	10,00	10,00
2	15	10,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	16	0,00	10,00	10,00	10,00	0,00

Seguidamente, para continuar evaluando las combinaciones de compuestos, se seleccionaron 4 del total de 16 condiciones. Las mismas se enumeran a continuación:

- Compuesto B (PHD101) solo
- Combinación de todos los compuestos: ABCDE (F13; PHD101; FVII; FV4Br; FV10)

- Combinación de compuestos BCE (PHD101; FVII; FV10)
- Combinación de compuestos BDE (PHD101; FV4Br; FV10)

#### **16.6.1. Evaluación de la citotoxicidad de las combinaciones de compuestos**

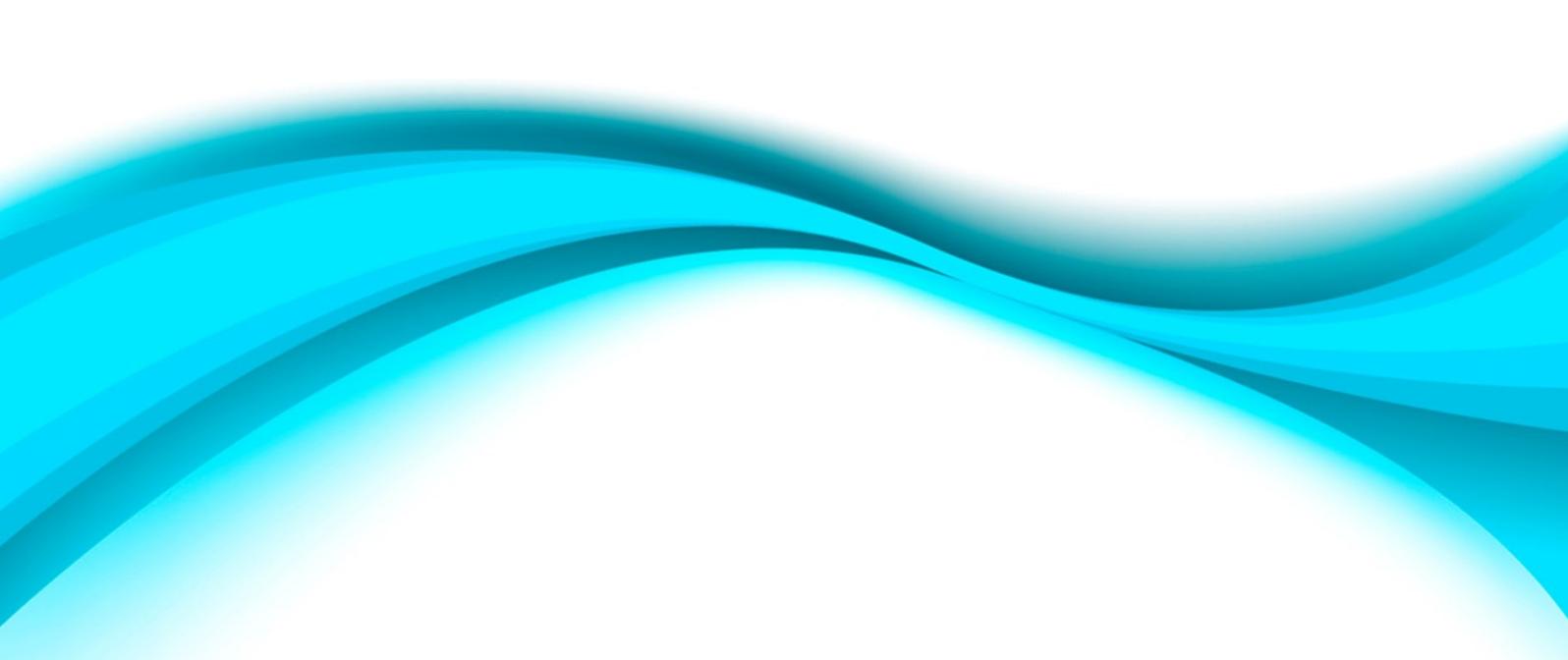
Del mismo modo que se estudió la toxicidad de cada compuesto individualmente, se analizó también la toxicidad de todas las combinaciones de compuestos realizadas. Este estudio se realizó sobre células WISH, empleando la tinción de la monocapa celular viable, con el colorante cristal violeta luego de la exposición con los compuestos. El protocolo seguido fue el mismo empleado para evaluar la toxicidad de cada compuesto, descrito en la sección 16.5.1.

#### **16.6.2. Evaluación del efecto combinado de compuestos sintéticos provenientes de la biblioteca QuiMed FCien sobre la actividad del IFN- $\alpha$ 2a, evaluado por ensayo de AVA**

Con el objetivo de dilucidar si el comportamiento que mostraron las combinaciones de compuestos al ser evaluados mediante el ensayo de gen reportero se mantiene también sobre la actividad antiviral de la citoquina, es que se evaluó este aspecto, siguiendo el protocolo descrito en la sección 16.5.6.

#### **16.6.3. Evaluación del efecto combinado de compuestos sintéticos provenientes de la biblioteca QuiMed FCien sobre la actividad del IFN- $\alpha$ 2a, evaluado por ensayo AA**

Con el objetivo de dilucidar si el comportamiento que mostraron las combinaciones de compuestos al ser evaluados mediante el ensayo de gen reportero se mantiene también sobre la actividad antiproliferativa de la citoquina, es que se evaluó este aspecto siguiendo el protocolo descrito en la sección 16.5.7.



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

“La energía y la perseverancia conquistan todas las cosas”.  
Benjamin Franklin

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **1. Obtención del vector de expresión pMx2/EGFP-C1**

El vector de expresión pEGFP-C1 (Clontech, EE.UU) contiene la secuencia de la proteína reportera EGFP, cuya expresión se encuentra dirigida por el promotor CMV. Este es un promotor fuerte y constitutivamente activo y dadas sus propiedades se utiliza habitualmente para dirigir la expresión de transgenes en células de mamíferos, alcanzando altos niveles de expresión. El vector pEGFP-C1 se utiliza como reportero de manera que al transfectar células de mamífero, la proteína EGFP se expresa constitutivamente. Sin embargo, en el sistema reportero que se diseñó, la proteína reportera no se expresa de manera constitutiva. Ello se debe a que se pretende que la expresión de la misma esté regulada y sólo se active frente a determinadas condiciones. Para alcanzar este propósito fue necesario cambiar el promotor de expresión constitutiva por un promotor regulable de la expresión.

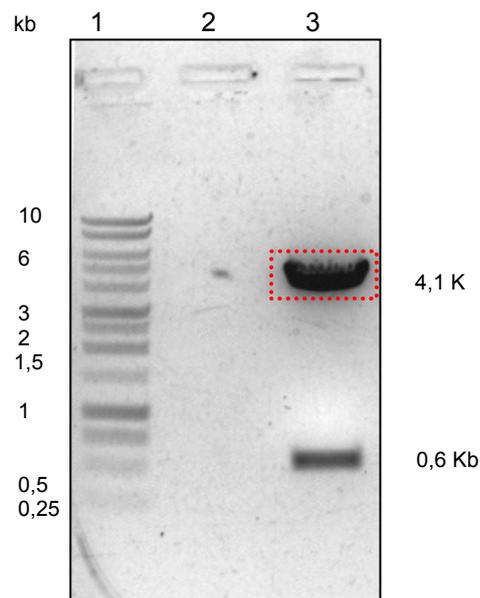
El vector pEGFP-C1 se utilizó como molde para construir el vector de expresión pMx2/EGFP. Para ello, se escindió el promotor CMV y en su lugar se clonó el promotor Mx2 de origen murino. Este último es un promotor inducible específicamente por IFNs-I. De esta manera, la expresión de EGFP en este sistema sólo se desarrollará como consecuencia de la activación del promotor Mx2. Se seleccionó el promotor Mx2 murino debido a que éste fue utilizado exitosamente por LLeonardt y col. (1990). Por otro lado, se pretendió evitar cualquier posibilidad de activación del promotor por IFN- $\gamma$  humano. Estos autores demostraron que el promotor Mx2 murino no es activado por el IFN- $\gamma$  humano. Por su parte, Ronni y col. (1998) concluyeron que el promotor MxA humano sí podía ser activado, débilmente, por la citoquina antes mencionada. Dado que nuestro objetivo fue mantener la especificidad del ensayo por los IFNs-I, seleccionamos el promotor murino Mx2.

Para llevar a cabo el clonado, en una primera etapa se amplificó el ADN mediante una minipreparación de ADN plasmídico del vector pEGFP-C1; lo que permitió obtener cantidad suficiente del ácido nucleico, necesario para los pasos siguientes.

A continuación, se realizó la digestión secuencial del vector pEGFP-C1 utilizando las enzimas de restricción *Asel* y *NheI*. Los sitios de restricción para estas enzimas de digestión se encuentran flanqueando la secuencia del promotor CMV. Por lo tanto, luego de la digestión secuencial se obtuvieron por un lado, el plásmido sin promotor y, por otro, el promotor CMV. Para corroborar la eficiencia de la digestión, se analizaron los fragmentos de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (P/V) (Fig.19). En dicha figura se observa claramente la eficiencia de la digestión del vector pEGFP-C1.

Se visualizan 2 bandas, correspondientes a fragmentos de ADN de tamaños aproximados de 600 pb y 4.100 pb. El fragmento más pequeño pertenece a la secuencia genética del promotor CMV y el más grande, al vector pEGFP-C1 cuyo promotor fuerte fue escindido.

Posteriormente, el fragmento de ADN correspondiente al vector digerido sin promotor, se purificó desde el gel de agarosa para efectuar, posteriormente, la ligación con el promotor Mx2 inducible por IFNs-I (Nakade y col., 1997; Haller y col., 2007).



**Fig. 19:** Análisis de la digestión del vector pEGFP-C1 con las enzimas de restricción *AseI/NheI*.

Calle 1: Marcador de masa molecular *Beanch Top Ladder* 1 Kb.

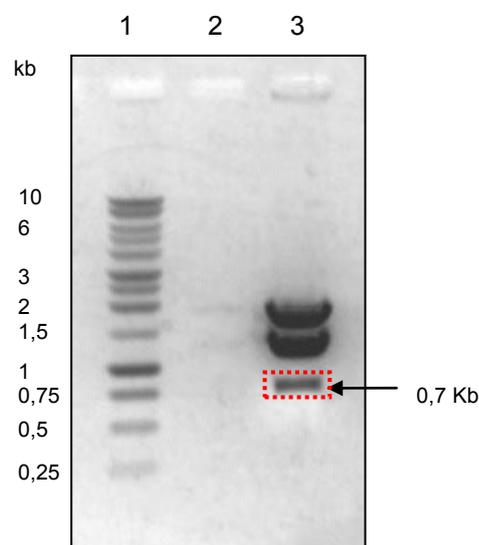
Calle 3: Vector pEGFP-C1 digerido secuencialmente mediante las enzimas *AseI/NheI*

Por su parte, se solicitó la síntesis de la secuencia del promotor Mx2 a GENEART. La misma fue previamente amplificada mediante minipreparación de ADN plasmídico y digerida secuencialmente con las mismas enzimas de restricción *AseI/NheI* a partir del vector 0917512Mx2p-pMA, en el cual se recibió. La eficiencia de la digestión se analizó mediante corrida electroforética en un gel de agarosa 1% (P/V) (Fig. 20).

En la Fig. 20 se muestra la imagen obtenida del gel de agarosa luego de la corrida electroforética. En él puede observarse la eficiencia de la digestión. El vector de clonado 0917512 Mx2p pMA contiene los sitios de restricción para las enzimas *AseI* y *NheI* flanqueando al promotor Mx2 y un sitio de restricción adicional para la enzima *AseI*. Es por este motivo que luego de la digestión con ambas enzimas, se obtuvieron 3 bandas correspondientes a fragmentos de ADN de diferentes tamaños moleculares. El

fragmento más pequeño, de 700 pb, corresponde a la secuencia del promotor Mx2, mientras que las 2 bandas restantes corresponden a subproductos del vector de clonado 0917512 Mx2p pMA digerido. Una vez que la eficiencia de la digestión de ADN fue confirmada, el fragmento de ADN correspondiente al promotor Mx2 fue purificado desde el gel de agarosa empleando un *kit* comercial.

De esta forma, se obtuvieron los fragmentos de ADN purificados, correspondientes al promotor Mx2 y al vector pEGFP-C1 sin promotor, digeridos con las enzimas de restricción *Asel/Nhel*. Luego de determinar la concentración y pureza de cada uno de los fragmentos mediante lectura espectrofotométrica a  $\lambda = 260$  nm, los mismos fueron ligados utilizando la enzima T4 DNA ligasa, la cual cataliza la unión de los extremos de ADN del inserto y el vector, en presencia de ATP y soluciones tamponadas adecuadas. La relación utilizada para dicha ligación fue de 2 partes de inserto por cada parte de vector denominándose a esta ligación (V+I). De esta manera, se generó el vector de expresión pMx2/EGFP. Simultáneamente, se realizó un control de vector religado (VR), para el cual se utilizó solamente el vector digerido sin promotor, con el objetivo de evidenciar la factibilidad de religación del vector digerido. Las mezclas de ligación se utilizaron para transformar células *E. coli* DH5 $\alpha$ F'1q competentes para obtener las colonias recombinantes.

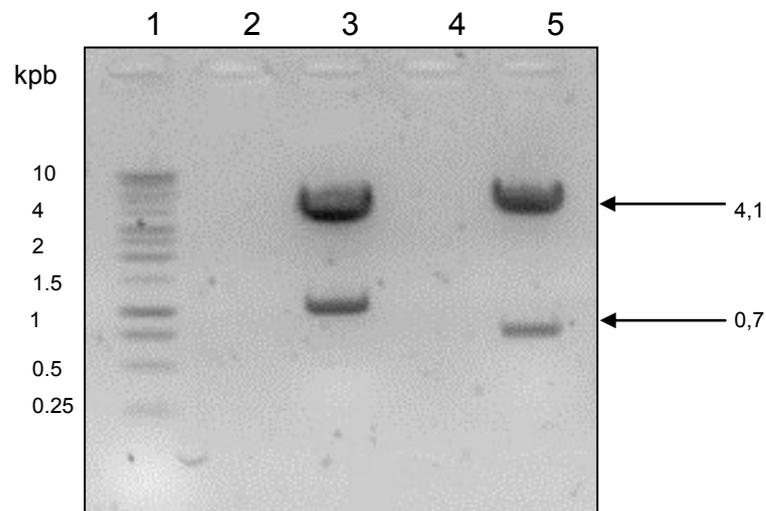


**Fig. 20:** Digestión del promotor Mx2 con las enzimas de restricción *Asel/Nhel*.  
 Calle 1: Marcador de masa molecular *Beanch Top Ladder* 1 Kb.  
 Calle 3: Vector 0917512Mx2p-pMA digerido secuencialmente mediante las enzimas *Asel/Nhel*

Como resultado de la transformación de células competentes, no se registró crecimiento de colonias para el control de VR, pero se observó crecimiento de 7 colonias recombinantes sobre la placa de V+I. Todas ellas fueron analizadas mediante diferentes digestiones con enzimas de restricción, para confirmar que la secuencia del promotor Mx2 se haya clonado correctamente en el sitio del promotor CMV, previamente escindido, del vector pEGFP-C1.

Para ello, se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico a partir de las 7 colonias recombinantes. Se efectuaron 2 digestiones. En una de ellas se empleó con la enzima *SacI*, cuyo sitio de restricción está presente 2 veces en el vector recombinante generado (uno de estos sitios fue incorporado al plásmido conjuntamente con la secuencia del promotor Mx2 y el otro ya se encontraba presente en el vector pEGFP-C1). Es decir, si las colonias analizadas son recombinantes, luego de la digestión con la enzima *SacI*, debían obtenerse 2 fragmentos de ADN; contrariamente, el vector debería linealizarse debido a que presenta originalmente un sólo sitio de restricción para la enzima *SacI*.

La digestión restante se realizó con el propósito de corroborar la presencia del inserto, es decir, el promotor Mx2, digiriendo en forma secuencial con las enzimas *AseI* y *NheI*. A modo de ejemplo se muestra el análisis de la colonia recombinante 6 (Fig. 21), donde se observan los perfiles de bandas correspondientes a la digestión de los vectores recombinantes con diferentes enzimas de restricción y puede comprobarse el reemplazo en el plásmido pEGFP-C1 del promotor CMV por el promotor Mx2. En el carril 3, se observa un patrón de dos bandas de ADN obtenidas luego de la digestión del vector recombinante con la enzima de restricción *SacI*. Las bandas así obtenidas tienen un tamaño aproximado a 1.000 y 3.800 pb, que se corresponden con el tamaño de fragmentos de DNA que deberían liberarse luego de la digestión del plásmido pMx2/EGFP. Por su parte, en el carril 5 se observa un perfil de dos bandas de ADN luego de la digestión secuencial con las enzimas de restricción *AseI/NheI*, y las mismas corresponden al promotor Mx2 de 700 pb y al vector pEGFP sin promotor con un tamaño de aproximadamente 4.100 pb. De este modo, se demostró el éxito de la construcción del vector de expresión pMx2/EGFP.



**Fig. 21:** Evaluación de las colonias recombinantes pMx2/EGFP mediante digestión con enzimas de restricción.

Calle 1: Marcador de masa molecular *Beanch Top Ladder* 1 Kb.

Calle 3: Plásmido de la colonia recombinante 6 digerido con la enzima de restricción *SacI*.

Calle 5: Plásmido de la colonia recombinante 6 digerido con las enzimas de restricción *AseI/NheI*.

Complementariamente, con el objetivo de confirmar el clonado y evaluar que no hayan ocurrido mutaciones durante el procedimiento desarrollado, se secuenció el vector recombinante generado. No se encontraron diferencias luego del alineamiento con la secuencia teórica, garantizando la calidad del vector generado (Fig. 22).

Una vez confirmada la secuencia genética, se criopreservaron las colonias recombinantes pMx2/EGFP y se amplificó el plásmido desarrollado, mediante maxipreparación de ADN plasmídico, para utilizarlo en el procedimiento de transfección de células eucariotas.

1	TAGTTATTAATAAGTCTAAGGGCTCTGAGGACAGACACTTACTTCCCTGA	50	601	GGCAGCTGCACACTCTGTCTCCAGCCCGAGTGGTGAAGTGTGCACAGG	650
1	TAGTTATTAATAAGTCTAAGGGCTCTGAGGACAGACACTTACTTCCCTGA	50	601	GGCAGCTGCACACTCTGTCTCCAGCCCGAGTGGTGAAGTGTGCACAGG	650
51	GCTGGGGGATGTTCTCTGACAGAGCAGGGCTCTCTCTGAGGAGAGAGGCA	100	651	ATTCTGTGGAGGGATAGAGGATACCTTCTAAGACTTCTTTGTAGACTG	700
51	GCTGGGGGATGTTCTCTGACAGAGCAGGGCTCTCTCTGAGGAGAGAGGCA	100	651	ATTCTGTGGAGGGATAGAGGATACCTTCTAAGACTTCTTTGTAGACTG	700
101	AGGTGCACAGGCCCCAGAGGCCAGCACTTCTCACTCACCAGCCCTG	150	701	GTAAAGTACAGCAGGGCAITTTGGCTAGCCCTACCGGTCGOCACCATGGTGA	750
101	AGGTGCACAGGCCCCAGAGGCCAGCACTTCTCACTCACCAGCCCTG	150	701	GTAAAGTACAGCAGGGCAITTTGGCTAGCCCTACCGGTCGOCACCATGGTGA	750
151	CAGCAGCAGTGTGCTCAGAACCTCTAAACCTGTAGTACACAGGGACCTGA	200	751	GCAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCOCATCCTGGTCGAGCTG	800
151	CAGCAGCAGTGTGCTCAGAACCTCTAAACCTGTAGTACACAGGGACCTGA	200	751	GCAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCOCATCCTGGTCGAGCTG	800
201	AGGGCTGGCAGGGCTCCTCAGTGATTOCTGGTATGGTTGTCTCTGACCC	250	801	GACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGGAGGGCGAGGG	850
201	AGGGCTGGCAGGGCTCCTCAGTGATTOCTGGTATGGTTGTCTCTGACCC	250	801	GACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGGAGGGCGAGGG	850
251	TTCTAGTGCAGCTGGAAAGATCCAGTGAAGAGAGAAAGTTAGTCTAGGT	300	851	CGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCCACGGCA	900
251	TTCTAGTGCAGCTGGAAAGATCCAGTGAAGAGAGAAAGTTAGTCTAGGT	300	851	CGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCCACGGCA	900
301	TGTGTTCAATTGAGAGGAGTCAAGCTGAAGGCTCAGCAGCAGAGCTGAGG	350	901	AGCTGCCCTGTCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGGCGTG	950
301	TGTGTTCAATTGAGAGGAGTCAAGCTGAAGGCTCAGCAGCAGAGCTGAGG	350	901	AGCTGCCCTGTCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGGCGTG	950
351	AGGGGGATGGTCTCTGGGAAAGCAGGCGACTTCTAAACTGGTGTCCATAC	400	951	CAGTGCCTTCAGCCGCTACCCCGACCCATGAAAGCAGCAGACTTCTTCAA	1000
351	AGGGGGATGGTCTCTGGGAAAGCAGGCGACTTCTAAACTGGTGTCCATAC	400	951	CAGTGCCTTCAGCCGCTACCCCGACCCATGAAAGCAGCAGACTTCTTCAA	1000
401	TGCATGTGTCTTGGTGGGCTGAGGCTCAATATCAATTTCCCAACTCAG	450	1001	GTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAG 1028	
401	TGCATGTGTCTTGGTGGGCTGAGGCTCAATATCAATTTCCCAACTCAG	450	1001	GTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAG 1028	
451	GACCCAGCCAGGCCCCCTTAGGGTGAAGTTCCGTTCTGAGCTCCATCA	500			
451	GACCCAGCCAGGCCCCCTTAGGGTGAAGTTCCGTTCTGAGCTCCATCA	500			
501	TGTTGGTGGGAGTGGGCGAAGCTCAGGCTTTTCTCTAAGTTTCAAT	550			
501	TGTTGGTGGGAGTGGGCGAAGCTCAGGCTTTTCTCTAAGTTTCAAT	550			
551	TCTCCTCTGGAAAGGGCGGAGCCAGCACTATTTAAAGAGTCTGAGCCCT	600			
551	TCTCCTCTGGAAAGGGCGGAGCCAGCACTATTTAAAGAGTCTGAGCCCT	600			

**Fig. 22:** Secuenciación del vector de expresión reportero pMx2/eGFP. Alineación de la secuencia teórica y la secuencia de trabajo empleando el *software* EMBOSS Needle. Ambas secuencias coincidieron confirmando que no hubo mutaciones en el clonado, y que el mismo se efectuó correctamente.

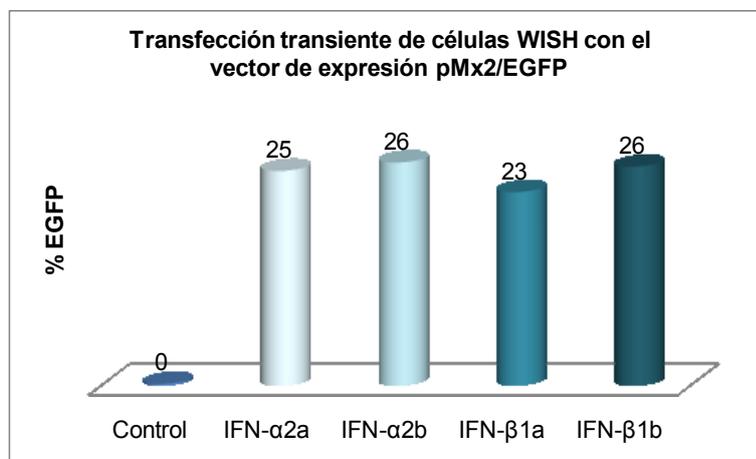
## 2. Transfección transitoria de células eucariotas para el análisis del funcionamiento del vector de expresión generado

Cuando las células de mamífero son transfectadas, las mismas incorporan la secuencia de ADN codificante para la proteína en estudio, la expresan transitoriamente durante algunos días o semanas y, eventualmente, ese ADN se pierde en la población debido a la división celular o bien es degradado por nucleasas celulares. Sólo en una mínima proporción de las células transfectadas, el ADN adicionado se incorpora al genoma celular.

Las ventajas que presenta la transfección transitoria es que se trata de un método rápido para el estudio de expresión de genes foráneos en células de mamíferos evitando la influencia del sitio de integración en la expresión, permitiendo la comparación de diferentes vectores y contribuyendo a confirmar la funcionalidad de un plásmido antes de emplear el mismo para obtener una línea celular establemente transfectada. No obstante, la ventaja que presentan las transfecciones estables es que brindan líneas celulares recombinantes permanentes.

Por otra parte, una vez que se selecciona y construye el plásmido de expresión, es necesario evaluar bajo qué condiciones se obtienen las mejores eficiencias de transfección. Cada línea celular establecida cuenta con una transfectabilidad particular; motivo por el cual, deben optimizarse variables tales como masa de ADN y relación de ADN:lípidos catiónicos a fin de obtener la mayor eficiencia de transfección con el vector de expresión generado.

Se realizó una transfección transitoria sobre células WISH utilizando el vector recombinante pMx2/EGFP con el objetivo de comprobar su integridad y funcionamiento, pretendiendo evaluar la activación del promotor Mx2 por los IFNs, y como consecuencia, la expresión del reportero. Para ello, se siguió el protocolo descrito en la sección 11.1, utilizando una relación de lípidos catiónicos (Lipofectamine):ADN 2:1, y empleando una masa de ADN de 1  $\mu$ g. Luego de 24 h de transfección, se indujo la expresión del promotor Mx2 incubando las células transfectadas con los IFNs-I: IFN- $\alpha$ 2a, IFN- $\alpha$ 2b, IFN- $\beta$ 1a e IFN- $\beta$ 1b. Se realizaron los controles de transfección correspondientes (células transfectadas con el vector recombinante, pero sin inducción con IFNs-I) y luego de 24 h se analizaron los porcentajes de células EGFP positivas mediante citometría de flujo.



**Fig. 23:** Evaluación de la funcionalidad del vector pMx2/EGFP mediante transfección transiente y posterior inducción de las células transfectadas con IFNs-I.

Las células WISH transfectadas con el plásmido pMx2/EGFP respondieron a la inducción con todos los IFNs-I, exhibiendo porcentajes de células EGFP positivas superiores al 20% (Fig. 23). De esta forma, pudo comprobarse la integridad y funcionalidad del vector recombinante generado.

### **3. Generación de líneas celulares reporteras que expresen en forma estable la construcción Mx2/EGFP**

El DNA foráneo ingresa a las células de mamíferos de un dado cultivo en una pequeña proporción y se incorpora establemente en una fracción muy reducida de las mismas. En casos particulares, como lo es la transformación con un oncogén, las células transfectadas establemente pueden ser identificadas dado que expresan un fenotipo diferente. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la identificación de líneas celulares que expresen el gen transfectado se consigue mediante la introducción dentro de la misma célula de un segundo gen que contiene un marcador de selección. Comúnmente, éste es un gen de resistencia a un antibiótico u otra droga. El gen marcador de selección y el gen de interés son introducidos simultáneamente en una célula determinada, razón por la cual es posible identificar y seleccionar, las células transfectadas con el gen de interés (Sambrook y col., 1989). De esta manera se consigue generar líneas celulares estables. En nuestro caso particular, el vector de expresión contiene el gen de resistencia al antibiótico neomicina, comercialmente conocido como GENETICIN® o G-418 sulfato. Este antibiótico actúa mediante la unión a los ribosomas, impidiendo la síntesis de proteínas en células eucariotas y procariotas.

Basándonos en los resultados obtenidos en el ensayo de transfección transiente, se generaron cuatro líneas celulares reporteras mediante transfección estable. Las líneas celulares humanas WISH, A549, HeLa y HEp2 se transfectaron con el plásmido pMx2/EGFP mediante lipofección, utilizando una relación lípido:ADN 2:1, respectivamente, siguiendo el protocolo descrito en la sección 11.2. A las 48 h post-transfección, se comenzó con la selección utilizando neomicina 400 µg activos/ml (G-418) para obtener las líneas celulares reporteras estables WISH-Mx2/EGFP, A549-Mx2/EGFP, HeLa-Mx2/EGFP y HEp2-Mx2/EGFP. Las células transfectadas fueron presionadas con el antibiótico G-418 durante aproximadamente 7 días, período de tiempo necesario para que el antibiótico utilizado produzca la muerte total del control de células sin transfectar. De esta manera, sólo aquellas células que incorporaron el gen de interés, habrán incorporado también la resistencia al antibiótico y, como consecuencia, serán capaces de resistir el tratamiento con el mismo, el cual es letal para las células sin transfectar.

Como se indicó previamente, el método de transfección utilizado fue lipofección. Los lípidos catiónicos utilizados forman vesículas artificiales que encapsulan el ADN y actúan como vehículos para introducir el ADN foráneo en la célula. Estas micelas se forman por la diferencia de cargas entre el ADN, cuya carga es negativa, y los lípidos catiónicos, cargados positivamente. Esta metodología es sumamente sencilla y permite alcanzar altos rendimientos de transfectabilidad sobre numerosos tipos de líneas celulares (Felgner y Holm., 1989; Maurer, 1989). Es necesario mencionar, que en esta instancia de la tesis, con el objetivo de tener una amplia variedad de líneas celulares reporteras provenientes de distintos linajes celulares, para posteriormente estudiar el comportamiento de cada una de ellas frente al estímulo con los IFNs-I, también se intentaron generar otras líneas celulares reporteras derivadas de células CaCo2 (adenocarcinoma colon-rectal humano), MCF7 (adenocarcinoma de glándula mamaria humana), HEL 92.1.7 (eritroblastos de médula ósea humana) y MDBK (células de riñón bovino). Sin embargo, y a pesar de reiterados intentos, no se lograron obtener células reporteras estables con estas otras líneas.

#### **4. Evaluación mediante citometría de flujo de las líneas celulares humanas reporteras generadas**

El sistema de gen reportero, objetivo de la presente tesis, requiere del empleo de citometría de flujo para la lectura final del mismo. Los ensayos basados en citometría de flujo constituyen herramientas importantes ya que contribuyen al proceso de desarrollo o descubrimiento de una molécula determinada. Los mismos involucran desde el descubrimiento y caracterización del *target* hasta la evaluación de la respuesta en tratamientos clínicos (O'Hara y col., 2011). La ventaja del uso de métodos que emplean citometría de flujo radica en la capacidad de realizar análisis multiparamétricos, permitiendo la detección simultánea de distintas características de la célula. En efecto, la validez del *screening* de drogas empleando diferentes ensayos uniparamétricos para demostrar un efecto ha sido cuestionado (Nolan, 2007). Solamente cuando varios parámetros son simultáneamente medidos a nivel de una única célula, se puede obtener una idea de las interacciones a nivel sub-celular.

En su trabajo de 1996, Canosi y colaboradores aseguran que un verdadero y confiable sistema reportero debe construirse empleando líneas celulares que expresen los receptores específicos para la proteína/citoquina que quiere detectarse, y a su vez, producir una proteína reportera que sea fácilmente detectable y no sea producida por la misma célula.

Todas las líneas celulares humanas empleadas para generar el sistema reportero, presentan los receptores específicos para las moléculas de IFNs-I humanos en su superficie, uno de los motivos por los cuales fueron seleccionadas. Por su parte, todas ellas fueron transfectadas con el plásmido pMx2/EGFP de forma estable y seleccionadas con G-418. Por lo tanto, han incorporado en su genoma la construcción génica Mx2/EGFP. Al incubar las células reporteras con muestras que contienen hIFNs-I, la citoquina se une a su receptor específico y se activa una cascada de fosforilaciones/activaciones dentro de la célula, que concluyen con la activación del promotor Mx2 en el núcleo celular. Como consecuencia, se activa la expresión de la EGFP, la cual puede ser detectada mediante microscopía de fluorescencia o citometría de flujo. Una vez generadas las líneas celulares humanas reporteras estables WISH-Mx2/EGFP, A549-Mx2/EGFP, HeLa-Mx2/EGFP y HEp2-Mx2/EGFP se evaluó su capacidad de respuesta en presencia de los IFNs-I, mediante la inducción del promotor Mx2. Para ello se emplearon las formas recombinantes de los hIFNs: IFN- $\alpha$ 2a, IFN- $\alpha$ 2b, IFN- $\beta$ 1a y IFN- $\beta$ 1b. Posteriormente, se evaluó el porcentaje de células EGFP positivas mediante citometría de flujo. Además, se corroboró la respuesta de las líneas generadas en presencia de las moléculas de rhIFN- $\alpha$ 2a y rhIFN- $\beta$ 1a mediante microscopía de fluorescencia (Fig. 24).

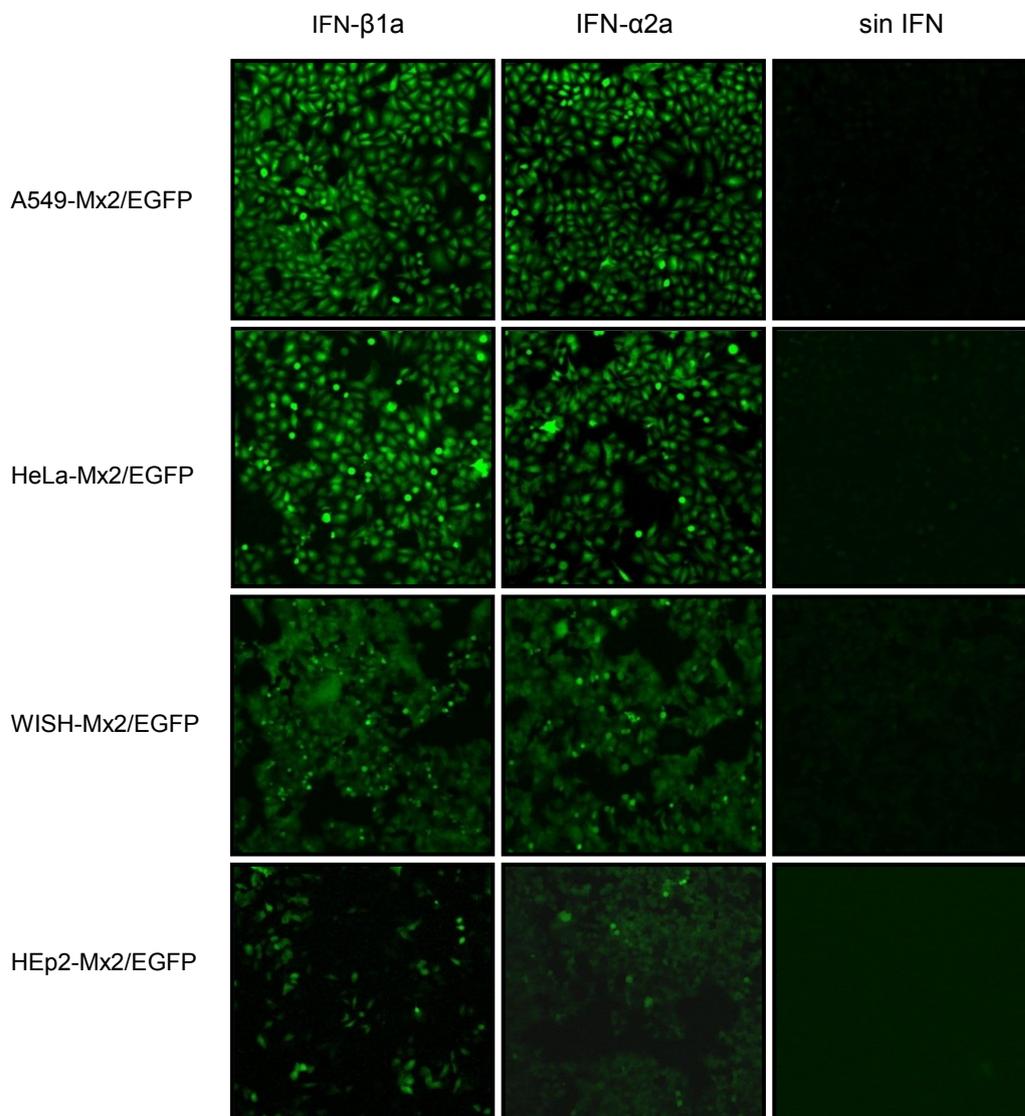
Luego de analizar nuestros sistemas reporteros podemos concluir que todas las líneas reporteras humanas generadas fueron capaces de inducir la expresión de EGFP como resultado de la activación del promotor Mx2 tras el estímulo con los IFNs-I.

En la Fig. 24 se visualizan las imágenes capturadas mediante microscopía de fluorescencia, donde se observa claramente que todas las líneas reporteras expresaron la EGFP al ser tratadas con ambos IFNs. Además, ninguna de ellas evidenció células verdes positivas en ausencia de IFN, lo que demuestra que estas líneas celulares reporteras no tienen una expresión basal del marcador reportero o la misma es tan reducida que no alcanza a evidenciarse a través de esta herramienta de análisis. Por su parte, se observó que la respuesta que presentó cada línea celular a un dado estímulo con IFN fue diferente, lo cual está indicando una distinta sensibilidad a las citoquinas de interés, por parte de las líneas celulares analizadas. Esto puede atribuirse, por un lado, a la interacción de la citoquina con sus receptores en la superficie celular, y por otro lado, también puede deberse a la cantidad de transgen incorporado por cada línea celular luego de la transfección estable con el plásmido pMx2/EGFP, y el sitio donde el mismo se haya integrado, permitiendo una expresión más o menos intensa del reportero.

Mediante el empleo de microscopía de fluorescencia se observó una mayor respuesta para las líneas celulares reporteras derivadas de A549 y HeLa, mientras que

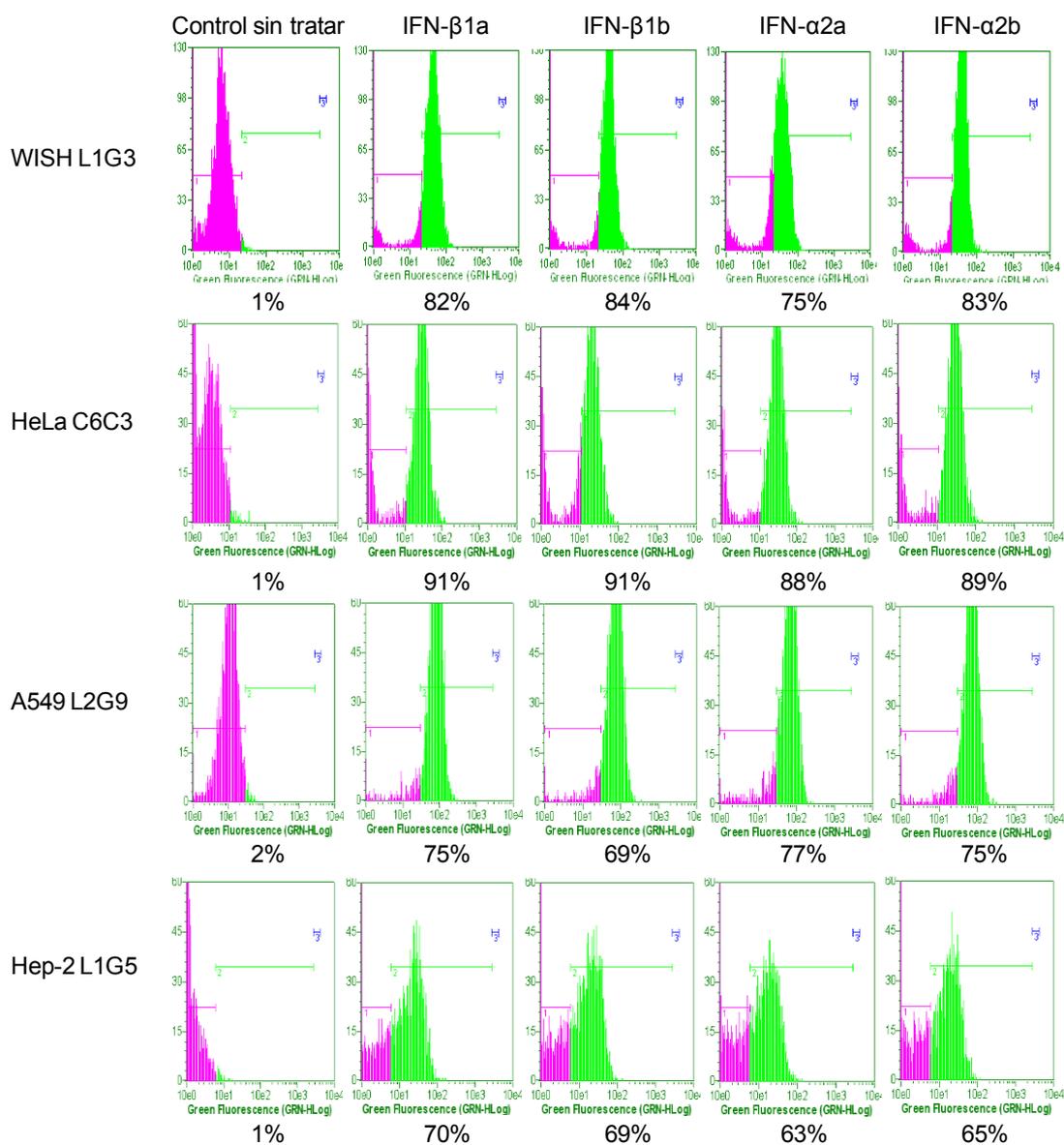
la línea HEp-2 es la que demostró menor respuesta, para una misma cantidad de IFN empleado para la inducción del promotor. Esta variación en la respuesta estaría dependiendo de la cantidad de células que expresan la proteína reportera que, a su vez, dependerá de la eficiencia lograda durante los eventos de transfección.

Al transfectar cada línea celular, el transgen puede integrarse en diferentes zonas del genoma celular. Como consecuencia, cada línea reportera generada está conformada por distintos clones celulares, cada uno de los cuales presenta características particulares. Esto conlleva a que las distintas líneas transfectadas pueden presentar diferencias en el nivel de crecimiento, expresión y calidad del producto. El objetivo de nuestro trabajo consiste en disponer de una estirpe celular que descienda de una única célula, es decir, que todas las células sean genéticamente idénticas.



**Fig. 24:** Evaluación mediante microscopía de fluorescencia de la acción de los IFNs-I sobre la capacidad de respuesta de las nuevas líneas celulares reporteras.

Es por ello que una vez garantizada la funcionalidad de las líneas reporteras desarrolladas, las mismas fueron clonadas utilizando la técnica de dilución límite (Whitlock y Müller-Sieburg, 1990). La selección de un crecimiento monoclonal se realizó mediante observación microscópica con el fin de evidenciar el crecimiento de una única colonia por cada pozo. Los clones identificados fueron posteriormente estimulados con IFN. Seguidamente, se analizó mediante citometría de flujo el porcentaje de células verdes positivas obtenidas con cada clon. Aquellos clones que mostraron mejores respuestas a los distintos IFNs-I, en términos de detección y sensibilidad, fueron amplificados gradualmente y luego crioconservados en termos con nitrógeno líquido, generando un banco maestro y otro, de trabajo.



**Fig.25:** Respuesta de los clones derivados de las líneas celulares humanas reporteras Mx2/EGFP, a los IFNs-I: IFN-β1a, IFN-β1b, IFN-α2a, IFN-α2b.

Se muestran los histogramas obtenidos por citometría de flujo para los distintos IFNs-I analizados. En todos los casos, el control de células sin tratar no mostró expresión de eGFP. Se colectaron 5.000 eventos para cada muestra.

Los clones seleccionados se denominaron L1G3, L2G9, C6C3 y L1G5, correspondientes a las líneas WISH-Mx2/EGFP, A549-Mx2/EGFP, HeLa-Mx2/EGFP y HEP2-Mx2/EGFP, respectivamente. Dichos clones mostraron respuestas de células productoras de la proteína reportera EGFP entre un 63% y 92%, dependiendo del tipo celular y el IFN evaluado (Fig. 25).

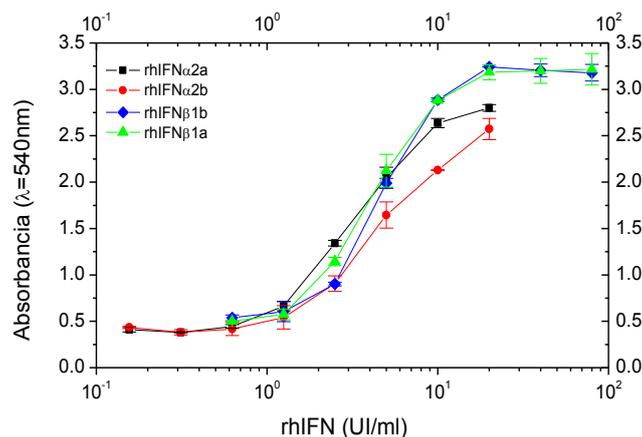
## 5. Desarrollo de un nuevo ensayo de gen reportero para cuantificar la potencia de los rhIFNs-I

Los IFNs-I son comúnmente cuantificados mediante un bioensayo basado en la capacidad de dichas citoquinas para inducir un estado antiviral en las células *target* (Familleti y col., 1981). El mismo se basa, fundamentalmente, en la cuantificación de la actividad inhibitoria de dicha molécula en los procesos de replicación y propagación viral. Sin embargo, los ensayos antivirales están sujetos a importantes variaciones (Giard y Fleischaker, 1984) y al empleo de virus, el cual debe ser periódicamente titulado para garantizar una buena infectividad. Otro de los ensayos de rutina para determinar la actividad de los IFNs-I es un ensayo basado en su actividad antiproliferativa (Prummer y col., 1994). Todos estos métodos son informativos y cuantitativos, pero resultan tediosos y lentos para el monitoreo de diferentes compuestos en forma simultánea. Además, presentan grandes variaciones intra- e inter-ensayos y rangos de respuesta lineal muy acotados.

Una alternativa a estos ensayos es el empleo de ensayos con genes reporteros (EGR), los cuales resultan altamente específicos y sensibles. Los ensayos de actividad antiviral (AVA), recomendados por la Farmacopea para la determinación de la potencia de los IFNs humanos, emplean dos tipos de líneas celulares diferentes, según la potencia del IFN a cuantificar. Esto implica el empleo de la línea celular WISH para cuantificar la actividad biológica de los IFNs- $\beta$ , conjuntamente con el virus VSV y la sugerencia de emplear la combinación de la línea celular MDBK / virus VSV para analizar a los IFNs- $\alpha$ . Sin embargo, luego de numerosos estudios se ha determinado que aunque los distintos IFNs-I inducen múltiples efectos celulares, ellos actúan a través de la unión a un mismo sistema receptor denominado IFNAR, presente en la superficie celular (Bekisz y col., 2004). Si bien es cierto que la interacción con el receptor común depende del tipo de IFN  $\alpha/\beta$ , ambos se unen al mismo receptor y desencadenan su respuesta en la célula *target*. Basándonos en estos conocimientos, y con el objetivo de hacer más sencillo el método de cuantificación de la potencia de los IFNs tanto  $\alpha$  como  $\beta$ , decidimos generar una única línea reportera capaz de cuantificar la actividad

biológica de ambos IFNs. Para ello, se realizó una prueba previa, donde la actividad antiviral de ambos subtipos de IFN fue evaluada mediante su efecto protector sobre células WISH infectadas con el virus VSV (Fig. 26), siguiendo las recomendaciones de la Farmacopea Europea (2009).

En la Fig. 26 se observa que todos los IFNs ensayados exhibieron capacidad para interactuar con su receptor específico en una misma línea celular humana, lo cual se evidencia a través de las curvas dosis-respuesta resultantes luego de medir la actividad antiviral generada por cada subtipo de IFN- $\alpha$ 2a, IFN- $\alpha$ 2b, IFN- $\beta$ 1a e IFN- $\beta$ 1b con la línea WISH. Sin embargo, se observa una respuesta diferencial entre ambos subtipos de IFNs en términos de límite de detección, sensibilidad y respuesta máxima alcanzada. No obstante, tales subtipos de IFNs-I son cuantificables empleando una misma línea celular.



**Fig. 26:** Curvas dosis-respuesta para los IFNs  $\alpha$ 2a (■),  $\alpha$ 2b (●),  $\beta$ 1a (▲) y  $\beta$ 1b (◆) obtenidas en el AVA con la línea celular WISH.

En eje de ordenadas se graficó la lectura espectrofotométrica medida a  $\lambda = 540$  nm del ensayo AVA en función de la potencia de los diferentes hIFNs (eje de abscisas).

Basándonos, por un lado, en las desventajas previamente mencionadas de los ensayos habitualmente utilizados para determinar la potencia de los IFNs-I y, por otro lado, en los resultados exitosos obtenidos luego de la generación y evaluación de la respuesta a los IFNs-I de las nuevas líneas celulares reporteras, se continuó con el desarrollo de un nuevo ensayo de gen reportero.

Este bioensayo se basó en el empleo de las líneas celulares humanas reporteras de la actividad de los IFNs-I, previamente desarrolladas. En el mismo, el parámetro de lectura es la emisión de fluorescencia evaluada mediante citometría de flujo. Para

nuestro caso particular, esta herramienta nos permite determinar y cuantificar la cantidad de células EGFP positivas luego de la activación del promotor Mx2 con IFNs-I, correlacionando el porcentaje de células EGFP positivas con la concentración de IFN presente en la muestra a analizar. Este sistema presenta numerosas ventajas al compararlo con los ensayos AVA e incluso con otros sistemas de genes reporteros: se independiza del empleo de virus, presenta mejor rango de respuesta lineal (obteniéndose mayor cantidad de puntos correspondientes a las diluciones de la citoquina dentro de la zona de linealidad de la curva dosis-respuesta) y una pendiente superior, así como también menor variabilidad intra-e inter-ensayos, un límite de detección y una sensibilidad superior, permitiendo cuantificar concentraciones de IFN inferiores a la concentración límite de la citoquina detectada mediante ensayo AVA.

Es importante destacar que hemos elegido como gen reportero la proteína EGFP, dado que, dentro de los sistemas reporteros más estudiados, esta proteína presenta grandes ventajas: no requiere de sustratos y es estable al calor, pH extremo y desnaturalizantes químicos (Zhang y col., 1996). En los últimos años, la proteína EGFP se ha convertido en una de las herramientas más utilizadas para investigación en biología celular y molecular, empleándose como un marcador fluorescente no invasivo para el estudio de expresión de genes, localización proteica en células vivas, como también en el estudio de interacciones proteína-proteína (Cotlet y col., 2001). La selección de las proteínas reporteras utilizadas es fundamental para el diseño de EGRs. Utilizar reporteros que sean inestables, o difíciles de cuantificar, trunca el objetivo de los mismos. Además, para cumplir con la premisa planteada de emplear el ensayo de gen reportero para dilucidar compuestos capaces de modular la respuesta de los IFNs-I, se necesita de una proteína reportera que sea fácilmente cuantificable, estable en el tiempo una vez producida y que el sistema presente un bajo límite de detección para poder sensor una respuesta diferencial entre el control y la muestra. La EGFP es una proteína reportera que cumple con todas estas condiciones, y es por ello, que la seleccionamos para el desarrollo del nuevo sistema reportero.

El EGR desarrollado en este trabajo de tesis se basó en el modelo de ensayo AVA, pero sin el empleo de virus. De esta manera, las células reporteras se incuban con las muestras a analizar y los estándares durante un período de tiempo determinado que permite evidenciar la respuesta de los IFNs-I mediante la cuantificación de la EGFP producida como consecuencia de la activación del promotor inducible específicamente por tales moléculas. Transcurrido dicho tiempo, las células son analizadas mediante citometría de flujo o, incluso, microscopía de fluorescencia. Los resultados obtenidos para las muestras son comparados con los estándares en términos de la relación porcentual de EGFP obtenido en cada caso.

## 6. Validación del ensayo de gen reportero desarrollado

Aunque no existen pautas regulatorias específicas para métodos de validación en los estadios tempranos del desarrollo de drogas, con el fin de tomar decisiones correctas en el proceso *downstream* de las mismas es esencial llevar a cabo ensayos válidos y de alta calidad para generar resultados confiables.

Un gran desafío en el descubrimiento de nuevas moléculas es el desarrollo de ensayos de *High Throughput Screening* (O'Hara y col., 2011).

Cuando un nuevo ensayo es desarrollado, con el objetivo de mejorar las condiciones del ensayo tradicional existente, el mismo debe ser validado de forma de asegurar que la respuesta obtenida mediante el nuevo protocolo sea fiable y semejante a la alcanzada con el ensayo tradicional.

La validación de un método de ensayo es un requisito primordial cuando deseamos tener resultados técnicamente válidos, confiables y exactos. La validación del método es necesaria ya que permite conocer los parámetros de desempeño del mismo y proporcionar un alto grado de confianza y seguridad tanto en el ensayo como en los resultados que se obtienen al aplicarlo. Dichas validaciones implican verificar parámetros de desempeño tales como sensibilidad, especificidad, límite de detección y reproducibilidad, entre otros.

A continuación, el nuevo EGR fue validado con respecto a su capacidad para responder a los IFNs-I, comparando los resultados obtenidos con el ensayo de actividad antiviral utilizado habitualmente para tal fin.

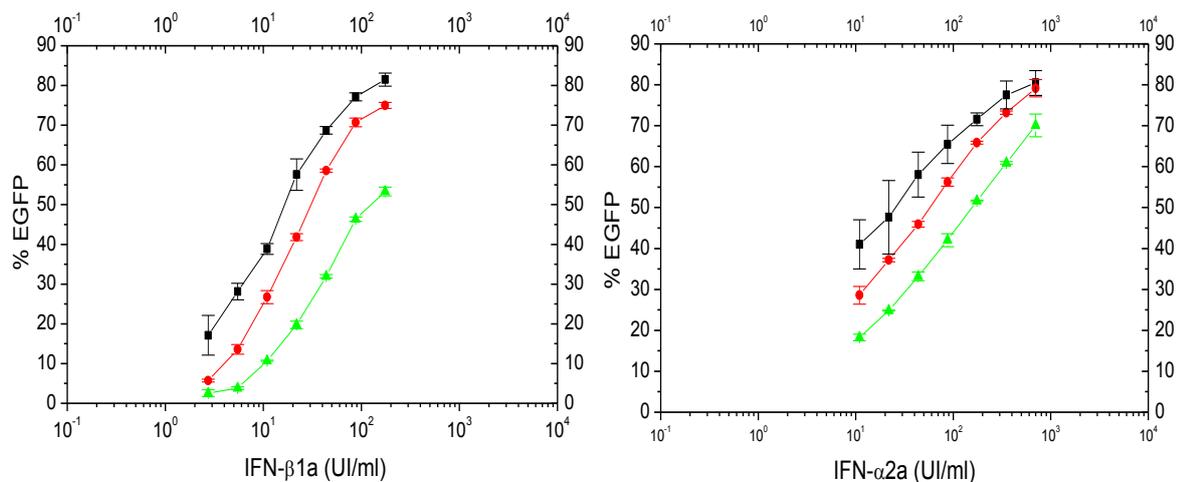
### 6.1. Optimización del EGR desarrollado

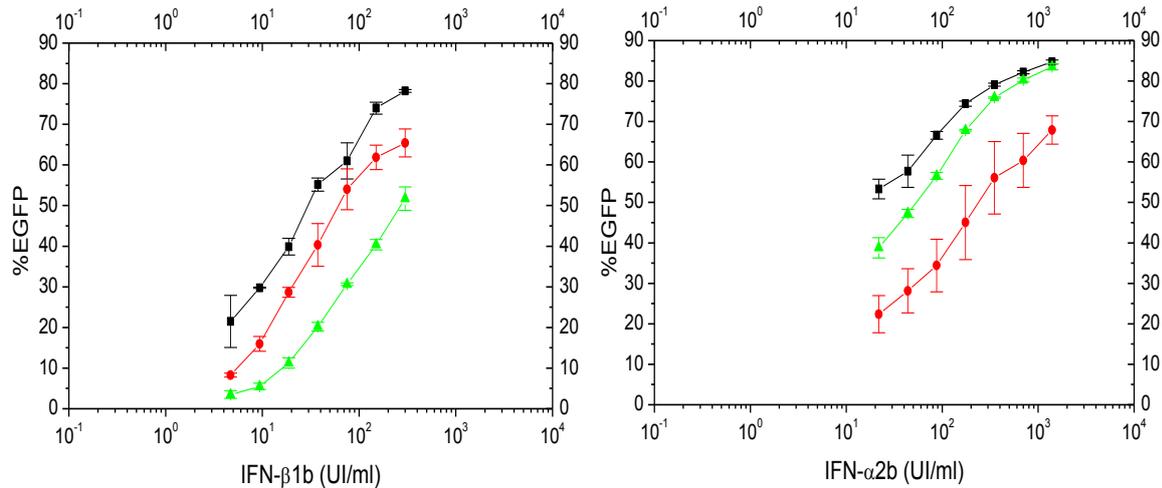
En la validación del ensayo se contempló la optimización de los distintos parámetros críticos del nuevo ensayo. El propósito de la optimización es encontrar o identificar la mejor resolución posible, entre todas las soluciones potenciales, para un problema dado o para algún punto crítico, en términos de criterios de efectividad o desempeño.

Aspectos importantes de este nuevo ensayo, sujetos a optimización, fueron la densidad celular empleada para iniciar el ensayo reportero, así como el tiempo mínimo de incubación con la citoquina para alcanzar la máxima señal. Para evaluar el primero, se estudiaron tres densidades celulares distintas:  $3 \times 10^5$ ,  $6 \times 10^5$  y  $12 \times 10^5$  cél/ml (sembrando 0,1 ml por pozo), analizando los valores máximos de la respuesta y la pendiente de la zona de respuesta lineal obtenida en las curvas dosis-respuesta.

En la Fig. 27 pueden visualizarse las curvas obtenidas para las 3 densidades celulares estudiadas. A modo de ejemplo, se muestran las gráficas correspondientes al tratamiento de las células WISH-Mx2/EGFP con los IFN- $\alpha$ 2a, IFN- $\alpha$ 2b, IFN- $\beta$ 1a e IFN- $\beta$ 1b. Luego del análisis de las gráficas obtenidas puede deducirse que se obtuvieron mejores respuestas para la menor densidad celular evaluada:  $3 \times 10^5$  cél/ml, en todos los casos. Particularmente, se observó que para mayores densidades celulares, la expresión de EGFP disminuyó, aún cuando las células fueron incubadas con cantidades suficientes de la citoquina de interés. De esta observación, puede inferirse que en presencia de una mayor densidad celular, existiría un impedimento estérico para que la interacción entre la citoquina y su receptor específico, presente en la superficie celular, se desarrolle eficientemente. Es decir, al tener una mayor densidad de células podría ocurrir un apantallamiento de los receptores de IFNs, que impediría la interacción adecuada de la molécula con su receptor. Como consecuencia, disminuiría la activación de la vía del IFN y de igual manera del promotor específico, el cual está dirigiendo la expresión del gen reportero, obteniéndose menor expresión de EGFP.

Por otra parte, se observó que para menores densidades celulares se lograron curvas de dosis respuesta con una mayor pendiente; es decir, con una mayor sensibilidad para los ensayos realizados con los IFNs- $\beta$ . Sin embargo, para todos los IFNs estudiados, la máxima respuesta, es decir, el máximo %EGFP se alcanzó con la menor densidad celular analizada.





**Fig. 27:** Optimización del EGR desarrollado: efecto de diferentes densidades celulares en la respuesta obtenida.

Se estudiaron 3 densidades celulares: (■)  $3 \times 10^5$ ; (♦)  $6 \times 10^5$ ; (▲)  $1,2 \times 10^6$  células/ml. En el eje de ordenadas se graficó el % de expresión de EGFP medida mediante citometría de flujo en función de la potencia de cada IFN evaluado (eje de abscisas).

Por otro lado, se estudió el tiempo óptimo de incubación de la citoquina para alcanzar la máxima expresión de EGFP. Se evaluaron diferentes tiempos de incubación con la molécula de interés: 8, 10, 12, 16, 20, 24, 26, 28, 30, 32 y 34 h. Si bien la señal de EGFP comenzó a evidenciarse a partir de las 8-10 h, la máxima señal de proteína reportera se alcanzó a las 24 h. Para tiempos posteriores de incubación, la expresión de EGFP se mantuvo constante y semejante al valor obtenido para las 24 h.

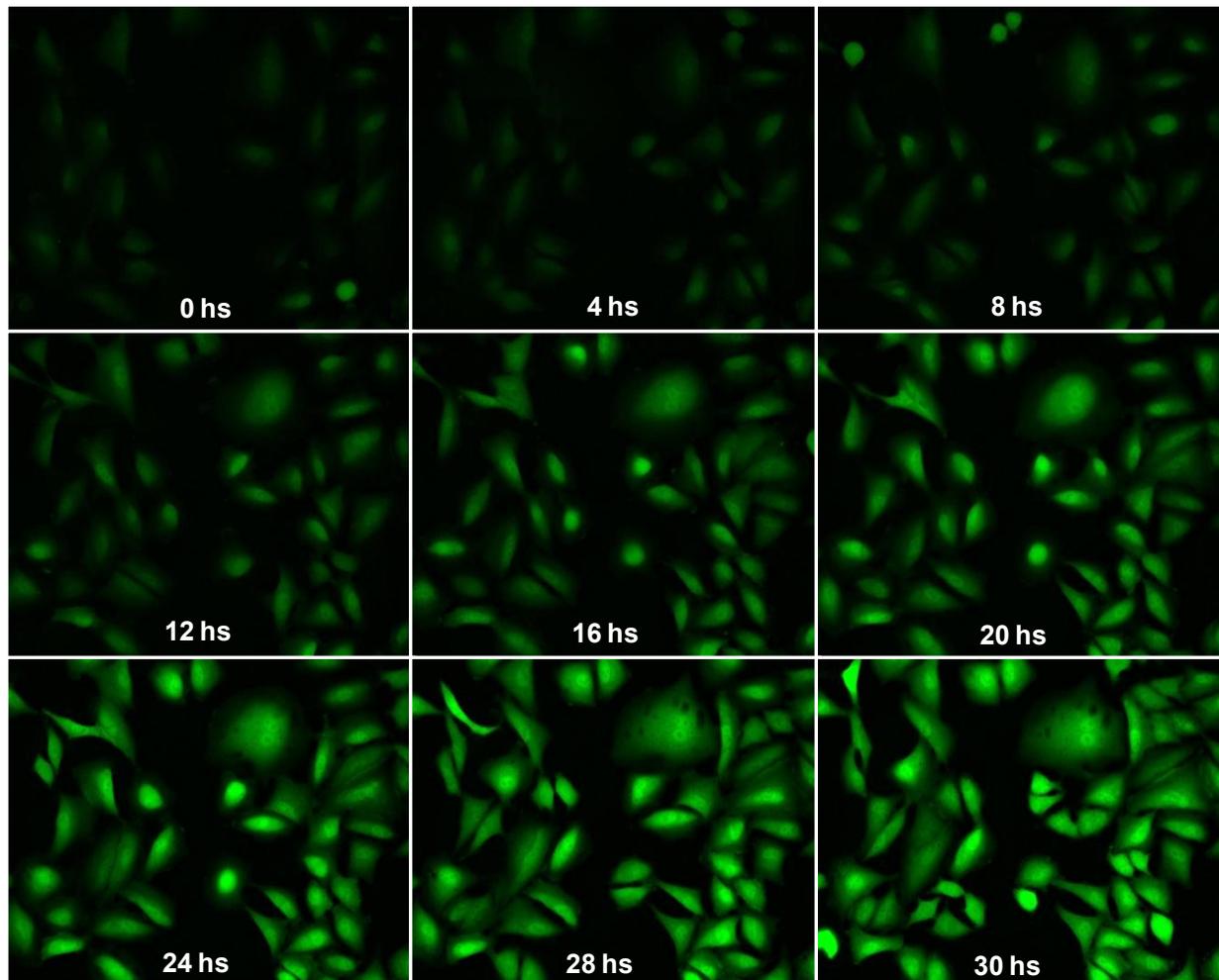
### 6.1.1. Estudio de la expresión de EGFP en células A549-Mx2/EGFP

Asimismo, se analizó mediante microscopía de fluorescencia la expresión de EGFP producida por células A549-Mx2/EGFP luego del estímulo con rhIFN- $\beta$ 1a.

Para ello, siguiendo las indicaciones de la sección 15.5 de Materiales y Métodos, las células se incubaron en presencia de IFN en una cámara acoplada al microscopio de fluorescencia, capturando imágenes del cultivo celular a diferentes tiempos pos-inducción: 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 y 30 h. De esta manera, se corroboró lo previamente observado durante la evaluación mediante citometría de flujo: luego de 8 h de inducción con rhIFN- $\beta$ 1a, la proteína reportera comenzó a detectarse alcanzando la máxima señal entre las 24 y 28 h de incubación con la citoquina (Fig. 28).

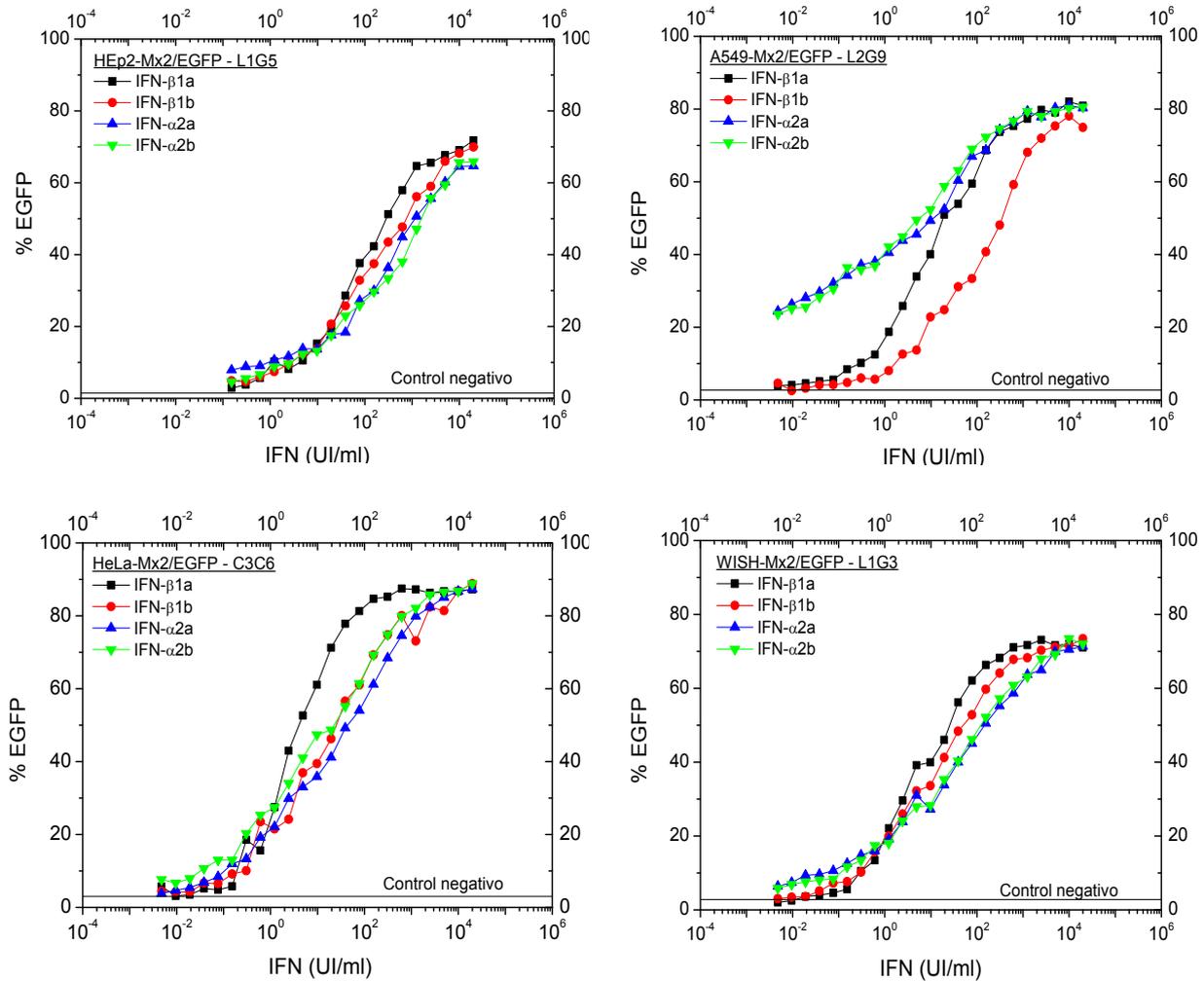
Los resultados obtenidos mediante ambas herramientas de estudio -microscopía de fluorescencia y citometría de flujo- fueron consistentes entre sí, tanto al evaluar los tiempos de expresión de la proteína reportera, luego de la inducción con la citoquina de

interés, como al estudiar el sistema reportero utilizando dos líneas distintas (WISH-Mx2/EGFP y A549-Mx2/EGFP). Esto demuestra la robustez del modelo reportero desarrollado.



**Fig. 28:** Evaluación mediante microscopía de epifluorescencia de la activación del sistema reportero A549-Mx2/EGFP en función del tiempo de exposición de las células reporteras al rhIFN- $\beta$ 1a.

Adicionalmente, a partir de la construcción de curvas dosis-respuesta se evaluaron los rangos lineales y el límite de detección de cada sistema reportero para cada uno de los IFNs en estudio (Fig. 29). En la Tabla XV se resumen los rangos lineales y el límite de detección de cada sistema reportero calculados para los distintos IFNs.



**Fig. 29:** Curvas dosis-respuesta del nuevo EGR obtenidas evaluando los distintos tipos de IFNs. En eje de ordenadas se graficó el % de expresión de EGFP medida mediante citometría de flujo en función de la potencia de cada IFN evaluado (eje de abscisas).

**Tabla XV:** Caracterización de los sistemas reporteros desarrollados.

CLON REPORTERO		C6C3	L1G5	L1G3	L2G9
<b>Rangos de respuesta lineal (UI/ml)</b>	rhIFN-α2a	0,02 – 5.000	9,76 – 10.000	0,61 – 5.000	0,19 – 625
	rhIFNα2b	0,02 – 5.000	9,76 – 10.000	0,30 – 10.000	0,19 – 625
	rhIFN-β1a	0,15 – 625	4,88 – 1.250	0,15 – 312,50	0,15 – 312,50
	rhIFN-β1b	0,15 – 625	4,88 – 5.000	0,30 – 625	0,61 – 5.000
<b>Límite de detección (UI/ml)</b>	rhIFN-α	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	rhIFN-β	0,01	<0,01	0,02	0,01

Para todas las líneas y todos los IFNs, con excepción de los IFNs-α analizados con la línea A549, se observó un límite de detección y una pendiente similar

( $18,6 \pm 2,1$  ml/UI) indicando que las moléculas activan la expresión de EGFP de una manera equivalente o relacionada.

A partir de este momento los estudios se continuaron con la línea celular WISH-Mx2/EGFP dado que se optó por una sola línea para proceder con su puesta a punto como línea celular adecuada y única para llevar a cabo ensayos de evaluación de actividad biológica de los IFNs-I ( $\alpha$  y  $\beta$ ) tendientes a reemplazar o complementar al ensayo convencional AVA.

## 6.2. Evaluación de la especificidad del promotor Mx2 por los IFNs-I

Leonart y colaboradores (1990) postularon que el promotor Mx clonado corriente arriba de un gen reportero responde de manera específica y cuantitativa a los IFNs-I, dado que el mismo es un promotor responsable de la expresión de la proteína Mx antiviral, la cual ocurre luego de una infección viral. Es decir, cuando la infección con un dado virus ocurre, los IFNs-I son secretadas por el organismo y desencadenan una cascada de señalización/fosforilación que concluye con la activación de diversos genes de respuesta a IFN, entre los que se encuentran los genes correspondientes a las proteínas Mx. La especificidad de dicho promotor fue estudiada utilizando nuestro sistema reportero WISH-Mx/EGFP, analizando curvas dosis-respuesta para cada subtipo de IFN y, además, evaluando otras citoquinas humanas no relacionadas: hIL-2, hGM-CSF, hG-CSF e hIFN- $\gamma$ . Como resultado de este análisis, sólo se observó expresión de EGFP frente al estímulo de las células reporteras con IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , no así para las diferentes citoquinas evaluadas, ni siquiera aún, con una molécula con mayor relación con los IFNs-I como lo es el IFN- $\gamma$ . Se confirmó, de esta forma, la especificidad del promotor Mx por los IFNs-I (Tabla XVI).

**Tabla XVI:** Evaluación de la especificidad del promotor Mx2

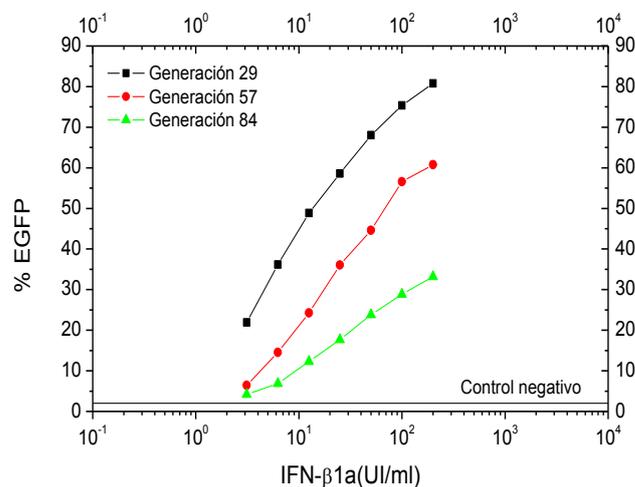
Citoquina	EGFP (%)
IFN- $\alpha$ 2a	32
IFN- $\alpha$ 2b	34
IFN- $\beta$ 1a	53
IFN- $\beta$ 1b	18
IFN- $\gamma$	4
IL-2	2
GM-CSF	3
G-CSF	4
Control negativo	3

### 6.3. Evaluación de la estabilidad del clon WISH-Mx2/EGFP L1G3

Continuando con la caracterización del sistema reportero desarrollado, se determinó la estabilidad del clon reportero L1G3, con el objeto de identificar el número de generaciones celulares, a partir del cual se considera que el clon comienza a manifestar un comportamiento diferente. Luego de numerosas generaciones celulares, puede ocurrir que las células modifiquen su carga genética, por mutaciones espontáneas afectando o disminuyendo la respuesta de las células frente al agregado de los IFNs. Es por esto que se planteó la importancia de asegurar la respuesta confiable y reproducible de las líneas reporteras a los IFNs-I.

Se evaluó la respuesta de la línea celular empleando distintas generaciones de cultivo: 29, 57 y 84.

A modo de ejemplo se analiza la respuesta para el IFN- $\beta$ 1a, utilizando el clon L1G3 de distintas generaciones. La expresión estable del plásmido se mantuvo hasta las 57 generaciones lo cual representa 2 meses de subcultivos sucesivos (se consideró estabilidad al mantenimiento de la pendiente de la curva dosis-respuesta). Transcurrido dicho período de tiempo, se comenzó a visualizar un descenso en la máxima expresión de EGFP y en la sensibilidad o pendiente de la curva mencionada (Fig. 30).



**Fig. 30:** Evaluación de la estabilidad del clon L1G3.

Se midió la máxima expresión de EGFP y la sensibilidad del ensayo utilizando el modelo de gen reportero con cultivos de (■) 29, (●) 57 y (▲) 84 generaciones. En eje de ordenadas se graficó el %EGFP medido mediante citometría de flujo en función de la potencia de IFN- $\beta$ 1a (eje de abscisas).

#### 6.4. Evaluación de la reproducibilidad del nuevo EGR. Comparación con el sistema AVA

Con el propósito de validar el ensayo reportero con respecto al modelo tradicional (AVA), indicado por la Farmacopea Europea para evaluar la potencia de los IFNs-I, se cuantificó la potencia de rhIFN- $\alpha$ 2a, rhIFN- $\alpha$ 2b, rhIFN- $\beta$ 1a y rhIFN- $\beta$ 1b, empleando ambos ensayos: AVA y EGR. Se determinaron los coeficientes de variación (CV (%)) intra- e inter-ensayo efectuando las determinaciones por triplicado y utilizando la línea reportera WISH-Mx2/EGFP.

Los coeficientes de variación son parámetros estadísticos utilizados para analizar las alteraciones propias de cada ensayo, en este caso particular, al cuantificar la actividad biológica de una misma muestra de IFN reiteradamente en un mismo ensayo (CV intra-ensayo) o, bien, en la cuantificación de una misma muestra en diferentes ocasiones (CV inter-ensayo). Para asegurar la reproducibilidad de un ensayo, dichos parámetros deben reflejar valores mínimos que es lo que se pretende en todo ensayo analítico para aseverar la reproducibilidad de la respuesta obtenida.

En la Tabla XVII se muestran los CV intra- e inter-ensayos obtenidos para cada modelo de análisis. Las determinaciones intra-ensayos para el sistema reportero demostraron un CV que varió entre 3,3 y 20,0% con un valor promedio de  $10,1 \pm 1,8\%$  (promedio de los coeficientes  $\pm$  SEM,  $n=12$ ) mientras que para el sistema AVA oscilaron entre 0 y 24,2% con un promedio de  $8,5 \pm 2,0\%$  ( $n=12$ ). Ambos sistemas demostraron, en promedio, similares variaciones intra-ensayos. Sin embargo, claramente pudo observarse que el sistema AVA presentó mayores variaciones inter-ensayo, como se ha descrito en trabajos previos (Girad y Fleischaker, 1984). De esta manera, el CV (%) inter-ensayo promedio para el sistema reportero fue de  $12,6 \pm 3,0\%$  ( $n=4$ ) mientras que para el sistema AVA fue de  $30,4 \pm 4,8\%$  ( $n=4$ ), confirmando así que este modelo es un sistema más robusto y reproducible para determinar la potencia de los rhIFNs-I.

**Tabla XVII:** Comparación de la reproducibilidad de los sistemas de cuantificación de la actividad biológica de los IFNs-I (EGR y AVA)

ENSAYO DE GEN REPORTERO				
IFN	Reproducibilidad intra – ensayo CV (%)			Reproducibilidad inter-ensayo CV (%)
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	
$\beta$ 1a	13,9	17,0	4,1	16,7
$\beta$ 1b	11,4	13,6	17,4	18,5
$\alpha$ 2a	20,0	3,3	6,4	8,3
$\alpha$ 2b	6,5	3,8	4,2	6,7

ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIVIRAL (AVA)				
IFN	Reproducibilidad intra – ensayo CV (%)			Reproducibilidad inter- ensayo CV (%)
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	
<b>β1a</b>	0	12,5	0	<b>43,0</b>
<b>β1b</b>	8,7	10,7	2,4	<b>23,8</b>
<b>α2a</b>	24,2	14,7	2,7	<b>22,2</b>
<b>α2b</b>	8,4	5,6	12,5	<b>32,7</b>

El CV (%) se calculó como  $CV = SD/P \times 100$  (donde SD, representa la desviación estándar y P, el valor promedio de las determinaciones).

Como conclusión parcial de esta tesis doctoral, podemos asegurar que con todos los análisis realizados hasta el momento pudo demostrarse fehacientemente que el nuevo EGR representa una alternativa viable para cuantificar la potencia de los distintos IFNs-I, siendo más sencillo, rápido, seguro, sensible y de menor costo que los ensayos tradicionales (AVA) utilizados para tal fin, cumpliendo de esta manera los primeros objetivos de este trabajo de tesis.

Por otro lado, el ensayo reportero desarrollado utilizando las diferentes líneas celulares resulta un modelo útil para monitorear el comportamiento de diferentes compuestos que puedan presentar efecto potenciador o inhibidor de la actividad biológica de los IFNs-I, analizando simultáneamente una gran cantidad de los mismos.

## 7. Monitoreo de bibliotecas de compuestos, potencialmente moduladores de la actividad de los IFNs-I. Análisis mediante EGR.

Continuando con los objetivos propuestos en esta tesis, y teniendo en cuenta los ensayos previos, se procedió al monitoreo de compuestos, posibles moduladores de la actividad de los IFNs-I, utilizando los sistemas reporteros desarrollados: WISH-Mx2/EGFP, HeLa-Mx2/EGFP, A549-Mx2/EGFP y HEp-2 Mx2/EGFP.

El desarrollo de una potencial droga se inicia desde el momento que surge la necesidad de identificar un compuesto que exhiba propiedades terapéuticas para un dado blanco. La identificación de compuestos en un *screening* temprano, bajo una extensa evaluación, resulta en la selección de un número reducido de compuestos líderes. Aquéllos que pasen las pruebas toxicológicas pre-clínicas progresarán hacia los *test* clínicos a fin de evaluar seguridad y eficacia de los mismos (O'Hara y col., 2011).

Como se expuso anteriormente, el IFN es una molécula central desde el punto de vista clínico, cuyo accionar debe ser modulado para evitar los inconvenientes previamente mencionados en la introducción de este trabajo. De esta manera, la

identificación de moléculas capaces de modular su actividad biológica será de gran utilidad para cumplir este propósito.

Se analizaron dos bibliotecas pertenecientes al Instituto HZI (Braunschweig, Alemania): una de ellas de 176 compuestos naturales (HZI Nat) y la otra, de 288 compuestos sintéticos (HZI Sint). Con relación a la biblioteca sintética, sólo se analizó parte de ella, debido a que está constituida por una gran cantidad de compuestos (2.500). Las mismas fueron gentilmente cedidas por el Dr. Florenz Sasse del *Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung (HZI)* (Braunschweig, Alemania) y el Dr. Dieter Kaufmann del *Institut für Organische Chemie der TU Clausthal*, (Hannover, Alemania). Es pertinente destacar que la parte del trabajo de tesis empleando los compuestos de las bibliotecas cedidas por los Dres. Sasse y Kaufmann se desarrolló en el Instituto *HZI* en Braunschweig (Alemania) durante un período total de 5 meses. Es por este motivo que sólo se analizó parte de la biblioteca sintética, dado que el tiempo para efectuar tales ensayos constituyó una de las limitantes más importantes.

Además de estas dos bibliotecas, se estudió una biblioteca de 88 compuestos sintéticos perteneciente al Grupo de Química Medicinal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República (QuiMed- FCien) (Montevideo, Uruguay). Este grupo de compuestos fue gentilmente cedido por los Dres. Mercedes González y Hugo Cerecetto del mencionado grupo de trabajo.

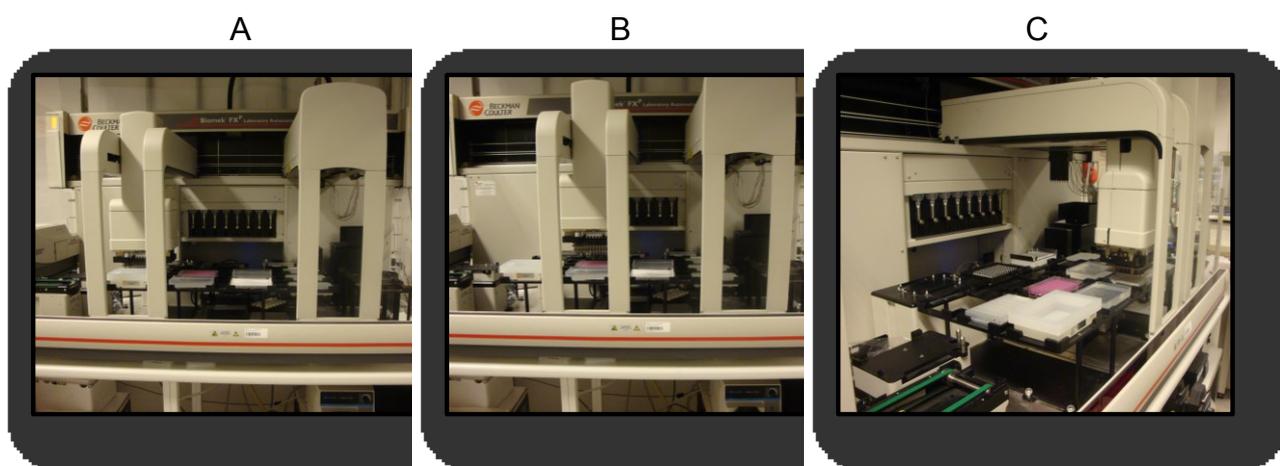
Para todos los monitoreos realizados se emplearon los cuatro clones reporteros (L1G3, L2G9, C6C3 y L1G5), provenientes de cada una de las diferentes líneas reporteras generadas, en presencia de los rhIFN- $\alpha$ 2a y rhIFN- $\beta$ 1a. Se trabajó con una potencia de citoquina constante, capaz de generar una respuesta cercana al 50% de expresión de EGFP (Tabla IX). Estas potencias resultaron diferentes dependiendo de la susceptibilidad de cada línea celular a los diferentes IFNs analizados.

El término en inglés, *High Throughput Screening* (HTS), refiere típicamente a un proceso en el cual un gran número de compuestos son analizados, con una alta eficiencia, para identificar pequeñas moléculas biológicamente activas (Frank An y Tolliday, 2010). Cuando se habla de HTS se hace referencia al análisis de entre 10.000 y 100.000 compuestos por día. De esta forma, y siguiendo la descripción que hace Szymansky y col. (2012), nuestro ensayo se ajustaría más a un modo de monitoreo llamado, en inglés, *Low Throughput Screening* (LTS), en el cual el número de compuestos analizados por día es menor e implica entre 1 y 500 compuestos; no obstante, el fundamento del ensayo es el mismo.

Habitualmente, en este tipo de ensayos, se busca miniaturizar el mismo con el objetivo de minimizar los costos (Martis y col., 2011). Sin embargo, dentro de la miniaturización es necesario tener en cuenta otros aspectos como el método de lectura

final, la densidad celular mínima que tolera el modelo reportero, brindando una respuesta confiable y la plataforma de trabajo, es decir, el tipo de soporte plástico utilizado para realizar el ensayo, el cuál determina la cantidad de compuestos que pueden ser evaluados en simultáneo. Teniendo en cuenta los puntos antes mencionados, nuestra limitante fue el método de lectura final. Es por ello que trabajamos con placas de 96 cavidades.

En el esquema de trabajo seleccionado, luego de sembrar e incubar las células durante 24 h el rhIFN fue dispensado en forma manual. Seguidamente, se adicionaron los compuestos desde las bibliotecas a evaluar utilizando un robot dispensador de líquidos diseñados para HTS (Beckman Coulter, EE.UU.) como se detalla en la Fig. 31. Este robot siembra aproximadamente 0,1  $\mu$ l de cada compuesto por pozo vía *pintool*, lo que implica el uso de microagujas de inyección, capaces de aspirar volúmenes muy pequeños de cada compuesto y depositarlos sobre la placa de *screening*. Las células en presencia de los compuestos y los rhIFNs fueron incubadas nuevamente durante 24 h a 37°C para luego ser despegadas de su condición de adherencia mediante el uso de tripsina y resuspendidas en PBS 1X para finalmente analizarlas por citometría de flujo, utilizando un citómetro de flujo LSRII de BD con un acople para HTS (Fig. 32). Este sistema permite un análisis realmente rápido, dado que esta herramienta acoplada para analizar muestras en HTS aspira un total de 1.000 eventos por muestra, tomando aproximadamente 10 segundos el análisis de cada muestra. Es decir, el análisis de una placa de 96 muestras se reduce simplemente a 16 min. En cada una de las placas analizadas se destinó la columna 12 para incluir los controles negativos y positivos, los cuales son fundamentales para realizar los cálculos estadísticos pertinentes a HTS.



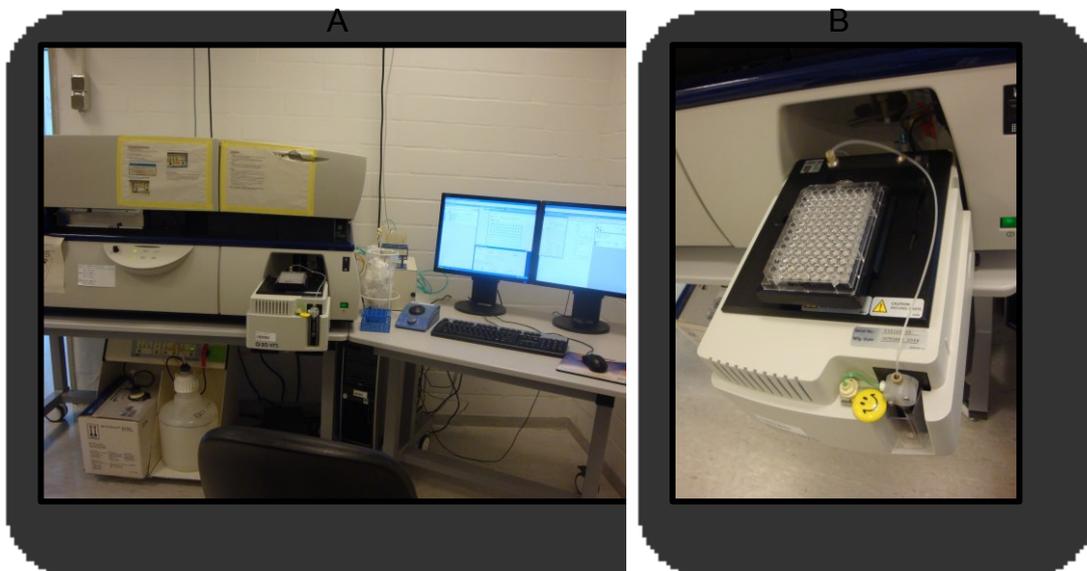
**Fig. 31:** Modo de operación del robot dispensador de líquidos (Beckmann Coulter).

- A- El robot aspira los compuestos desde la placa donde se encuentra la biblioteca de compuestos utilizando el dispositivo de múltiples microagujas.
- B- El robot dispensa los compuestos sobre la placa conteniendo las células reporteras e IFN.
- C- El robot finaliza su procedimiento de sembrado.

En este tipo de ensayos, un alto grado de precisión y sensibilidad son críticos para poder identificar compuestos activos. Así, cuanto menor sea la variación en la medida, mayor será la confianza para hallar un compuesto candidato real (Zhang y col., 1999). Es por ello que en el diseño y validación de este tipo de análisis es necesario el cumplimiento de ciertos parámetros estadísticos, como lo es el factor  $Z'$ . Este es un indicador de la calidad y aptitud del ensayo en términos de discriminación entre las muestras positivas y las negativas. Éste parámetro estadístico debe ser superior a 0,5 y lo más próximo a 1 para asegurar un ensayo de buena calidad.

En este trabajo se determinó este parámetro para cada uno de los sistemas reporteros desarrollados, en presencia de hIFN- $\alpha$ 2a e hIFN- $\beta$ 1a como se detalla en el inciso 10.2 de la introducción; y los valores obtenidos para cada caso se resumen en la Tabla XVII.

De acuerdo con lo postulado por Frank An y Tolliday (2010), un ensayo que presente un  $Z' > 0,5$  refleja un excelente ensayo. Por su parte, un ensayo con un  $0 < Z' < 0,5$  es considerado un ensayo marginal y puede ser empleado para HTS pero debe optimizarse previamente. Todos los sistemas reporteros desarrollados en este trabajo de tesis, mostraron valores  $Z'$  superiores a 0,7, lo cual asegura que los mismos son ensayos aptos para cumplir con el objetivo propuesto de identificar compuestos moduladores de la actividad de los hIFNs-I.



**Fig. 32:** Citómetro de flujo LSR II de BD (A) con un acople para HTS (B).

El acople para HTS permite una velocidad de análisis muy alta. Cuenta con una aguja que aspira 1.000 eventos y rápidamente se mueve al pozo siguiente para repetir el procedimiento hasta completar el análisis de la placa completa. De esta manera, la velocidad de análisis que alcanza es de 16 min para una placa completa de 96 cavidades.

**Tabla XVII:** Parámetro  $Z'$  obtenido con cada sistema reportero desarrollado.

Sistema reportero	$Z'$	
	<i>rhIFN- <math>\beta</math>1a</i>	<i>rhIFN- <math>\alpha</math>2a</i>
<b>HeLa C6C3</b>	0,82	0,85
<b>HEp-2 L1G5</b>	0,86	0,73
<b>A549 L2G9</b>	0,86	0,87
<b>WISH L1G3</b>	0,85	0,87

El protocolo de ensayo seguido para llevar adelante el análisis de los compuestos fue el mismo para todas las bibliotecas, tanto natural como sintéticas. En una primera instancia se realizó un análisis, donde cada compuesto fue analizado en única réplica, de forma de poder discriminar rápidamente compuestos respondedores de no respondedores, y hacer una primera selección de los compuestos candidatos. En una segunda instancia, se repitieron los monitoreos de la misma forma que se realizó previamente, para poder confirmar y aislar los compuestos verdaderamente positivos y eliminar los falsos positivos.

El procesamiento estadístico aplicado sobre cada muestra para determinar si cada uno de ellos es o no un compuesto candidato se detalló en la sección 10.2 de la introducción. Para cada sistema reportero se calcularon los límites de respuesta según:  $\mu_{C+} \pm 3 \sigma_{C+}$ ; donde  $C+$  representa el control positivo, es decir, células tratadas únicamente con el IFN correspondiente. Así, aquellas moléculas que reflejaron una respuesta del % de EGFP contemplado dentro de los límites antes mencionados fueron considerados negativos, o sin efecto sobre la actividad de los IFNs, ya que se supuso que en ese rango mostrarían el mismo comportamiento que el estándar. Por el contrario, todos aquellos compuestos que exhibieron su respuesta superando dichos límites, se consideraron compuestos candidatos.

Finalmente, del total de compuestos que mostraron efecto sobre la actividad de los hIFNs-I (compuestos respondedores), algunos fueron seleccionados para su caracterización. El criterio que se empleó para la selección de los mismos se basó en la búsqueda de compuestos respondedores que cumplan con las siguientes condiciones:

- exhiban un % EGFP por fuera de los límites  $\mu_{C+} \pm 3 \sigma_{C+}$ .
- muestren mayores diferencias del % EGFP (muestra-control positivo).
- demuestren el mismo comportamiento en ambos ensayos de *screening*.
- presenten un comportamiento semejante sobre todas las líneas celulares reporteras evaluadas, en presencia de ambos IFNs-I.

### 7.1. Monitoreo de una biblioteca de 176 compuestos naturales (HZI Nat) cedida por el *Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung (HZI)* (Braunschweig, Alemania).

Los productos naturales representan un recurso importante en la búsqueda de moléculas biológicamente activas y son un ejemplo de la diversidad molecular existente. Sin embargo, es necesario tener ciertos recaudos con este tipo de compuestos, dado que muchas veces ha sido necesario dejarlos de lado en este tipo de *screening* debido al requerimiento que los mismos presentan en cuanto a su pureza, disponibilidad, entre otros (Mishra y col., 2008). No obstante, la biblioteca de compuestos naturales (NCH1-NCH2), cedida gentilmente por el Dr. Florenz Sasse para su análisis, se encuentra resuspendida en DMSO con un alto grado de pureza, facilitando su estudio. De esta forma, se analizó la biblioteca completa de 176 compuestos naturales empleando todas las líneas Mx2/EGFP reporteras generadas, en presencia de IFN- $\alpha$ 2a e IFN- $\beta$ 1a. Para ello, se siguió el protocolo previamente descrito para el análisis de compuestos moduladores de la respuesta de los IFNs-I mediante ensayos de gen reportero (sección 16.1 de Materiales y Métodos), realizando cada *screening* en dos instancias diferentes.

Los datos obtenidos en cada *screening* fueron analizados como se explica a continuación.

Se calcularon los valores  $\mu_{C+} \pm 3 \sigma_{C+}$  (valor promedio del control positivo  $\pm 3$  desviaciones estándar del mismo), utilizando los valores del porcentaje de EGFP registrados para los cuadruplicados de los controles positivos del ensayo, que como se explicó previamente, corresponde a cada una de las líneas reporteras tratadas con cada uno de los IFNs en estudio, en una potencia de citoquina capaz de desarrollar una respuesta de EGFP próxima al 50%. Estos valores se utilizaron para poder determinar los límites de cada ensayo reportero, permitiendo discriminar entre aquellos compuestos que presentan algún efecto sobre la actividad del IFN de los que simplemente revelaron un comportamiento similar al del control positivo, y por lo tanto, son considerados compuestos sin efecto sobre la actividad de los IFNs. Adicionalmente, se calculó la diferencia de EGFP y de intensidad media de fluorescencia entre el control positivo y cada una de las muestras (células tratadas con IFN + compuesto); de forma de discriminar aquellos compuestos que presentan un efecto más intenso sobre la actividad de los rhIFNs.

En las Tablas XVIII y XIX, se resumen los resultados obtenidos para cada uno de los *screening* realizados sobre la biblioteca HZI Nat.

**Tabla XVIII:** Resultados del 1º HTS de la biblioteca HZI Nat

<i>Línea celular reportera</i>	<i>HeLa</i>	<i>HEp-2</i>	<i>A549</i>	<i>WISH</i>	<i>HeLa</i>	<i>HEp-2</i>	<i>A549</i>	<i>WISH</i>
	<b>IFN-β1a (UI/ml)</b>				<b>IFN-α2a (UI/ml)</b>			
<b><i>rhIFN</i></b>	1,5	50	20	10	2,5	250	2,5	40
<b><i>Compuestos totales</i></b>	176	176	176	176	176	176	176	176
<b><i>Compuestos potenciadores</i></b>	12	17	43	10	30	65	57	12
<b><i>Compuestos inhibidores</i></b>	38	25	27	45	32	21	33	83
<b><i>Compuestos neutros</i></b>	126	134	106	121	114	90	86	81

**Tabla XIX:** Resultados del 2º HTS de la biblioteca HZI Nat

<i>Línea celular reportera</i>	<i>HeLa</i>	<i>HEp-2</i>	<i>A549</i>	<i>WISH</i>	<i>HeLa</i>	<i>HEp-2</i>	<i>A549</i>	<i>WISH</i>
	<b>IFN-β1a (UI/ml)</b>				<b>IFN-α2a (UI/ml)</b>			
<b><i>rhIFN</i></b>	1,5	50	20	10	2,5	250	2,5	40
<b><i>Compuestos totales</i></b>	176	176	176	176	176	176	176	176
<b><i>Compuestos potenciadores</i></b>	22	34	51	0	20	34	16	30
<b><i>Compuestos inhibidores</i></b>	42	26	22	108	55	11	45	71
<b><i>Compuestos neutros</i></b>	112	116	103	68	101	131	115	75

Como se observa en las tablas presentadas arriba, las respuestas obtenidas con cada línea reportera así como para cada IFN estudiado fueron diferentes si nos centramos en el estudio de cada compuesto durante los *screening* realizados. Por un lado, las diferencias obtenidas entre ambos monitoreos, para una misma línea e IFN estudiado, manifiestan compuestos cuyo comportamiento no es congruente y, por lo tanto, puede tratarse de falsos positivos. Es por este motivo, que los mismos se descartan y no se tienen en cuenta para una selección posterior de compuestos. Por otro lado, se observan diferentes comportamientos para un mismo compuesto según la línea reportera utilizada en el *screening*. Esto refleja la susceptibilidad propia de cada célula para un determinado compuesto o grupo de compuestos. Finalmente, se han podido observar algunos casos particulares en los cuales, analizando un mismo compuesto, con una misma línea celular, el comportamiento es diferencial dependiendo del IFN utilizado para inducir las células reporteras. En este caso, hablamos de un efecto particular del compuesto sobre la citoquina en estudio.

Sin embargo, es preciso destacar que estas tablas resumen la cantidad de compuestos que exhibieron una respuesta sobre la actividad de los IFNs, comparando con la cantidad de compuestos sin efecto, sin hacer un análisis puntual sobre la

respuesta de cada compuesto sobre cada IFN estudiado con cada línea celular reportera. No obstante, ese análisis minucioso de los resultados obtenidos luego de la citometría de flujo para cada compuesto, se realizó previamente. Los datos crudos fueron procesados y dado que resulta más sencillo para comparar y comprender, los resultados finales se resumen en este tipo de tablas.

A modo de ejemplo, y para comprender este análisis detallado que se menciona arriba, se muestra parte de una tabla construida, sobre la cual se vuelcan los datos crudos obtenidos de la citometría de flujo, y con los cuales se realizan los cálculos para determinar la condición de cada compuesto estudiado (Tabla XX).

Esta tabla sólo muestra los datos procesados en el primer monitoreo para un grupo de compuestos naturales, analizados con las cuatro líneas reporteras en presencia de IFN- $\alpha$ 2a. De todas formas, el procesamiento de los datos se realizó de la misma manera para cada muestra. Como se observa en la Tabla XX, para cada compuesto hay una sección de la tabla que involucra su análisis con una de las 4 líneas reporteras. En ella se analiza: el efecto que este compuesto manifestó, es decir, si mostró un efecto inhibitorio de la potencia del IFN estudiado (-) o, si por el contrario, incrementó esa respuesta (+); también se evalúa el %EGFP (porcentaje de células verdes positivas), donde se indica por un lado, el %EGFP obtenido para cada caso (%), y por otro, la diferencia entre el %EGFP de cada muestra con respecto al control positivo, que corresponde al %EGFP promedio obtenido en aquellas células tratadas únicamente con IFN ( $M-C = \%EGFP \text{ muestra} - \%EGFP \text{ control}$ ). El valor absoluto de esta diferencia nos demuestra la magnitud del efecto que presenta el compuesto en estudio, mientras que su signo indica si se trata de un efecto potenciador (+) o inhibitorio (-). Es decir, cuanto mayor sea la diferencia obtenida, mayor será el efecto modulador del compuesto sobre la respuesta del IFN. Además, se analiza la intensidad media de fluorescencia obtenida para cada muestra (M) y nuevamente, la diferencia entre la intensidad media de la muestra y el control (M-C), lo que nos indica si el efecto observado por el compuesto incide también en la intensidad de la expresión del reportero. Finalmente, se analiza el estado de las células (cél), es decir, cómo se observan las células luego del tratamiento con el compuesto en estudio: (ok) presentan buena morfología y viabilidad o (X) su morfología no es buena, o al menos la adecuada y puede inferirse toxicidad por parte del compuesto en la concentración analizada.

**Tabla XX:** Tabla modelo del análisis realizado a cada compuesto luego del *screening* para determinar su influencia sobre la respuesta del IFN.

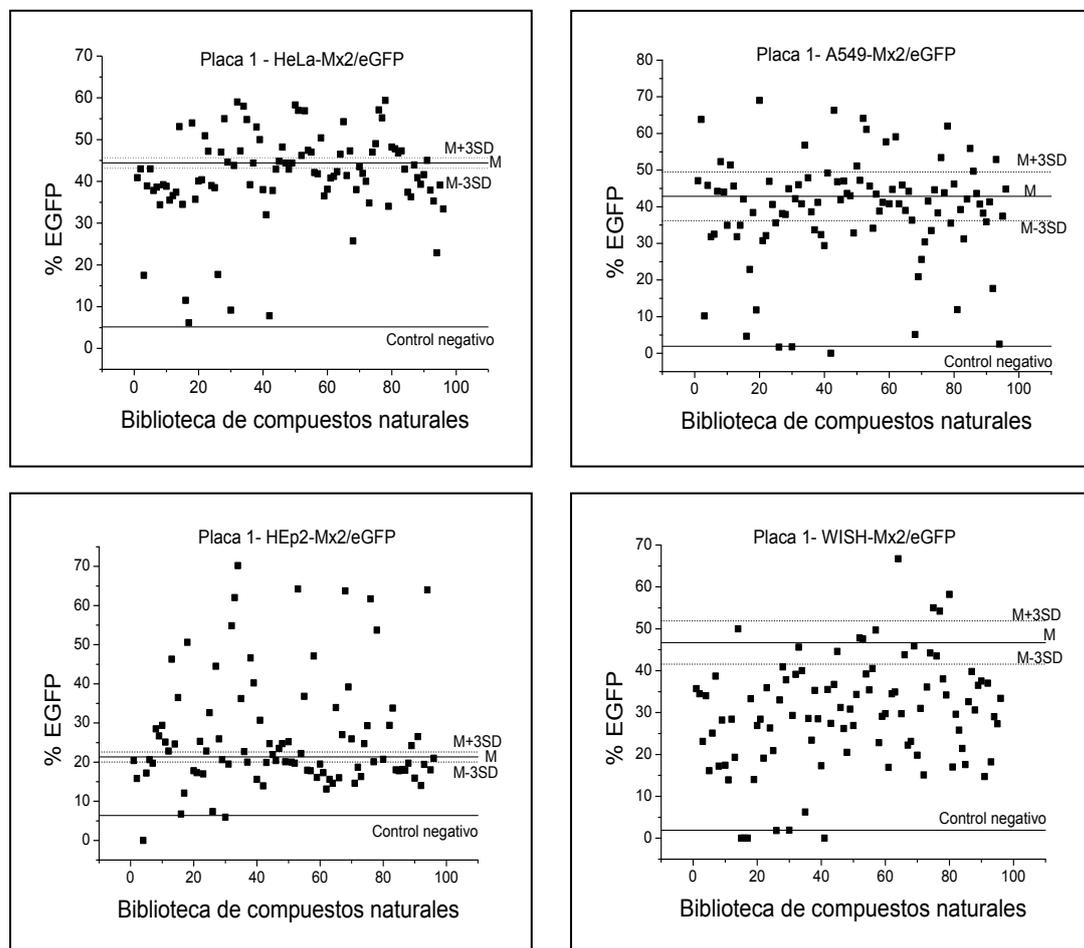
Dado que constituye un ejemplo, se muestra sólo un fragmento de la tabla, donde se analiza el monitoreo de un grupo de compuestos, empleando las 4 líneas celulares reporteras, en presencia de rhIFN- $\alpha$ 2a para el primer HTS. GFP (%): porcentaje de células EGFP positivas; (M-C): diferencia entre el valor del %EGFP o de intensidad media de fluorescencia, obtenida entre la muestra (M) y el control (C); Cél: evalúa el estado de las células; Efecto: indica si el compuesto en estudio incrementa (+) o disminuye (-) la respuesta del IFN.

**1º HTS de la biblioteca de compuestos naturales empleando las líneas reporteras Mx2/EGFP en presencia de rhIFN- $\alpha$ 2a**

Compuesto	HeLa-Mx2/EGFP + IFN $\alpha$ 2a 2,5 UI/ml						A549-Mx2/EGFP+ IFN $\alpha$ 2a 2,5 UI/ml						HEp2-Mx2/EGFP + IFN $\alpha$ 2a 250 UI/ml						WISH-Mx2/EGFP + IFN $\alpha$ 2a 40 UI/ml						
	Efecto	EGFP (%)		Media		Cel	Efecto	EGFP (%)		Media		Cel	Efecto	EGFP (%)		Media		Cel	Efecto	EGFP (%)		Media		Cel	
		%	M-C	M	M-C			%	M-C	M	M-C			%	M-C	M	M-C			%	M-C	M	M-C		
NH1 (P1)																									
A1																									
A2							+	63,8	20,94	6054	1941	X													
A3	-	17,5	-26,92	2469	-166	ok	-	10,2	-32,66	4733	620	ok	+												
A4																									
A5							-	31,8	-11,06	5832	1719	ok	-	17,2	-4,12	98,6	7,63	ok	-	16,1	-30,62	3556	-557,8	X	
A6							-	32,5	-10,36	5231	1118	ok													
A8							+	52,3	9,44	5840	1727	ok	+	28,5	7,18	89,4	-4,57	ok	-	17,2	-29,52	4130	16,2	X	
A9																									
A10							-	34,9	-7,96	5619	1506	ok													
A11							+	51,4	8,54	5950	1837	ok													
A12																									
B1							-	31,8	-11,06	5254	1141	ok	+	46,3	24,98	101	10,03	ok	-	19,3	-27,42	3997	-116,8	ok	
B2	+	53,1	8,68	3211	576	ok	-	34,9	-7,96	5626	1513	ok													
B3																									
B4	-	11,5	-32,92	2275	-360	ok	-	4,65	-38,21	6927	2814	ok	-	6,74	-14,58	92,7	1,73	ok							
B5	-	6,14	38,28	2360	-275	ok	-	22,9	-19,96	5112	999	X	-	12,14	-9,22	85,9	-5,07	X							
B6	+	54	9,58	3344	709	ok							+	50,6	29,28	127	36,03	ok	-	33,3	-13,42	4110	-3,8	X	
B7	-	35,7	-8,72	2398	-237	ok	-	11,8	-31,06	4828	715	ok	+	78,5	57,18	168	77,03	ok	-	14	-32,72	3686	-427,8	X	
B8							+	69	26,14	6756	2643	X	-	17,8	-3,52	85	-5,97	X	-	26,9	-19,82	3892	-221,8	X	
B9	-	40,4	-4,02	2897	262	ok	-	30,7	-12,16	5598	1485	ok													
B10	+	50,9	6,48	3023	388	ok	-	32,1	-10,76	5399	1286	ok	+	25,3	3,98	95,1	4,13	ok	-	19,1	-27,62	3911	-202,8	ok	
B11																									
B12																									

En la Fig. 33 se muestra parte del análisis de los compuestos, en este caso y a modo de ejemplo, parte de la biblioteca de compuestos naturales. En estas gráficas de puntos se muestran los valores de % EGFP obtenidos para cada muestra. A su vez, se calcularon para cada caso, los controles negativos correspondientes a cada ensayo y los valores del promedio de % EGFP del control positivo, para el cálculo de los valores  $\mu_{C+} \pm 3 \sigma_{C+}$ , con los cuales se determinaron los límites del ensayo para discriminar entre compuestos con efecto de los compuestos sin efecto sobre la actividad de los hIFNs-I. Luego del estudio de los casos arriba mencionados, puede concluirse que la línea

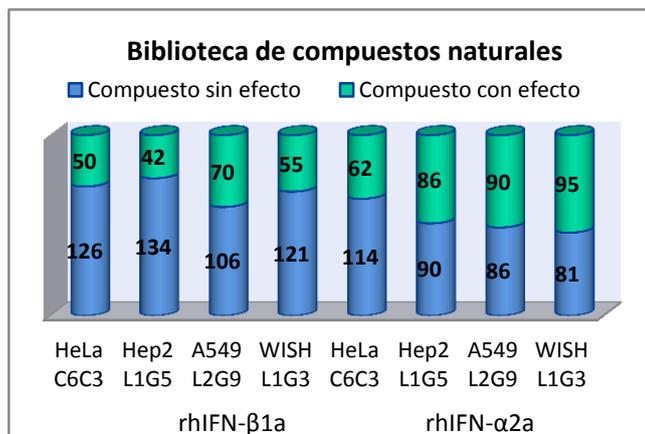
celular más susceptible a la mayoría de los compuestos, al ser inducida con ambos subtipos de hIFNs-I, es la línea celular reportera WISH-Mx2/EGFP.



**Fig. 33:** Monitoreo de compuestos de la biblioteca natural del HZI. Análisis de compuestos respondedores y no respondedores.

En el eje de ordenadas se graficó el % de EGFP en función de cada compuesto de la biblioteca mencionada en el eje de abscisas. Se indican: M: valor promedio del % EGFP de los controles positivos; M+3SD: valor promedio del %EGFP de los controles positivos + 3 desviaciones estándar; M - 3SD: valor promedio del %EGFP de los controles positivos - 3 desviaciones estándar.

Por otro lado, efectuando un análisis más generalizado de todos los monitoreos realizados, se observa una mayor proporción de compuestos respondedores, al inducir cualquiera de las líneas reporteras con IFN- $\alpha$ 2a (Fig. 34).



**Fig. 34:** Análisis de una biblioteca de 176 compuestos naturales, mediante el EGR, empleando las 4 líneas reporteras, estimuladas con rhIFN-β1a y rhIFN-α2a. Del total de compuestos estudiados, aquéllos que evidenciaron algún efecto modulador de la actividad biológica de los hIFNs-I fueron representados en color verde en las gráficas de barra; mientras que los que no arrojaron ningún resultado diferencial se representaron como la porción de color azul de la gráfica de barra.

## 7.2. Monitoreo de una biblioteca de 288 compuestos sintéticos (HZI Sint) cedida por el *Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung (HZI)* (Braunschweig, Alemania).

Las bibliotecas de compuestos sintéticos son extremadamente grandes. Dada la tecnología innovadora para generar dichas bibliotecas, sumando a los conocimientos previos que permiten la síntesis de una serie de compuestos determinados, hacen que las mismas sean realmente numerosas, incluyendo mucho más de 1.000 compuestos. En este tipo de bibliotecas, suelen encontrarse los denominados, en inglés, *clusters* de compuestos, que son grupos de compuestos con características similares; la única diferencia entre ellos puede deberse a una modificación en los grupos sustituidos de su estructura química. Es decir, al tener el conocimiento previo de las propiedades de un determinado compuesto natural, los químicos orgánicos intentan sintetizar compuestos que presenten estructuras similares y, a su vez, con el objetivo de mejorar la respuesta del mismo, lo modifican, mediante diversas sustituciones de su estructura química. De esta manera, cada compuesto natural presente en una biblioteca natural, se encuentra multiplicado en un *cluster* de compuestos sintéticos. Esto representa una ventaja operativa, ya que permite disponer de un amplio espectro de compuestos con estructuras similares a la conocida y que pueden resultar superiores en sus propiedades con respecto al compuesto de origen.

Particularmente, la mayoría de las bibliotecas sintéticas con las que cuenta el grupo de Química Orgánica Fina del HZI (Braunschweig, Alemania) contienen más de 2.500 compuestos. Los mismos se encuentran fraccionados y conservados en placas de 96 cavidades, lo que significa que cada biblioteca está constituida por aproximadamente 27 placas de 96 cavidades de compuestos a evaluar e inclusive números superiores de placas.

Si se tiene en cuenta que para nuestro protocolo de ensayo, cada una de estas placas será analizada utilizando los 4 clones reporteros, en presencia de rhIFN- $\alpha$ 2a o rhIFN- $\beta$ 1a, y esto a su vez por duplicado, podemos calcular que para evaluar cada placa de la biblioteca de compuestos se requerirá un total de 16 eventos de análisis.

$$1 \text{ Placa de compuestos a evaluar} \times (4 \text{ clones reporteros} \times 2 \text{ IFNs}) \times 2 \text{ HTS} = 16 \text{ análisis}$$

Por lo tanto, el tiempo necesario para analizar por completo la biblioteca sintética es extremadamente prolongado. Dado que el análisis de estas bibliotecas, por una cuestión de confidencialidad, se realizó durante la mencionada pasantía en Alemania, se decidió realizar el análisis de sólo una fracción de ella, evaluándose en total 288 compuestos sintéticos.

Con el fin de analizar la mayor cantidad de compuestos que presenten algún efecto sobre la actividad de los hIFNs-I, se procedió a emplear un grupo de compuestos anteriormente seleccionados mediante un *screening* previo realizado en el HZI con una línea reportera de hIFN-I que allí se disponía, la cual fue obtenida mediante la introducción de la MxLuciferasa en células HeLa.

De esta forma, se seleccionaron 3 placas de compuestos sintéticos (5, 6 y 28) que fueron analizados utilizando las cuatro líneas reporteras en presencia de ambos tipos de IFNs: rhIFNs- $\alpha$ 2a y rhIFNs- $\beta$ 1a.

Los resultados obtenidos luego de cada monitoreo de compuestos se resumen en las Tablas XXI y XXII, donde se muestra la cantidad de compuestos neutros, potenciadores e inhibidores del total de compuestos evaluados. Los gráficos de barra de la Fig. 35 resumen la cantidad de compuestos que mostraron algún efecto sobre la actividad de los rhIFNs-I, ya sea incrementando o disminuyendo su respuesta, para cada una de las líneas celulares reporteras Mx2/EGFP empleadas para el *screening*.

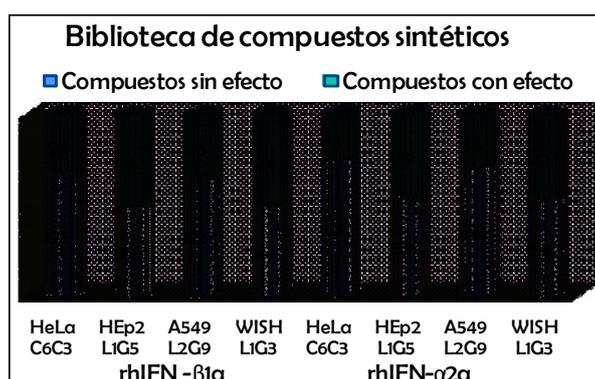
Para esta biblioteca de compuestos sintéticos, las líneas celulares más susceptibles fueron WISH y HEp-2. Obviamente, estas diferencias dependen exclusivamente de las características de los compuestos analizados, y de la similitud de los mismos dentro de una misma biblioteca de compuestos.

**Tabla XXI:** *Screening* de los compuestos sintéticos de las placas 5, 6 y 28 en presencia de rhIFN- $\alpha$ 2a, utilizando las 4 líneas reporteras Mx2/EGFP

Línea celular reportera	HeLa	HEp2	A549	WISH	HeLa	HEp2	A549	WISH	HeLa	HEp2	A549	WISH
<b>rhIFN-<math>\alpha</math>2a</b>												
<b>Placa</b>	<b>5</b>				<b>6</b>				<b>28</b>			
<b>Compuestos totales</b>	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88
<b>Compuestos potenciadores</b>	9	41	4	11	0	40	0	0	2	22	1	0
<b>Compuestos inhibidores</b>	19	1	27	33	23	9	27	42	28	16	25	47
<b>Compuestos neutros</b>	60	46	57	44	65	39	61	46	58	50	62	41

**Tabla XXII:** *Screening* de los compuestos sintéticos de las placas 5, 6 y 28 en presencia de rhIFN- $\beta$ 1a, utilizando las 4 líneas reporteras Mx2/EGFP

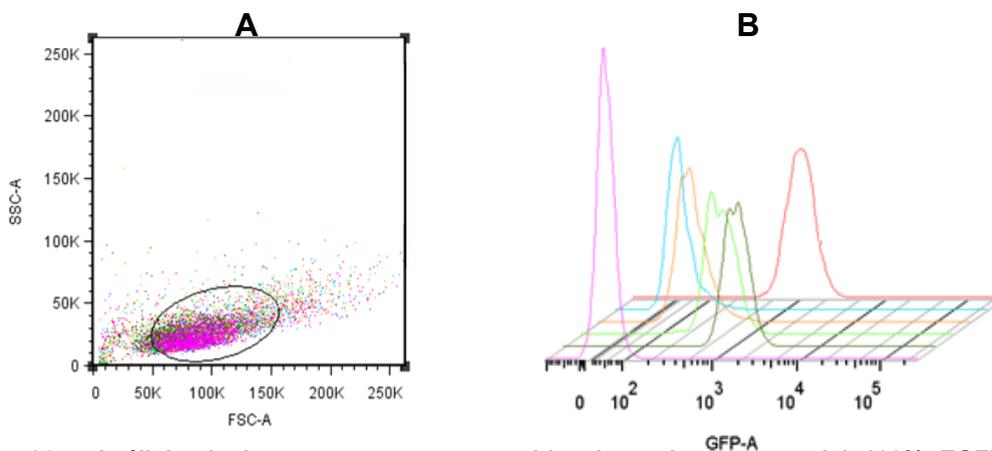
Línea celular reportera	HeLa	HEp2	A549	WISH	HeLa	HEp2	A549	WISH	HeLa	HEp2	A549	WISH
<b>rhIFN-<math>\beta</math>1a</b>												
<b>Placa</b>	<b>5</b>				<b>6</b>				<b>28</b>			
<b>Compuestos totales</b>	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88
<b>Compuestos potenciadores</b>	10	23	5	5	0	21	2	0	0	15	2	0
<b>Compuestos inhibidores</b>	22	10	28	32	31	33	25	62	30	44	34	45
<b>Compuestos neutros</b>	56	55	55	51	57	34	61	26	58	29	52	43



**Fig. 35:** Análisis de una parte de una biblioteca de compuestos sintéticos, mediante EGR, empleando las 4 líneas reporteras, estimuladas con rhIFN- $\beta$ 1a y rhIFN- $\alpha$ 2a.

Del total de compuestos estudiados, aquéllos que evidenciaron algún efecto, modulador de la actividad biológica de los hIFNs-I fueron representados en color verde en las gráficas de barra; mientras que los que no arrojaron ningún resultado diferencial se representan como la porción de color azul de la gráfica de barra.

Sorpresivamente, en estos *screening* se percibieron efectos particulares. Algunos compuestos mostraron un efecto potenciador muy marcado, en especial, al trabajar con la línea celular reportera HEp2-Mx2/EGFP. Especialmente, algunos compuestos de la placa 5 exhibieron un comportamiento potenciador de la actividad de los IFNs-I, percibido mediante el incremento del % EGFP, alcanzando un valor de 100% EGFP. También, se registró para los mismos compuestos, un incremento de la intensidad media verde fluorescente (Fig. 36 B). Ejemplos de estas moléculas fueron los compuestos denominados A11, B5, B10 y E2



**Fig. 36:** Análisis de los compuestos que evidenciaron incremento del 100% EGFP mediante citometría de flujo.

■ Control negativo - ■ Control Positivo - ■ Compuesto A11 - ■ Compuesto B5 -  
■ Compuesto B10 - ■ Compuesto E2

A- Gráfico SSC vs FSC (*side scatter vs forward scatter*). Superposición de todos los compuestos y controles analizados

B- Superposición de los histogramas correspondientes a la EGFP expresada

Luego de la observación de esta particularidad, se analizó la posibilidad de que el incremento tan marcado del % EGFP sea debido a un efecto tóxico de los compuestos sobre las células en estudio. En ciertas situaciones, donde se observa un efecto citotóxico, se produce un aumento de la autofluorescencia de las células, lo cual podría alterar los resultados. Sin embargo, del análisis de los *dot plots* FSC vs SCC no se evidencia daño celular, al menos evaluado por el tamaño y/o complejidad celular. De esta manera, podemos suponer que el efecto observado no se atribuye a la toxicidad por parte de los compuestos estudiados.

Este dato, fortaleció el interés en el estudio de estas moléculas potenciadoras.

No obstante, para asegurar el comportamiento de los compuestos sobre la actividad de los IFNs-I se corroboró su efecto, incubando las células HEp2-Mx2/EGFP con los mencionados compuestos, pero esta vez en ausencia de IFN, de manera de estudiar si

el comportamiento era propio del compuesto y no un efecto mediado por la modulación de la actividad del IFN. Aún en ausencia de los IFNs-I, se visualizó el efecto potenciador de la expresión de EGFP. De esta forma, pudo comprobarse que el comportamiento vislumbrado se debe a un efecto intrínseco de los compuestos sobre la expresión de EGFP y no por un efecto modulador de la actividad de la citoquina de interés. Como consecuencia, los mismos debieron descartarse del estudio, dado que en el contexto de nuestro objetivo de tesis, los mismos no resultan útiles.

### 7.3. Monitoreo de una biblioteca de 88 compuestos sintéticos (QuiMed-FCien) cedida por el Grupo de Química Medicinal de la Facultad de Ciencias (Montevideo, Uruguay)

La biblioteca de compuestos cedida gentilmente para su análisis por los Drs. Hugo Cerecetto y Mercedes González del grupo de Química Medicinal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República (Montevideo, Uruguay) contiene un total de 88 compuestos, dentro de los cuales, existen grupos de compuestos con características químicas estructurales similares. Todos ellos fueron evaluados con todas las líneas celulares reporteras en presencia de los rhIFN- $\beta$ 1a e rhIFN- $\alpha$ 2a. En la Tabla XXIII se muestra la discriminación entre los compuestos que evidenciaron algún efecto sobre la actividad de los IFNs-I, de los que no lo hicieron.

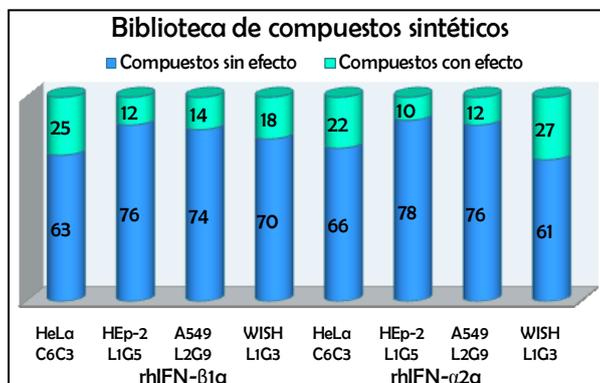
**Tabla XXIII:** Resultados del *screening* de la biblioteca de compuestos sintéticos QuiMed-FCien

<i>Línea celular reportera</i>	<i>HeLa</i>	<i>HEp-2</i>	<i>A549</i>	<i>WISH</i>	<i>HeLa</i>	<i>HEp-2</i>	<i>A549</i>	<i>WISH</i>
	<b>IFN-<math>\beta</math>1a (UI/ml)</b>				<b>IFN-<math>\alpha</math>2a (UI/ml)</b>			
<b><i>rhIFN</i></b>	1,5	50	20	10	2,5	250	2,5	40
<b><i>Compuestos totales</i></b>	88	88	88	88	88	88	88	88
<b><i>Compuestos potenciadores</i></b>	0	0	0	0	0	0	0	0
<b><i>Compuestos inhibidores</i></b>	25	12	14	18	22	10	12	27
<b><i>Compuestos neutros</i></b>	63	76	74	70	66	78	76	61

Como puede observarse en la Tabla XXIII, ninguno de los compuestos analizados de esta biblioteca mostró un efecto potenciador de la actividad de los IFNs; todos aquéllos que manifestaron ser posibles moduladores de la respuesta de los IFNs-I lo hicieron de forma negativa, es decir, inhibiendo la respuesta, visualizada como una disminución del porcentaje de EGFP respecto del control de IFN.

Las líneas celulares más susceptibles a la mayoría de los compuestos estudiados fueron las líneas WISH y HeLa. Sin embargo, es adecuado destacar, que de la totalidad de compuestos respondedores, no todos lo hicieron sobre todas las líneas. En cambio,

los resultados obtenidos con las bibliotecas previas analizadas siempre evidenciaron que un mismo compuesto mostraba su efecto sobre la totalidad de las líneas reporteras estudiadas. No obstante, esta conducta no se evidenció con estos compuestos sintéticos de la biblioteca QuiMed-FCien (Fig. 37).



**Fig. 37:** Análisis de una biblioteca de compuestos sintéticos, mediante EGR, empleando las 4 líneas reporteras, estimuladas con rhIFN-β1a y rhIFN-α2a.

Del total de compuestos estudiados, aquéllos que evidenciaron algún efecto modulador de la actividad biológica de los hIFNs-I fueron representados en color verde en las gráficas de barra; mientras que los que no arrojaron ningún resultado diferencial se representan como la porción de color azul de la gráfica de barra.

#### 7.4. Selección de compuestos respondedores.

Luego del monitoreo de las bibliotecas de compuestos, tanto naturales como sintéticos, y del análisis de los datos, que permitió distinguir compuestos respondedores de aquéllos que no mostraron efecto sobre la actividad de los IFNs-I, se seleccionaron una serie de compuestos para un estudio y caracterización más detallado.

Habitualmente, en estas metodologías innovadoras cuyo objetivo es el descubrimiento de nuevas drogas, o moléculas con características particulares, el paso siguiente al *screening* de las bibliotecas e identificación de compuestos con características deseadas, es la selección y caracterización de una porción del total de los compuestos; generalmente implica la selección del 10% de las moléculas líderes. Su estudio implica una amplia serie de ensayos que permiten estudiar sus propiedades y características particulares.

Los criterios seguidos para la selección de estos compuestos fueron los que se mencionan a continuación:

- Compuestos que mostraron mayores diferencias en su respuesta con respecto al control positivo, lo que se traduce en un incremento o disminución de la actividad del IFN.
- Compuestos que mantuvieron su comportamiento en los dos análisis realizados.

- Compuestos que, de acuerdo con el perfil obtenido en los gráficos de tamaño vs granulosidad (FSS vs SSC) de las células analizadas mediante citometría de flujo, no evidenciaron signos de toxicidad.

De este modo, teniendo en cuenta estos criterios, se eligieron los siguientes compuestos:

De la biblioteca HZI Nat (12 compuestos):

- Vioprolide B (VioB)
- Tubulysin I (Tubl)
- Chondramid B (ChoB)
- Chondramid A (ChoA)
- Chondramid C (ChoC)
- Rhizopodim A (RhiA)
- Gephironic A (GepA)
- Aurodin D (AuroD)
- Chivosazol A (ChiA)
- Sulasurem (SuLa)
- Pellasorem (Pella)
- Disorazol D1 (DisD1)

De la biblioteca HZI Sint(10 compuestos):

- P5D7
- P5H10
- P6C11
- P6H1
- P28E1
- P28E9
- P28F7
- P28G6
- P28H3
- P28H7

Y de la biblioteca QuiMed- FCien (18 compuestos):

- FVII
- CH4Br
- F11
- CH14BEN
- PHD81
- PHD101
- PHD100
- FV17
- FV4Br
- PHD121
- PHD111
- FV18
- FV10
- F13
- PHD122
- CDUB
- AM1
- DU1

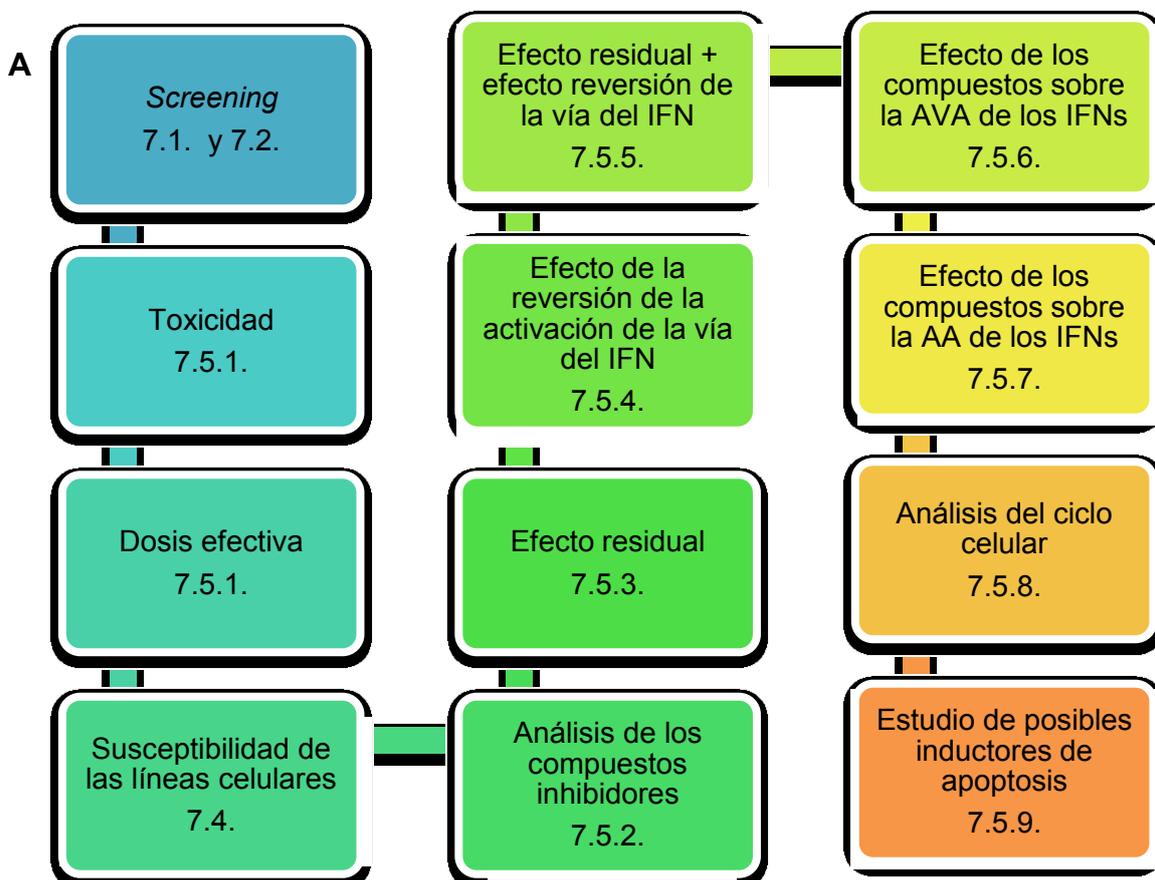
Si bien previamente se mencionó que habitualmente se selecciona el 10% de los compuestos líderes, puede observarse que en el caso particular de la biblioteca de QuiMed-FCien, dicho porcentaje fue mayor (20%) y esto se debe a la variabilidad

registrada en las respuestas de los mismos a las distintas líneas reporteras e incluso distintos subtipos de IFN-I.

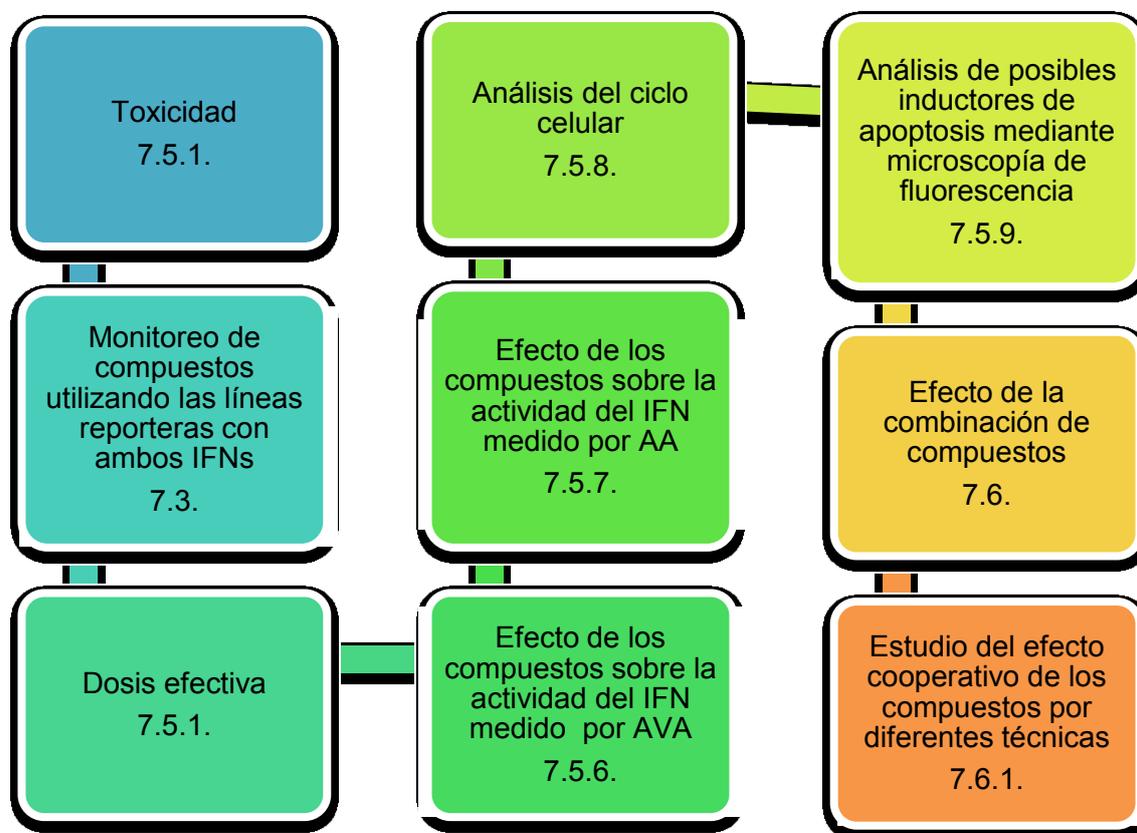
### 7.5. Caracterización de los compuestos seleccionados

Una vez que se han identificado compuestos candidatos para modular la respuesta de los IFNs-I, de la misma manera que se procede para otras proteínas en estudio, los mismos son extensamente caracterizados. La misma implica el estudio detallado de sus propiedades, químicas, físicas, biológicas y se efectúa mediante el análisis de diferentes parámetros, los cuales contemplan: evaluación de la toxicidad y de su dosis efectiva, entre otros. El objetivo final de estos estudios exhaustivos es poder interpretar su comportamiento, su acción biológica y, si es posible, optimizar aquellas condiciones que permitan obtener los resultados buscados luego del tratamiento con el compuesto.

En la Fig. 38 se resume la secuencia de los ensayos realizados para caracterizar los compuestos seleccionados de las bibliotecas provenientes del HZI: HZI Nat y HZI Sint (Alemania) (Fig. 38 A) y los ensayos correspondientes a la caracterización de los compuestos seleccionados de la biblioteca QuiMed-FCien (Uruguay) (Fig. 38 B). Existen algunas variantes entre los ensayos, y esta diferencia se debe fundamentalmente a la disponibilidad de los compuestos para poder estudiarlos detalladamente y a los tiempos para poder cumplir con los objetivos planteados.



B



**Fig. 38:** Secuencia de ensayos realizados para la caracterización de los compuestos seleccionados desde las distintas bibliotecas sintéticas y naturales.

A- Análisis de los compuestos provenientes de las bibliotecas HZI Nat y HZI Sint.

B- Análisis de los compuestos provenientes de la biblioteca QuiMed-FCien.

### 7.5.1. Evaluación de la toxicidad y la dosis efectiva

La toxicidad es la capacidad inherente de una sustancia química de producir efectos adversos en los organismos vivos o sobre cultivos celulares. Por lo tanto, cada vez que se descubre una sustancia química que pueda presentar propiedades interesantes, uno de los primeros ensayos que debe realizarse es el estudio de su toxicidad. En nuestro caso particular, donde el objetivo es encontrar moléculas capaces de modular la actividad de los IFNs-I, lo que se busca es encontrar la mínima concentración que resulte no tóxica sobre los cultivos celulares. En un paso posterior, si alguno de estos compuestos resulta potencial candidato para ser empleado como bioterapéutico en la modulación de la respuesta del IFN, deberán efectuarse las pruebas correspondientes a la toxicidad *in vivo*, mediante el empleo de animales.

No obstante, para cumplir con nuestro objetivo de tesis es suficiente evaluar la toxicidad de cada molécula sobre los cultivos celulares. Para ello se seleccionó la línea celular WISH como representante de todas las líneas celulares.

Por otro lado, evaluar la toxicidad previo al monitoreo de los compuestos también resultaría útil para optimizar los tiempos de ensayo, permitiendo de esta manera, sólo utilizar los compuestos en diluciones no tóxicas para los *screenings*. Sin embargo, muchas veces el número de compuestos que conforman cada una de las bibliotecas limita este análisis previo. Es por ello que para las bibliotecas HZI Nat y HZI Sint, la secuencia de ensayos fue la mencionada previamente; primero el monitoreo de los compuestos y luego el estudio de su toxicidad. Sin embargo, para la biblioteca de compuestos QuiMed-FCien se evaluó primero la toxicidad de los mismos y luego, empleando las diluciones límites no tóxicas para cada compuesto, se procedió al monitoreo de su efecto sobre la actividad de los IFNs-I mediante el EGR.

Cualquiera haya sido la secuencia de trabajo seguida, el protocolo de ensayo para evaluar toxicidad que se aplicó para todos los compuestos fue el mismo y, de acuerdo con lo descrito en el inciso 16.5.1. de Materiales y Métodos, se evaluaron 7 diluciones sucesivas de cada una de las sustancias analizadas.

Simultáneamente, se evaluó la dosis efectiva de cada compuesto siguiendo las descripciones de la metodología 16.5. 2. donde una vez más, se utilizó el EGR. La dosis efectiva de un compuesto se define como la mínima concentración del mismo capaz de generar una respuesta máxima sobre el sistema que se esté estudiando, en este caso en particular, la actividad de los rhIFNs-I. Para evaluar este parámetro, se analizaron diluciones de cada molécula seleccionada previamente y fueron las mismas que las empleadas para determinar su toxicidad. Tanto la dosis efectiva como la toxicidad son dos valores críticos a determinar y que están muy relacionados entre sí. Es decir, puede ocurrir que un compuesto presente una dosis efectiva para la cual el mismo es tóxico. De esta manera, este compuesto debe descartarse de la caracterización, ya que los efectos que se observan son producto de su toxicidad y no de un accionar específico y, por lo tanto, no cumple con los requisitos buscados y su uso no es viable.

La dosis efectiva de cada compuesto fue evaluada sobre las 4 líneas reporteras en presencia de ambos IFNs-I: IFN- $\beta$ 1a y IFN- $\alpha$ 2a.

Tanto los resultados de toxicidad y dosis efectivas obtenidos para los compuestos provenientes de las bibliotecas del HZI (HZI Nat y HZI Sint) y para la biblioteca QuiMed FCien se muestran en las Tablas XXIV y XXV, respectivamente.

**TablaXXIV: Evaluación de la toxicidad y la dosis efectiva de los compuestos seleccionados de las bibliotecas del HZI**

No: indica que los compuestos no son tóxicos en las concentraciones analizadas.

Compuesto	Naturaleza del compuesto	Toxicidad	Dosis efectiva	Efecto sobre la actividad de los IFNs-I
Vio B	Natural	No	800 ng/ml	Inhibidor
Tub I	Natural	>10 ng/ml	10 ng/ml	Potenciador
Pella	Natural	No	1 mM	Inhibidor
SuLa	Natural	No	1 mM	Inhibidor
Gep A	Natural	No	208 ng/ml	Inhibidor
ChoA	Natural	>65 ng/ml	260 ng/ml	Inhibidor
ChiA	Natural	>43 ng/ml	689 ng.ml <sup>-1</sup>	Inhibidor
AuroD	Natural	No	-	No mostró efecto
DisD1	Natural	>0,01 mM	1 mM	Potenciador
RhiA	Natural	>71,4 ng/ml	285,5 ng/ml	Potenciador
ChoB	Natural	>25 ng/ml	400 ng/ml	Inhibidor
ChoC	Natural	>122,5 ng/ml	980 ng/ml	Inhibidor
P5D7	Sintético	No	12,5 µM	Inhibidor
P5H10	Sintético	No	12,5 µM	Inhibidor
P6C11	Sintético	No	12,5 µM	Inhibidor
P6H1	Sintético	No	12,5 µM	Inhibidor
P28E1	Sintético	No	12,5 µM	Inhibidor
P28E9	Sintético	No	12,5 µM	Inhibidor
P28F7	Sintético	No	12,5 µM	Inhibidor
P28G6	Sintético	No	12,5 µM	Inhibidor
P28H3	Sintético	No	12,5 µM	Inhibidor
P28H7	Sintético	No	12,5 µM	Inhibidor

Luego del estudio de toxicidad, se observó que los compuestos naturales seleccionados ChoA, ChoB, ChoC, RhiA, AuroD, ChiA y DisD1 resultaron citotóxicos en las concentraciones utilizadas durante el monitoreo, donde para los mismos se registró alguna modulación de la actividad de los IFNs. Por lo tanto, estos compuestos que resultaron tóxicos fueron descartados del análisis.

El resto de los compuestos, correspondientes a las bibliotecas HZI Nat y HZI Sint, no mostraron efectos tóxicos en las concentraciones estudiadas, sobre las células WISH empleadas para dicho análisis.

**Tabla XXV:** Análisis de la toxicidad y la dosis efectiva de los compuestos sintéticos seleccionados de la biblioteca QuiMed-FCien.

Compuesto	Concentración límite tóxica (µg/ml)	Dosis Efectiva (µg/ml)	Efecto sobre la actividad de los IFNs-I
<b>FV17</b>	15,0	15,0	Inhibidor
<b>PHD111</b>	11,5	11,5	Inhibidor
<b>F11</b>	9,2	9,2	Inhibidor
<b>PHD100</b>	NT	68,0	Inhibidor
<b>PHD101</b>	NT	18,6	Inhibidor
<b>AM1</b>	2,7	2,7	Inhibidor
<b>CH4Br</b>	6,7	6,7	Inhibidor
<b>FV10</b>	10,5	10,5	Inhibidor
<b>DU1</b>	3,1	3,1	Inhibidor
<b>CDUB</b>	6,7	6,7	Inhibidor
<b>PHD122</b>	10,0	10,0	Inhibidor
<b>CH14BEN</b>	10,5	10,5	Inhibidor
<b>FV4Br</b>	32,0	32,0	Inhibidor
<b>FVII</b>	23,3	23,3	Inhibidor
<b>F13</b>	23,0	23,0	Inhibidor
<b>FV18</b>	17,5	17,5	Inhibidor
<b>PHD81</b>	NT	2,5	Inhibidor
<b>PHD121</b>	5,0	5,0	Inhibidor

NT: No tóxico en ninguna de las concentraciones de compuesto estudiadas.

Como se explicó previamente, los compuestos sintéticos provenientes de la biblioteca QuiMed-FCien, muestran una amplia variabilidad en sus respuestas. Debido a esto, con los resultados obtenidos del análisis de la dosis efectiva medida a través del ensayo reportero, se calculó la siguiente relación: % EGFP de la dilución de compuesto que mostró el mayor efecto respecto %EGFP del control positivo (células tratadas sólo con rhIFN sin ningún compuesto). Todos aquellos compuestos que exhibieron una relación mayor a 1,3 o menor a 0,7 fueron seleccionados para continuar con el análisis. En cambio, se descartaron del análisis el resto de los compuestos estudiados, cuyos valores de relación estuvo comprendida entre 0,7 y 1,3. Es decir, con este criterio se buscó separar aquellos compuestos que mostraron una respuesta superior al 30% sobre la actividad de los rhIFNs, ya sea incrementándola o inhibiéndola y se continuó con su caracterización. Esta relación se calculó para cada compuesto evaluado mediante las 4 líneas reporteras en presencia de ambos IFNs-I (Tabla XXVI).

**Tabla XXVI: Análisis de la actividad de los compuestos de la biblioteca QuiMed-FCien medidas por EGR.**

Se calculó la relación del %EGFP obtenido para la dosis efectiva de cada compuesto con respecto al %EGFP obtenido para el control. Los compuestos en fondo celeste son los seleccionados para continuar los estudios porque presentan un efecto sobre la actividad de los IFNs superior al 30%.

	<i>rhIFN <math>\beta</math>1a</i>				<i>rhIFN <math>\alpha</math>2a</i>			
	Relación % EGFP muestra / % EGFP control							
	A549 L2G9	HeLa C6C3	HEp2 L1G5	WISH L1G3	A549 L2G9	HeLa C6C3	HEp2 L1G5	WISH L1G3
<b>F13</b>	0,85	0,48	0,62	0,27	0,95	0,59	0,57	0,35
<b>PHD81</b>	1,26	0,84	0,33	0,64	1,21	0,74	0,22	0,24
<b>PHD100</b>	1,16	0,63	0,89	0,54	1,05	0,76	0,70	0,43
<b>PHD101</b>	0,89	0,50	0,58	0,42	0,88	0,45	0,24	0,10
<b>FVII</b>	0,91	0,06	0,59	0,33	0,76	0,18	0,33	0,26
<b>PHD111</b>	1,00	0,67	1,13	0,71	0,93	0,69	1,00	0,62
<b>PHD121</b>	1,05	0,35	0,98	0,98	1,05	0,71	1,00	0,71
<b>PHD122</b>	1,41	0,53	1,14	0,19	1,36	0,71	1,34	0,15
<b>CH14BEN</b>	0,81	0,65	0,71	0,78	0,78	0,56	0,76	0,42
<b>FV4Br</b>	1,13	0,08	0,73	0,76	0,79	0,39	0,93	0,36
<b>FV17</b>	1,24	0,39	0,57	0,62	0,79	0,40	0,71	0,61
<b>CH4Br</b>	0,72	0,57	0,85	0,85	0,82	0,52	0,74	0,71
<b>FV18</b>	1,23	0,73	0,81	1,15	1,02	0,61	0,89	0,70
<b>FV10</b>	1,12	0,63	0,81	1,05	0,76	0,53	1,08	0,60
<b>FII</b>	1,22	0,87	1,05	1,94	1,02	0,88	1,00	1,36
<b>AM1</b>	1,20	0,88	0,76	0,88	1,11	0,96	0,83	0,75
<b>CDUB</b>	1,00	0,75	0,87	1,29	0,91	0,78	0,91	1,20
<b>DU1</b>	0,96	0,67	1,05	0,88	1,14	0,83	1,15	0,71

De esta manera, los compuestos que demostraron tener un efecto sobre la actividad de los IFNs superior al 30%, incrementando o disminuyendo su respuesta, y que en la Tabla XXVI se distinguen con fondo celeste, serán caracterizados mediante una serie de ensayos, bajo las condiciones en las cuales manifestaron el mencionado comportamiento.

#### 7.5.2. Análisis del efecto de los compuestos seleccionados de la biblioteca HZI Nat sobre la línea NIH3T3S1CS2YIRF7mCherry mediante microscopía de fluorescencia.

La línea celular murina reportera NIH3T3IRF7S1CS2Y, cedida por el Dr. Mario Köster del Instituto HZI, es una línea reportera de la vía de acción de los IFNs-I.

Las células NIH3T3, derivadas de fibroblastos murinos, han sido transfectadas con una construcción BAC que contiene el promotor IRF7 (factor de respuesta a

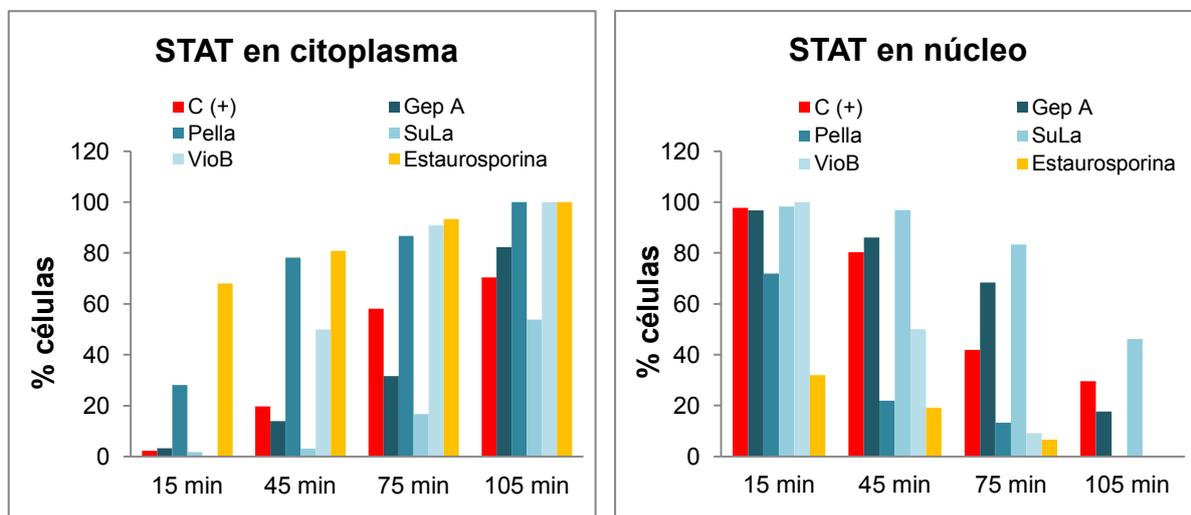
interferon 7) dirigiendo la expresión de la proteína reportera mCherry. Esta secuencia fue incorporada por las células en su genoma. Cuando las mismas son incubadas con interferón murino (mIFN), éste se une a su receptor en la superficie celular e inicia la vía de señalización/activación del IFN, la cual concluye en el núcleo celular con la activación de genes de respuesta a IFN, uno de ellos, el IRF7. Al activarse el promotor IRF7, el mismo permite la expresión de la proteína reportera mCherry, la cual puede visualizarse al cabo de 30 h pos-inducción mediante microscopía de fluorescencia o citometría de flujo. Este sistema es semejante a nuestro sistema reportero, pero las diferencias son: la proteína reportera empleada, el promotor de respuesta a IFN seleccionado y la especie (murino contra humano). Comparando ambos sistemas reporteros, podemos comprobar que los tiempos de respuesta de nuestro sistema son menores (24 h comparado con 30 h del modelo reportero murino). Esta diferencia se debe fundamentalmente a la expresión de la proteína reportera, ya que la mCherry presenta la desventaja de requerir un tiempo más prolongado para su expresión comparado con otras proteínas reporteras. Además, este tipo de proteínas, al igual que las proteínas reporteras rojas como la DsRed y RFP, requieren para su excitación de un láser amarillo ( $\lambda = 594 \text{ nm}$ ) para poder obtener mejores resultados.

Este no es un láser comúnmente incluido en las configuraciones estándar de los equipos utilizados para su análisis (microscopio y/o citómetro de flujo) y, por tal motivo, se requiere de instalaciones más complejas para su detección. Sin embargo, su excitación puede realizarse con un láser azul, pero sólo se consigue el 60% de excitación (Hawley y col., 2001). A pesar de estas desventajas, estas moléculas aún son de gran utilidad para el análisis combinado de distintos reporteros. Es decir, por ejemplo, para evaluar dos parámetros celulares empleando dos proteínas reporteras que presenten una diferencia de emisión suficientemente amplia para que no se solapen entre sí sus espectros de emisión. Comúnmente para este tipo de análisis se emplean las proteínas rojas y verdes fluorescentes.

Además, esta línea murina contiene las proteínas STAT1 y STAT2 fusionadas a las proteínas reporteras *yellow fluorescent protein* (YFP) y *cyan fluorescent protein* (CFP). Estas proteínas forman parte de la cascada de activación de los IFNs-I. En condiciones normales se encuentran en el citoplasma de las células. Cuando el IFN se une a su receptor en la superficie celular, el mismo se activa y fosforila a las proteínas Tyk 2 y Jak 1. A su vez, éstas fosforilan a las proteínas STAT 2 y STAT 1, respectivamente. Así las proteínas fosforiladas traslocan al núcleo y, de esta forma, mediante microscopía de fluorescencia puede monitorearse la activación/traslocación de dichas proteínas luego de la incubación de las células con mIFN. Este comportamiento puede visualizarse durante las 2 primeras horas pos-inducción con mIFN.

Por lo tanto, mediante el empleo de esta línea celular se estudió el efecto de los compuestos naturales seleccionados sobre la actividad de los IFNs. Particularmente, el efecto de los compuestos inhibidores, de manera de determinar si los mismos ejercen su efecto a nivel de unión del IFN a su receptor específico en la superficie celular o bien, en una etapa posterior, luego de la traslocación de las proteínas STAT al núcleo. Para realizar este ensayo se utilizaron 2 controles: control positivo (células tratadas con mIFN únicamente) y control de inhibición de la actividad del mIFN con estaurosporina (células tratadas con mIFN y estaurosporina). La estaurosporina es un inductor de apoptosis y bloqueante de la actividad del IFN. Es por esto que se utiliza como control para evidenciar la inhibición de la actividad del IFN.

Luego de realizar los diferentes tratamientos, se capturaron las imágenes empleando un microscopio de epifluorescencia (NIKON, EE.UU). Las imágenes fueron capturadas empleando la cámara de microscopio Digital Sight DS-U3 (NIKON, EE.UU) y fueron analizadas utilizando el *software* Image J, con el cual se calculó el porcentaje de células que presentaron las proteínas STAT en el citoplasma, y el porcentaje de aquéllas cuyas proteínas STAT se encontraban en el núcleo para cada tiempo estudiado y condición ensayada (Fig. 39 y Fig. 40).

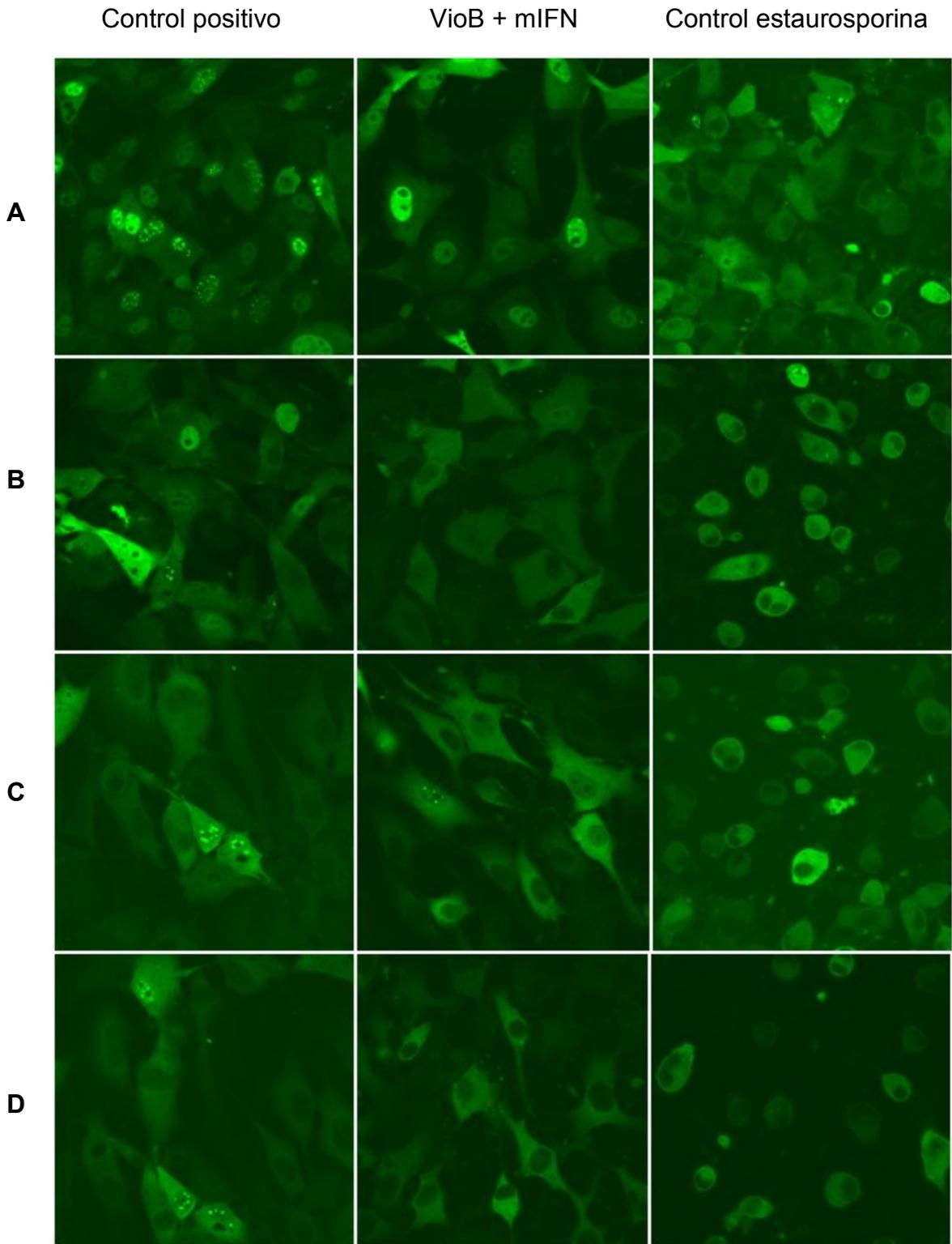


**Fig. 39:** Análisis del efecto inhibitor de los compuestos naturales seleccionados sobre la línea murina reportera NIH3T3S1CS2YIRF7mCherry.

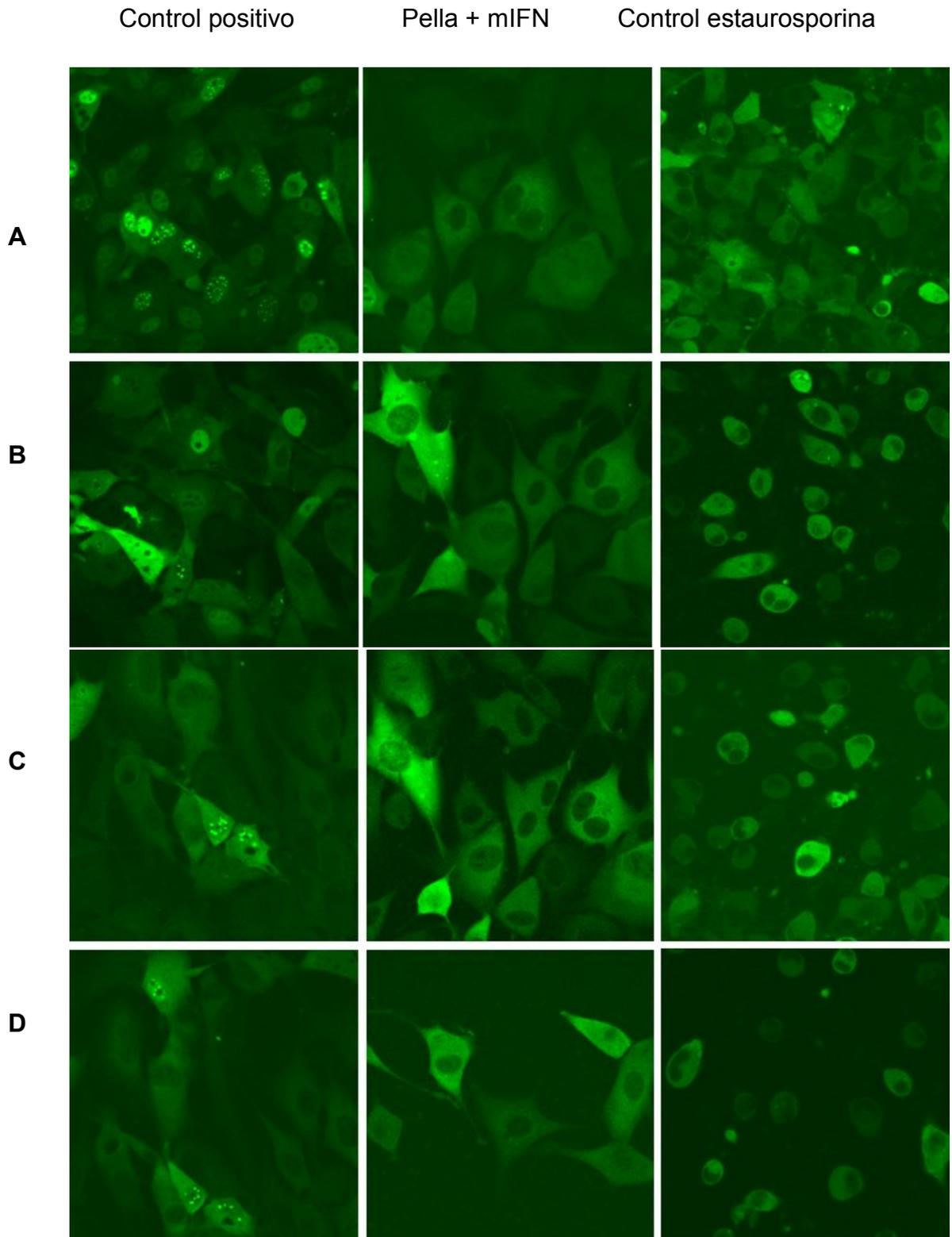
En el eje de ordenadas se graficó el porcentaje de células positivas en función del tiempo de inducción en el eje de abscisas.

Las células reporteras murinas fueron incubadas con mIFN 1.000 UI/ml y cada uno de los compuestos inhibidores, evaluados en su dosis efectiva. Se incluyeron además, un control positivo (C+) de la vía de activación de los IFNs-I (células tratadas sólo con mIFN) y un control de inhibición inmediata de la vía de respuesta de los IFNs-I (células tratadas sólo con estaurosporina). Se evaluó la traslocación al núcleo de las proteínas STAT1 y STAT2, estudiando la localización de las proteínas reporteras CFP e YFP mediante microscopía de fluorescencia, capturando imágenes a los 15, 45, 75 y 105 min pos-inducción (PI).

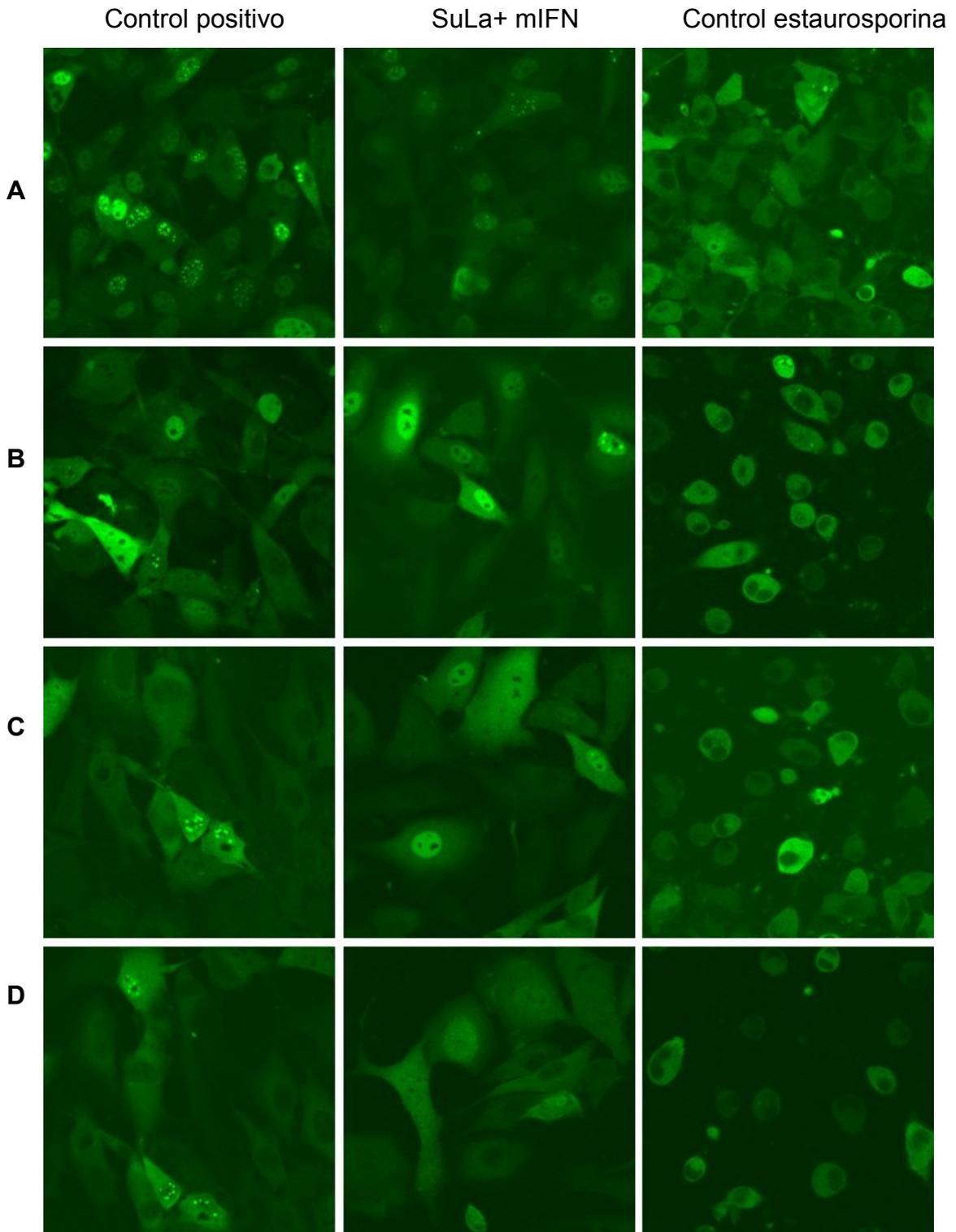
1-



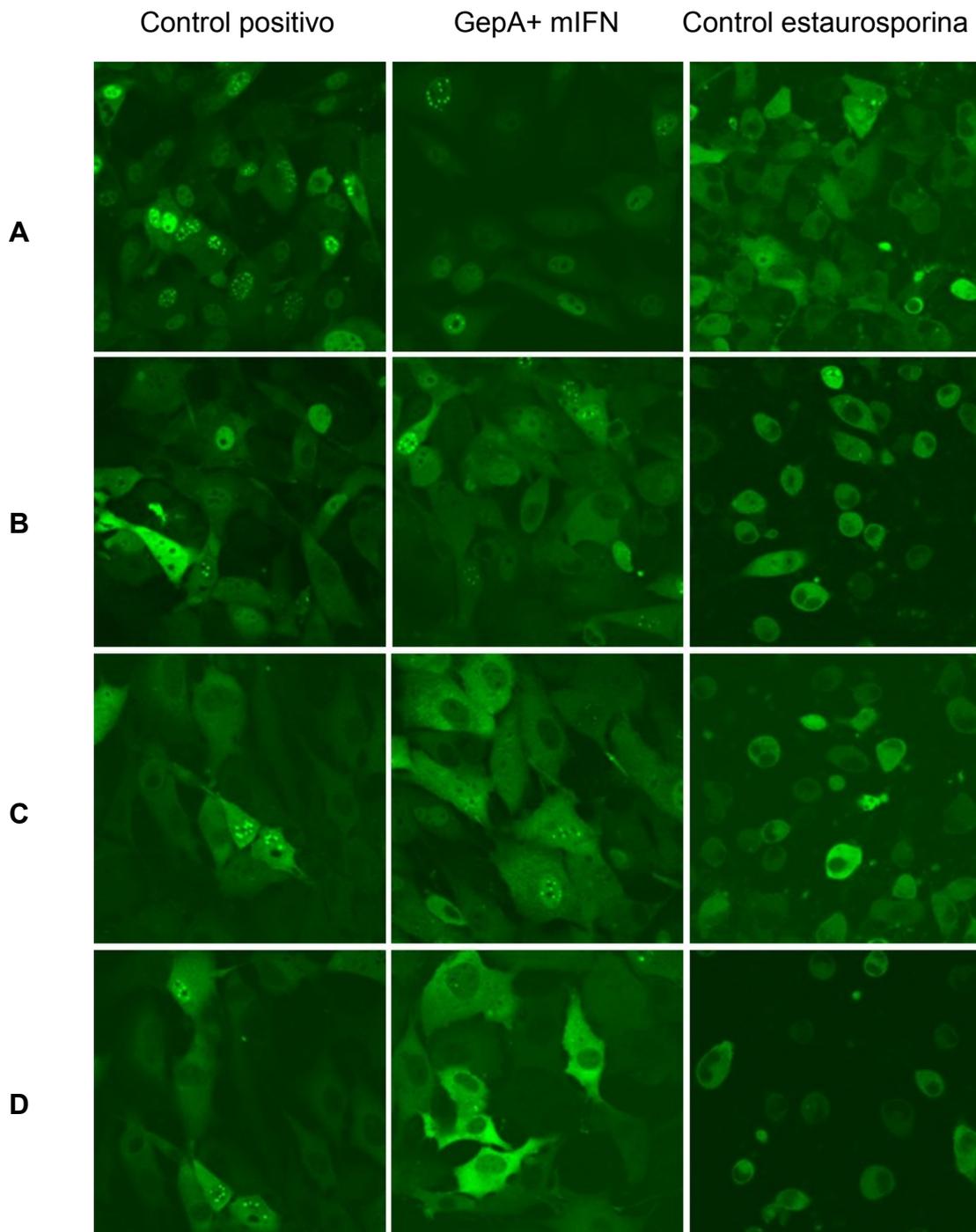
2-



3-



4-



**Fig. 40:** Análisis del efecto inhibitor de los compuestos naturales seleccionados sobre la línea murina reportera NIH3T3S1CS2YIRF7mCherry evaluado por microscopía de fluorescencia, empleando un aumento 10 X.

A: 15 min PI- B: 45 min PI – C: 75 min PI – D: 105 min PI- PI: pos-inducción con mIFN.

Compuestos analizados: 1- VioB; 2- Pella; 3- SuLa; 4- GepA.

El ensayo se realizó como se indica en la Fig. 39.

Luego de la inducción con mIFN se activa la vía del IFN, las proteínas STAT se fosforilan y traslocan al núcleo desde el citoplasma, para activar genes de respuesta a IFN. Este efecto se visualiza durante las 2 h primeras PI. Si la inhibición por parte de los compuestos ocurre a nivel de unión a receptores, no se produce la traslocación al núcleo de las proteínas STAT: si ocurre en una etapa posterior, se observará dicha traslocación.

A manera de ejemplo se muestran diferentes imágenes en la Fig. 40, donde se puede observar claramente que aquellas células que fueron tratadas únicamente con mIFN, es decir, el control positivo, presentan las proteínas STAT en el núcleo celular. La totalidad de las células evaluadas a los 15 min PI muestran este comportamiento; y el mismo va disminuyendo a medida que progresa el tiempo. Luego de 105 min PI, el porcentaje de células que demuestran STAT en el núcleo es aproximadamente un 30-35%. Éste es el comportamiento esperado para todas aquellas células tratadas con mIFN.

Por otro lado, las células que fueron incubadas con estaurosporina, mostraron prácticamente la totalidad de las proteínas STAT en forma citoplasmática. La estaurosporina es un inductor de apoptosis, mediante la inhibición de las proteínas quinasas y activación de caspasa. Es por ello que las células tratadas con estaurosporina muestran una morfología apoptótica, pudiendo observarse pérdida de la estructura del citoesqueleto microtubular. Dado que la estaurosporina actúa inhibiendo las proteínas quinasas, la vía del IFN se ve inhibida, debido a que la actividad de las proteínas quinasas (Tyk2 y Jak1), responsables de los primeros pasos de esta cascada, está inhibida.

Luego de 15 min de haber incubado las células en presencia de mIFN y los compuestos en estudio, evaluados en la concentración correspondiente a su dosis efectiva, sólo las células tratadas con el compuesto Pella mostraron contenido de células STAT intracitoplasmática. En las células tratadas con el resto de los compuestos las proteínas STAT se observaron en el núcleo, demostrando un comportamiento similar al del control positivo.

Al cabo de 45 min las células tratadas con Pella y VioB exhibieron STAT citoplasmática, mientras que en el caso de las células incubadas con los compuestos SuLa y GepA se observaron las proteínas STAT en el núcleo. El mismo patrón de comportamiento se observó para los 75 min PI.

Finalmente, luego de 105 min de inducción con mIFN y los compuestos, se observó STAT intracitoplasmática en las células que habían sido tratadas con los compuestos Pella, VioB y GepA, mientras que aquellas incubadas con el compuesto SuLa aún mostraron proteínas STAT dentro del núcleo celular (Fig. 39 y 40).

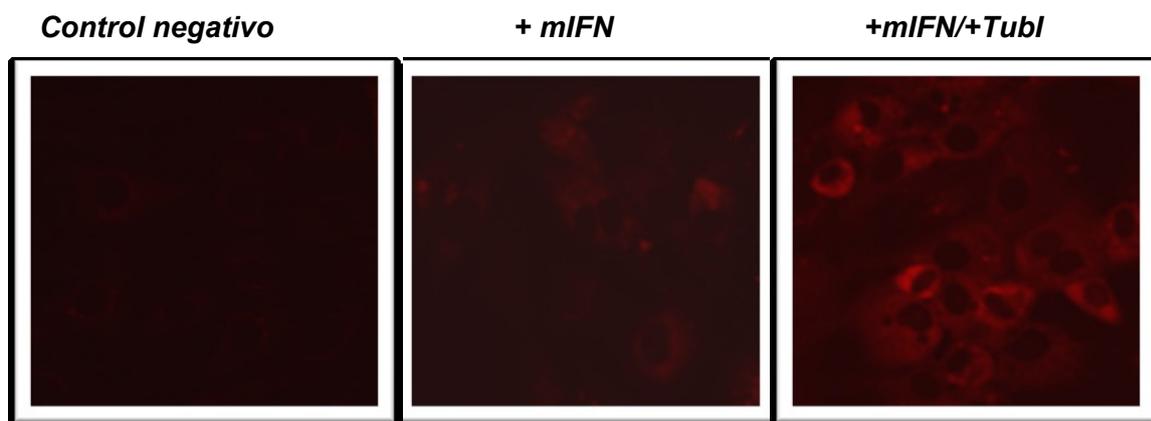
De lo observado pudo concluirse que si bien todos los compuestos estudiados presentan un efecto inhibitorio sobre la actividad del mIFN-I, conforme con los resultados observados luego del monitoreo de los compuestos con el EGR, el efecto inhibitorio por parte de los compuestos ocurre en diferentes etapas de la vía de acción de los IFNs-I. Por un lado, los compuestos Pella y VioB demostraron un comportamiento similar al de la estaurosporina, inhibiendo inmediatamente la unión del IFN a sus receptores y por

ende no se activa la cascada de fosforilación/activación, observándose a las proteínas STAT intracitoplasmáticas. Sin embargo, una diferencia entre estos compuestos es que este efecto se observa inmediatamente al tratar las células con el compuesto Pella y no así para las células tratadas con el compuesto VioB. Contrariamente, las células reporteras tratadas con los compuestos GepA y SuLa, presentaron un efecto similar al del control positivo. Es decir, las proteínas STAT se visualizaron dentro del núcleo celular, lo que permite concluir que la acción de estos compuestos no está vinculada con la inhibición de la traslocación al núcleo de las proteínas STAT, sino que la misma sucede en una instancia posterior, pudiendo la misma ocurrir en el núcleo, mediante la inhibición de genes de respuesta a IFN o de factores de transcripción asociados a la expresión de genes de respuesta que permitan concluir con la vía de acción de los IFNs-I.

Luego de realizar este estudio puede decirse que se ha logrado aislar dos compuestos con actividad inhibidora sobre los IFNs-I a nivel de unión de la citoquina a sus receptores: Pella y VioB, siendo el efecto inhibitor del compuesto Pella más potente que el del compuesto VioB, debido al bloqueo de la unión del IFN a su receptor específico prácticamente de forma inmediata. Asimismo, lograron identificarse otros dos compuestos inhibidores, SuLa y GepA, cuyos efectos serían posterior a la traslocación al núcleo de STAT.

Finalmente, puede concluirse que el efecto que estos compuestos presentan es evidentemente modulador de la actividad de los IFNs-I, debido a que se observa el mismo comportamiento sobre mIFN y hIFN.

Por otro lado, y como fue mencionado previamente, este sistema reportero cuenta con una construcción IRF7→mCherry. Frente a la inducción de las células con IFN, se activa la vía de acción del IFN, la que culmina en el núcleo con la activación de genes de respuesta al IFN, como es el caso del IRF7. Como consecuencia de la activación del promotor IRF7, se produce la expresión de la proteína mCherry, la cual puede detectarse mediante microscopía de fluorescencia o citometría de flujo. Valiéndonos de este modelo reportero, y con el objetivo de corroborar el efecto potenciador que presentó el compuesto TubI sobre la actividad de los IFNs-I mediante nuestro sistema reportero Mx2/EGFP humano, se estudió la expresión de mCherry luego de tratar las células reporteras murinas con el mIFN y el compuesto TubI (Fig. 41).



**Fig. 41:** Análisis del efecto potenciador del compuesto Tub I sobre la actividad del mIFN, empleando el sistema reportero NIH3T3S1YS2CIRF7mCherry.

Cuando estas células son tratadas con mIFN, se activa la cascada de señalización que concluye con la activación del promotor IRF7, el cual dirige la expresión de la proteína reportera mCherry.

La expresión de mCherry se determinó 30 h post inducción con TubI y/o mIFN mediante microscopía de fluorescencia empleando un aumento 10 X.

El compuesto natural TubI fue seleccionado luego del monitoreo y análisis de la biblioteca de compuestos naturales con los sistemas reporteros humanos Mx2/EGFP ya que mostró un efecto potenciador de la actividad de los hIFNs-I. Luego de evaluar su comportamiento en el sistema reportero murino, se corroboró el mismo efecto potenciador de la respuesta de los IFNs-I, en este caso de origen murino. De esta manera se confirmó el efecto de estos compuestos naturales para modular la respuesta de los IFNs-I, ya sea incrementando o disminuyendo su respuesta. Este comportamiento parecería ser específico sobre la actividad del IFN dado que cada compuesto ejerce su acción sobre distintos sistemas reporteros, murino y humano, en los cuales se activan distintos genes de respuesta a IFN (IRF7 y Mx2, respectivamente), que son los promotores que están dirigiendo la expresión de las proteínas reporteras (EGFP o mCherry).

Por otro lado, es importante mencionar que este análisis sólo se realizó sobre los compuestos naturales seleccionados, y no sobre la totalidad de los compuestos dada la limitante del tiempo de ensayo. Este estudio se llevó a cabo durante la pasantía realizada en Alemania. Si bien, mediante un acuerdo de transferencia de material, se obtuvieron las células para ser transportadas a Argentina, al intentar revitalizarlas no se obtuvieron resultados positivos, y como consecuencia, al no disponer de las células reporteras, no se pudo extender el presente análisis a los compuestos sintéticos.

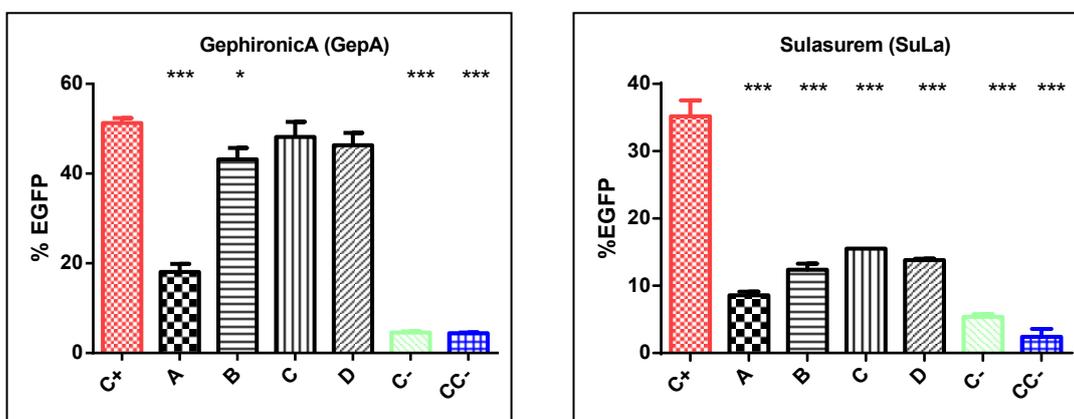
### 7.5.3. Análisis del efecto residual de los compuestos sobre la actividad de los IFNs-I

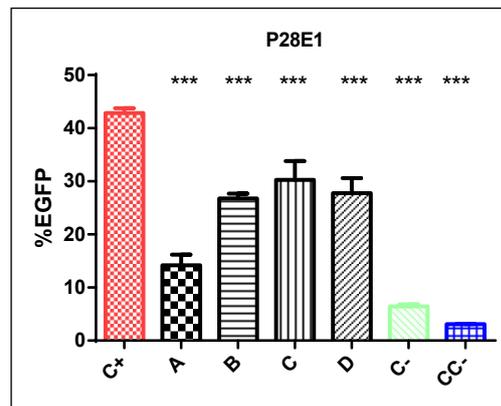
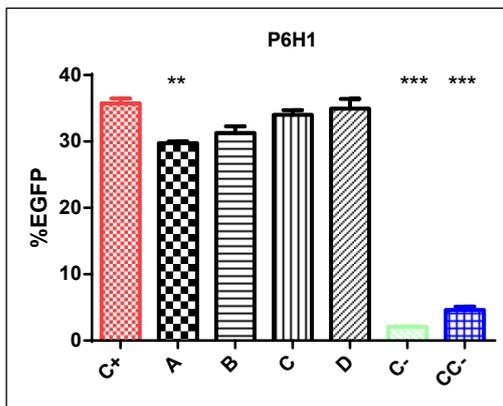
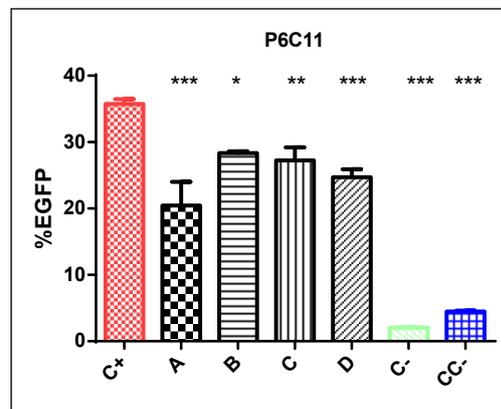
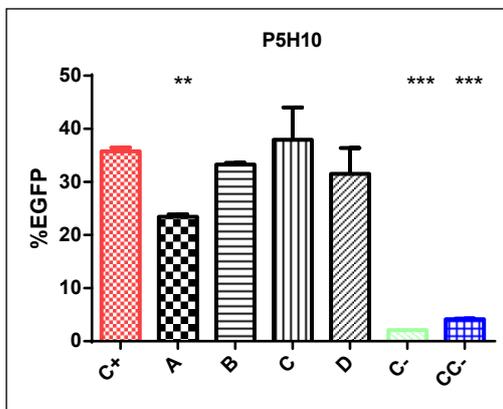
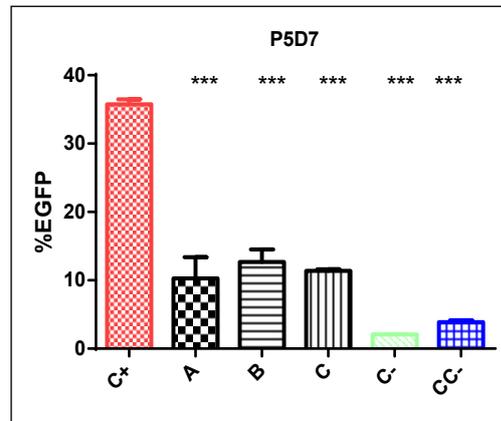
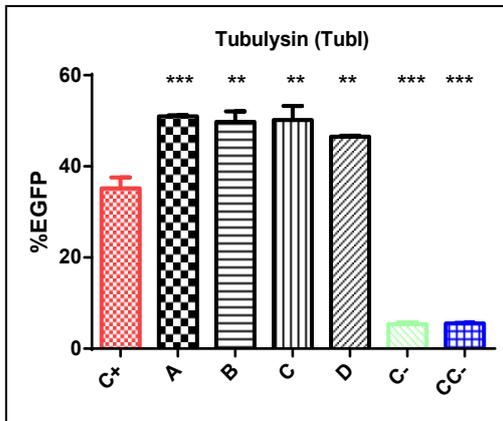
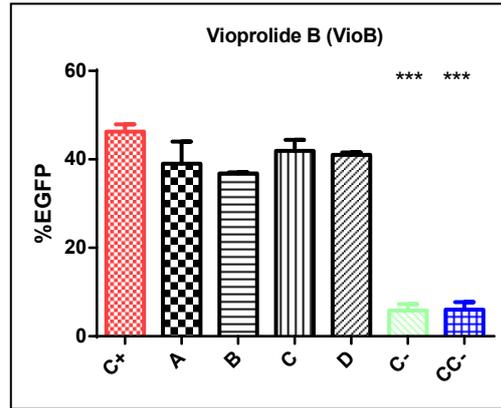
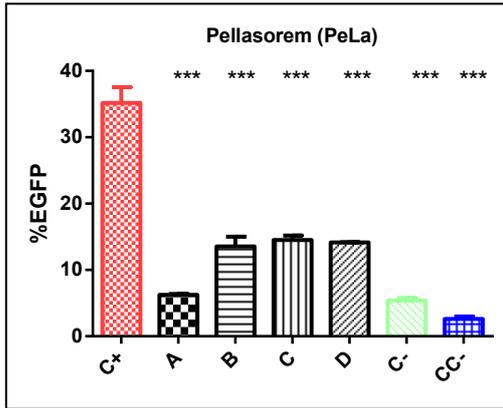
La caracterización de los compuestos naturales y sintéticos de las bibliotecas provistas por el HZI continuó con la evaluación del efecto residual de los mismos. De esta manera, se estudió si el efecto que presentaron estas moléculas para modular la actividad de los hIFNs-I es capaz de permanecer aún luego de que los compuestos sean removidos desde el medio de incubación con las células. Para ello, se empleó el modelo de gen reportero WISH-Mx2/EGFP en presencia de rhIFN- $\beta$ 1a.

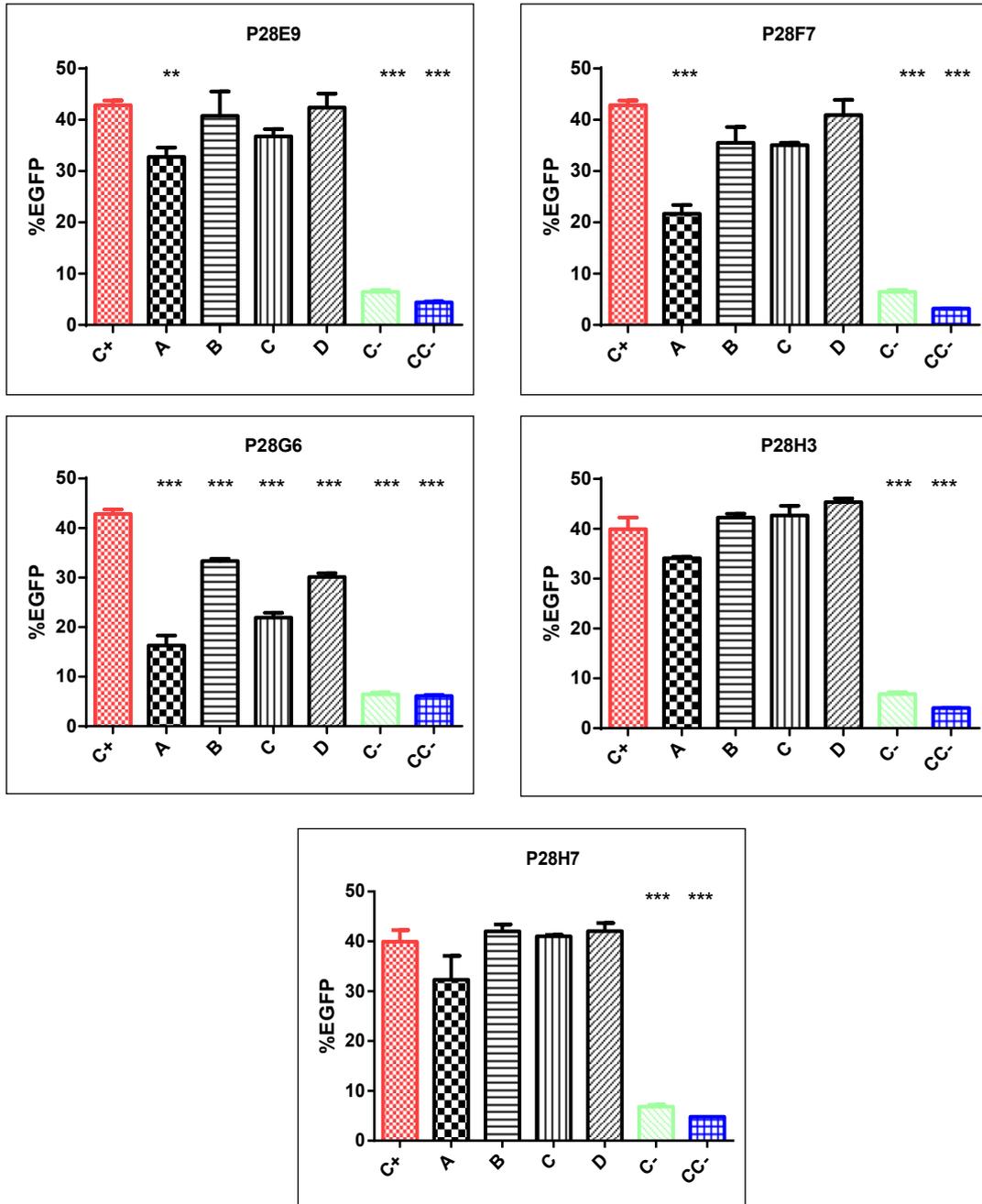
En este ensayo se utilizó rhIFN- $\beta$ 1a en una potencia constante de 10 UI/ml y los compuestos en sus dosis efectivas correspondientes (Tabla XXV). Se siguió el procedimiento indicado en Materiales y Métodos procesando las muestras por triplicado, incluyendo los siguientes controles: negativo (sin IFN ni compuesto), positivo (IFN únicamente) y del compuesto (únicamente compuesto para controlar el posible efecto del compuesto por sí mismo). Las condiciones evaluadas se resumen a continuación:

- A- Compuesto 1 h  $\rightarrow$  Lavado  $\rightarrow$  IFN 24 h  $\rightarrow$  Medición final
- B- Compuesto 1 h  $\rightarrow$  Lavado  $\rightarrow$  1 h medio de cultivo  $\rightarrow$  IFN 24 h  $\rightarrow$  Medición final
- C- Compuesto 1 h  $\rightarrow$  Lavado  $\rightarrow$  2 h medio de cultivo  $\rightarrow$  IFN 24 h  $\rightarrow$  Medición final
- D- Compuesto 1 h  $\rightarrow$  Lavado  $\rightarrow$  3 h medio de cultivo  $\rightarrow$  IFN 24 h  $\rightarrow$  Medición final

Una vez realizado el ensayo, los datos obtenidos fueron analizados y sometidos a un tratamiento estadístico ANOVA, seguido del *test* de Tukey, de manera de poder determinar estadísticamente la existencia de diferencias significativas entre cada uno de los casos en estudio y los correspondientes controles. Este tratamiento estadístico se realizó empleando el *software* GraphPad Prism® 5.01 (Fig. 42).







**Fig. 42:** Análisis del efecto residual de los compuestos seleccionados a partir de las bibliotecas de compuestos naturales y sintéticos cedida por el HZI (Braunschweig, Alemania).

C+: control positivo; C-: control negativo; CC-: control compuesto; A, B, C, D: diferentes condiciones evaluadas.

El estudio del efecto residual de los compuestos seleccionados se realizó mediante el EGR, empleando la línea reportera WISH-Mx2/EGFP, la cual fue inducida con rhIFN- $\beta$ 1a 10 UI/ml y en cada caso correspondiente, el compuesto de interés en su dosis efectiva. Luego del tratamiento de las células reporteras con los compuestos e IFN, se determinó el %EGFP. En el eje de ordenadas se graficó el %EGFP en función de las condiciones ensayadas (eje de abscisas).

\*, \*\*, \*\*\*: indican el grado de significación estadística con relación al control positivo del ensayo, correspondientes a  $p < 0,1$ ;  $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ , respectivamente. Se aplicó el test estadístico de ANOVA seguido del test post-ANOVA de Tukey.

Los compuestos naturales Tubl, GepA, SuLa y Pella mostraron un efecto residual, no así el compuesto natural VioB. No obstante, los mismos exhibieron diferentes comportamientos en cuanto a la magnitud del efecto residual. Particularmente, los compuestos SuLa y Pella evidenciaron un efecto residual realmente significativo para todas las condiciones evaluadas, incluso la condición D, donde el IFN es agregado 3 h posteriores a la remoción del compuesto del medio; lo cual permite pensar que estos compuestos estarían inhibiendo la actividad de los IFNs-I de manera prácticamente irreversible..

Por su parte, el compuesto Tubl, el único compuesto potenciador encontrado, mostró también un efecto residual, el cual fue superior para la condición A (grado de significación  $p < 0,001$ ), en la cual el IFN es agregado inmediatamente a la remoción del compuesto. Asimismo, las restantes condiciones evaluadas con este mismo compuesto, permitieron evidenciar claramente un efecto residual del compuesto para potenciar la actividad de los hIFNs-I.

El compuesto VioB fue el único que no manifestó un efecto residual; es decir, su efecto inhibitor no se evidenció luego de su remoción. Y sólo ejerció su potencial inhibitor sobre la actividad de los hIFNs-I cuando fue co-incubado con la citoquina en estudio, como se demostró en los ensayos previos.

Los compuestos sintéticos P28E1 y P28G6 mostraron un comportamiento semejante al de los compuestos naturales SuLa y Pella, donde su efecto residual fue evidente para todas las condiciones estudiadas. Contrariamente, los compuestos P28H3 y P28H7, no evidenciaron un efecto residual, comportándose como el compuesto natural VioB.

Los compuestos P6H1, P28E9 y P5H10 manifestaron un efecto residual sólo en la condición en la cual el IFN fue agregado a las células en forma inmediata a la eliminación del compuesto.

El compuesto P28F7 demostró un efecto significativo para la primera condición estudiada y un efecto menor para las dos siguientes condiciones, no así para la situación cuando el IFN fue agregado luego de 3 h posteriores a que el compuesto haya sido eliminado del medio.

Finalmente, los compuestos P5D7 y P6C11 mostraron un efecto residual en todos los casos, pero llamativamente, el mismo fue superior para las condiciones A y D.

En general, se observó un efecto residual más importante en el caso de los compuestos naturales en relación al mismo efecto observado para los sintéticos.

#### 7.5.4. Análisis de la reversión de la activación de los IFNs-I por parte de los compuestos

Se procedió al análisis de la capacidad que presentan los compuestos para revertir la vía de acción de los hIFNs-I. Dado que la iniciación de la vía de acción del IFN ocurre de forma inmediata a la incubación del IFN con su receptor específico, el efecto que se pretende evaluar es si luego de iniciada la vía de acción del IFN, los compuestos agregados a tiempos posteriores, son capaces de ejercer su efecto sobre la actividad de los IFNs-I.

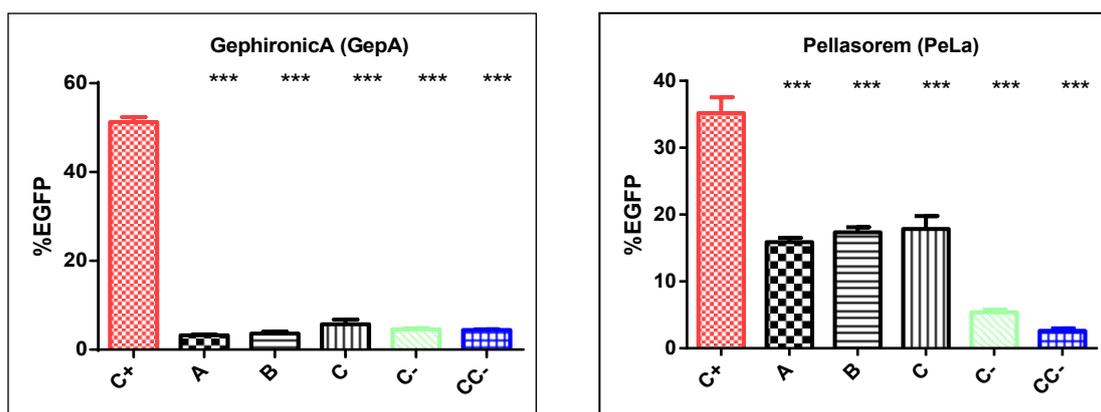
Para ello, se empleó el EGR basado en la línea reportera WISH Mx2/EGFP, siguiendo el protocolo mencionado en el inciso 16.4.1 de Materiales y Métodos. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

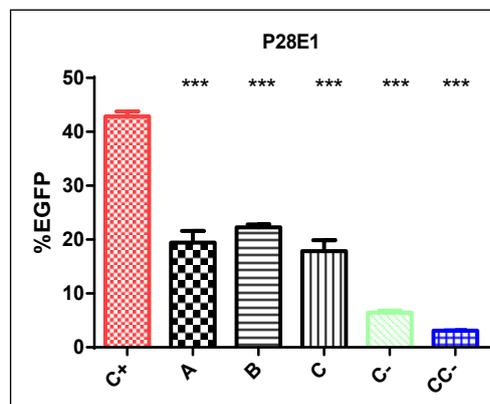
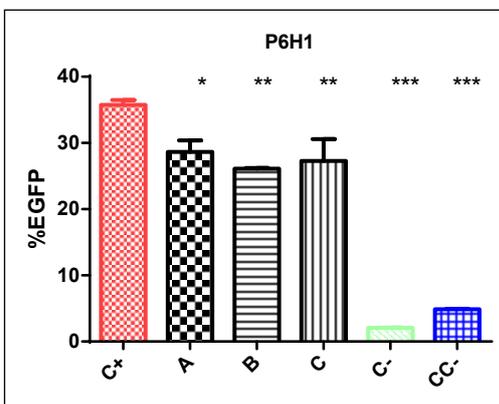
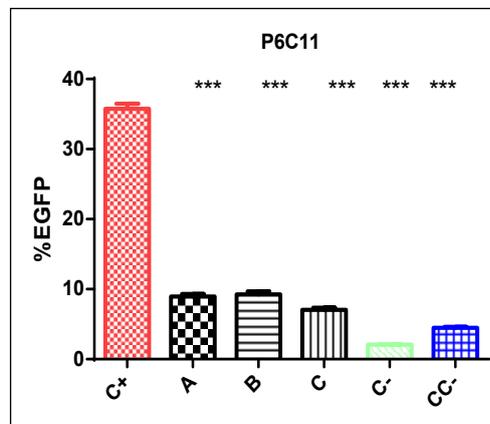
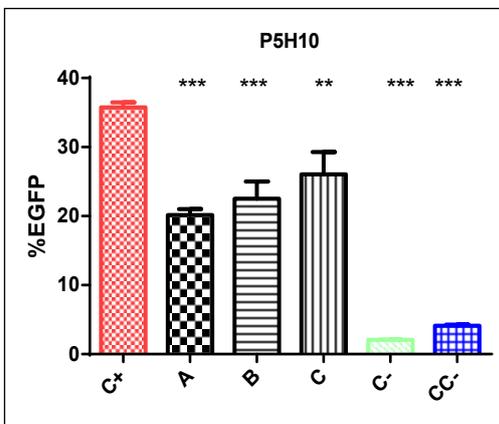
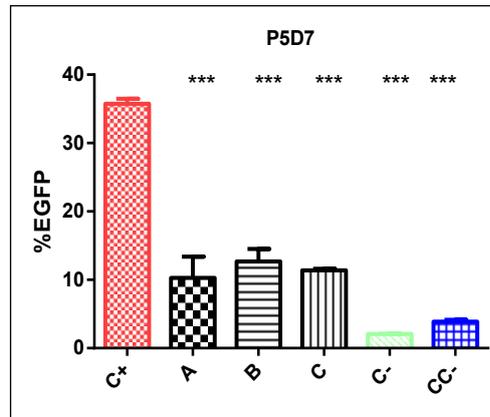
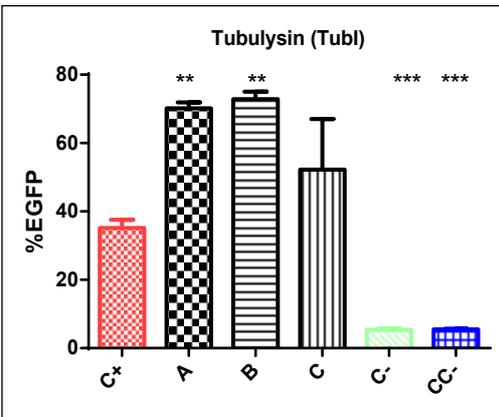
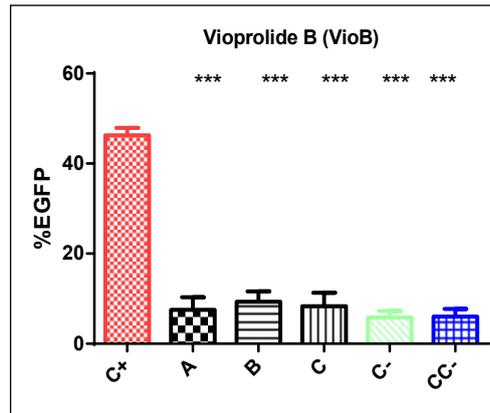
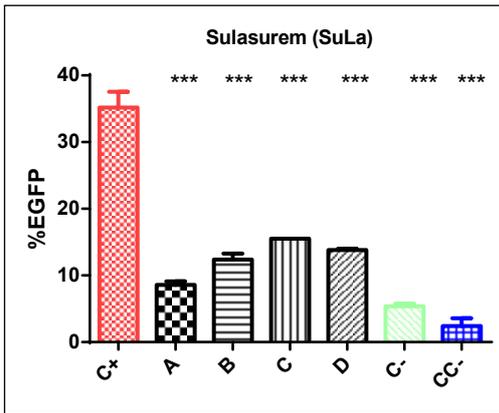
Las condiciones evaluadas se resumen a continuación:

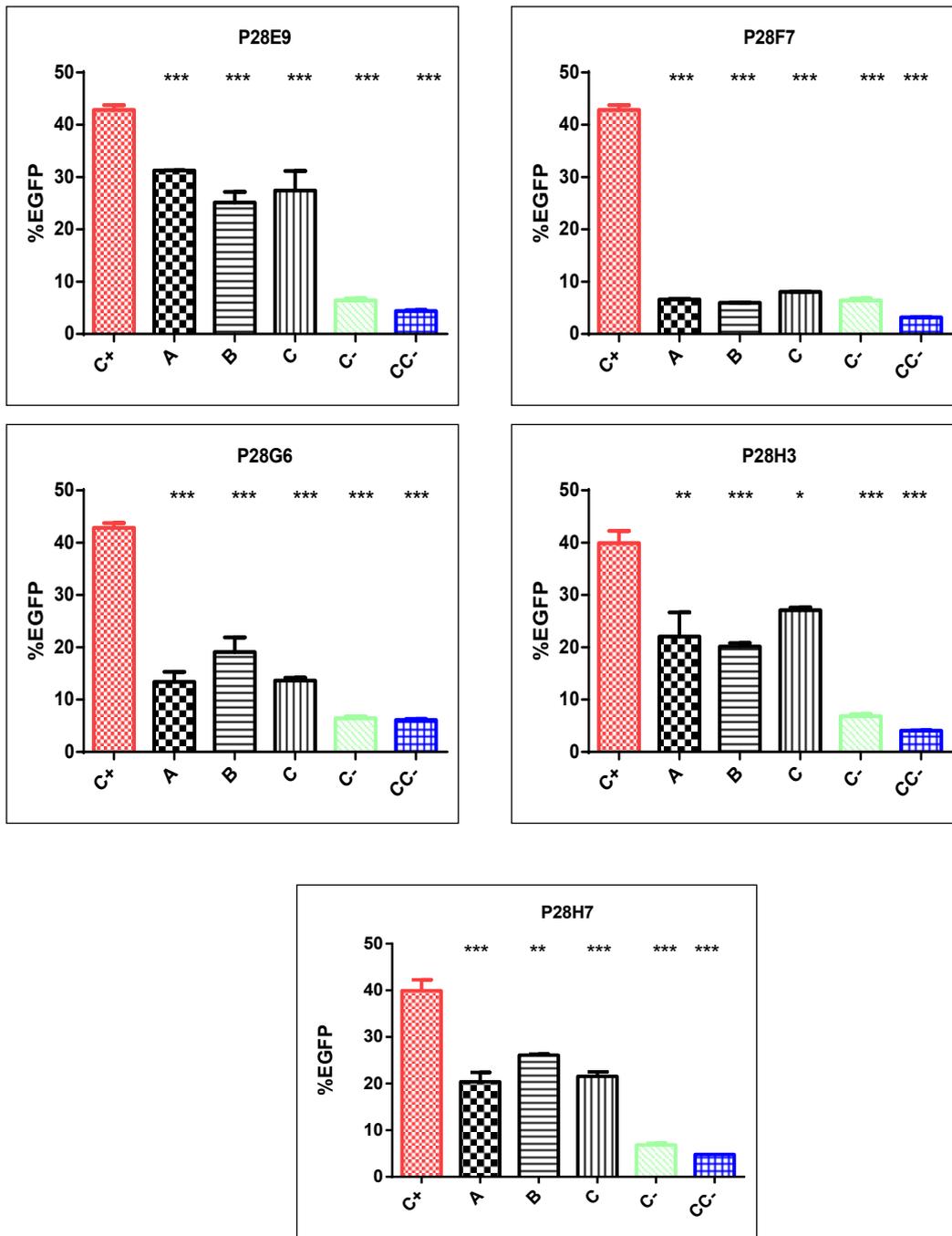
- A- IFN 1 h → + compuesto → se co-incuban por 24 h
- B- IFN 2 h → + compuesto → se co-incuban por 24 h
- C- IFN 3 h → + compuesto → se co-incuban por 24 h

La activación de la vía de acción de los IFNs-I desencadena, inmediatamente, una cascada de fosforilación de proteínas y factores de transcripción, que concluye con la activación de genes de respuesta a IFN en el núcleo celular, como es el caso del promotor Mx2 y, como consecuencia en nuestro sistema reportero, se visualizará mediante la expresión de la proteína reportera EGFP (por ello, se supone que la activación de la vía del IFN ocurre luego de 1 h de incubación de las células con la citoquina). De esta forma, el agregado de los compuestos luego de 1, 2 o 3 h de incubación con el IFN, permitirá evaluar si los mismos son capaces de revertir dicha activación y ejercer su efecto modulador, ya sea potenciador o inhibidor de la respuesta de los IFNs-I.

Los resultados fueron sometidos a un tratamiento estadístico aplicando el *test* de ANOVA, seguido del *test* post-ANOVA de Tukey, empleando el software GraphPad Prism ® 5.01. Los resultados se resumen en la Fig. 43.







**Fig. 43:** Análisis de la capacidad de los compuestos en estudio para revertir la activación de la vía de acción del IFN.

C+: control positivo; C-: control negativo; CC-: control compuesto; A, B, C, D: diferentes condiciones evaluadas.

El estudio del efecto residual de los compuestos seleccionados se realizó mediante el EGR, empleando la línea reportera WISH-Mx2/EGFP, la cual fue inducida con rhIFN-β1a 10 UI/ml y en cada caso correspondiente, el compuesto de interés en su dosis efectiva. Luego del tratamiento de las células reporteras con los compuestos e IFN, se determinó el %EGFP. En el eje de ordenadas se graficó el %EGFP en función de las condiciones ensayadas (eje de abscisas).

\*, \*\*, \*\*\*: indican el grado de significación estadística con relación al control positivo del ensayo, correspondientes a  $p < 0,1$ ;  $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ , respectivamente. Se aplicó el *test* estadístico de ANOVA seguido del *test* post-ANOVA de Tukey.

Al analizar los gráficos de barra, se pudo observar que tanto los compuestos naturales VioB, SuLa, PeLa y GepA, como los compuestos sintéticos P5D7, P5H10, P6C11, P28E1, P28E9, P28F7, P28H7 y P28G6, mostraron la capacidad de revertir la vía de acción del IFN. Dado que todos ellos son inhibidores de la actividad de los IFNs-I, el efecto se manifestó como una reducción en la expresión de la EGFP. En estos compuestos, el efecto fue realmente significativo, manteniendo la magnitud de la inhibición a lo largo de todas las condiciones estudiadas, incluso, cuando los compuestos fueron agregados luego que haya transcurrido 3 h de la incubación con el IFN.

Por su parte, si bien el compuesto TubI no es un inhibidor, sino por el contrario un potenciador de la actividad del IFN, lo que se pretendió evaluar mediante este ensayo no fue la reversión de la actividad del IFN, sino el efecto que se produce al agregar el compuesto posteriormente al agregado del IFN a distintos tiempos. Como puede observarse en las gráficas, parecería que este compuesto incrementa su efecto potenciador de la actividad de los IFNs-I, al ser agregado 1 y 2 h siguiente a la incubación con el IFN.

Los restantes compuestos sintéticos (P28H3 y P6H1) también mostraron capacidad para revertir la activación de la vía de acción del IFN en todas las condiciones estudiadas. No obstante, los resultados fueron variables en cuanto a un mayor o menor efecto, dependiendo del caso estudiado.

Podemos concluir que todos los compuestos estudiados mostraron capacidad para revertir la vía de acción de los IFNs-I, una vez que la misma ha sido iniciada mediante la incubación de las células reporteras con la citoquina en cuestión y como consecuencia de la unión específica del IFN a su receptor en la superficie celular. Este fenómeno es válido para todos los compuestos inhibidores de la actividad de los IFNs-I. Con respecto al compuesto potenciador, pudo corroborarse que el mismo presenta un comportamiento donde exagera el efecto modulador de la actividad de los IFNs, al ser agregado luego de 1-2 h de incubación con la citoquina de interés.

#### **7.5.5. Análisis del comportamiento de los compuestos seleccionados al combinar ambos efectos: residual y reversión de la vía de activación de los IFNs-I**

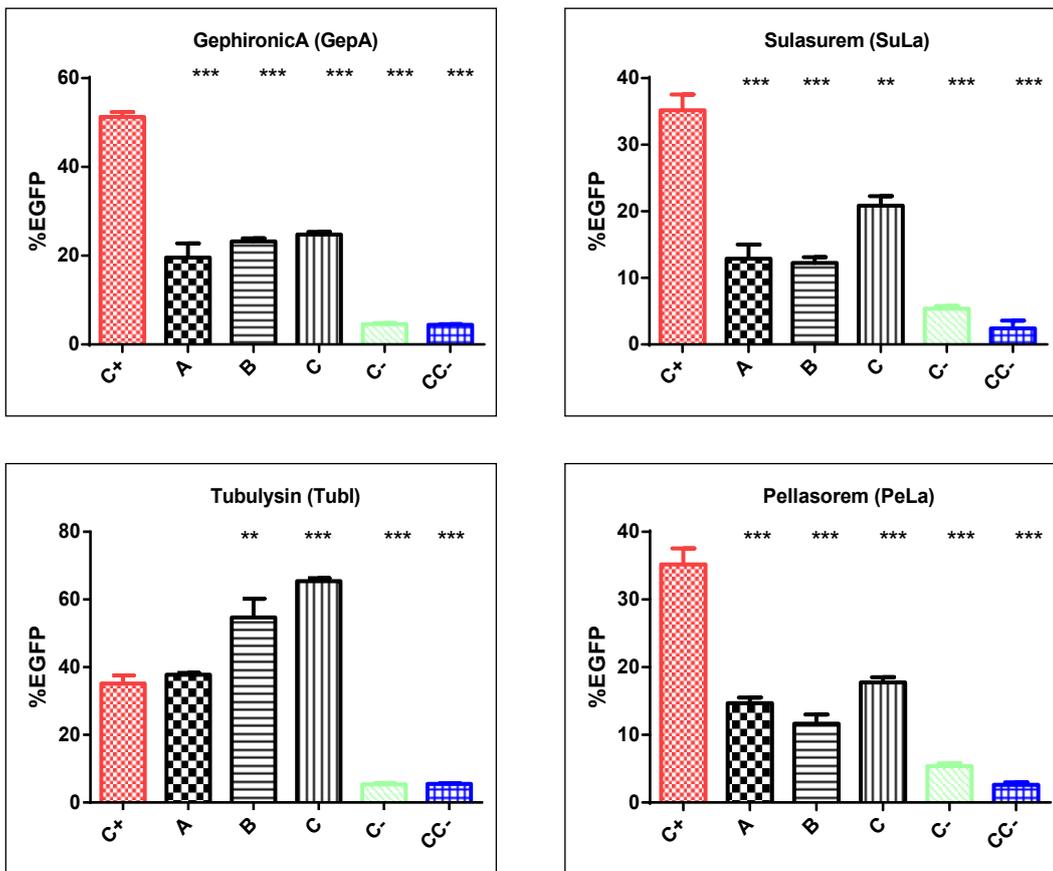
Finalmente, se estudió la combinación de ambos efectos antes mencionado: efecto residual y capacidad para revertir la activación de la vía de acción de los IFNs-I. Para ello, se utilizó el EGR, empleando la línea reportera WISH-Mx2/EGFP, en presencia de rhIFN- $\beta$ 1a 10 UI/ml.

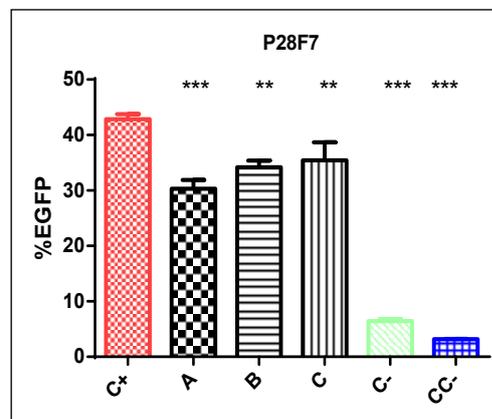
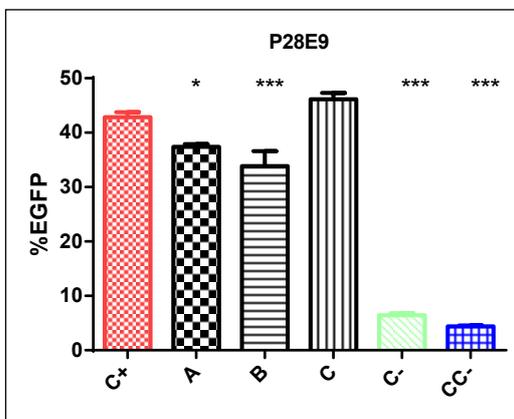
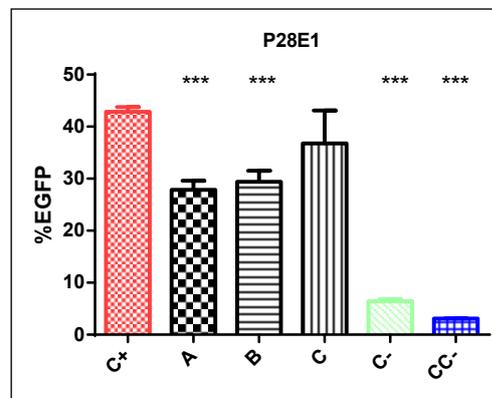
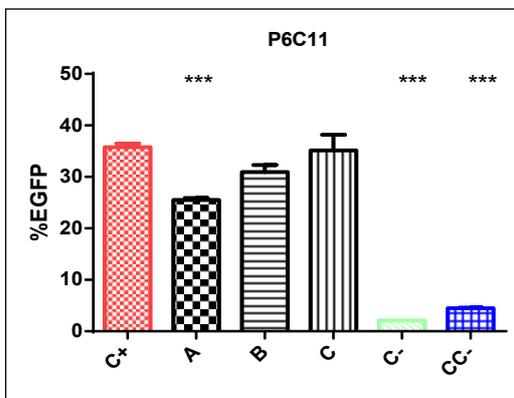
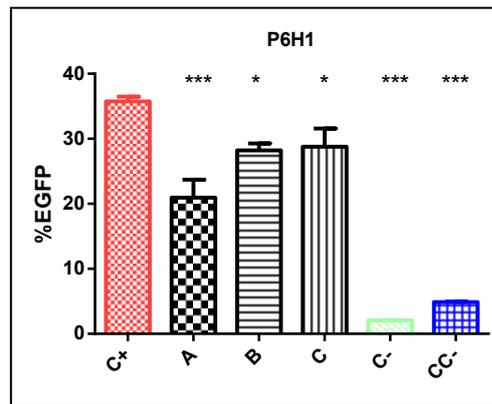
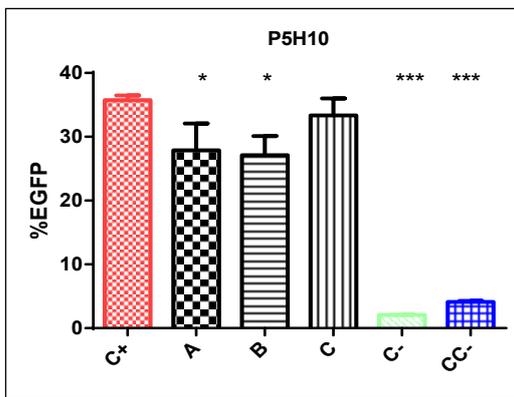
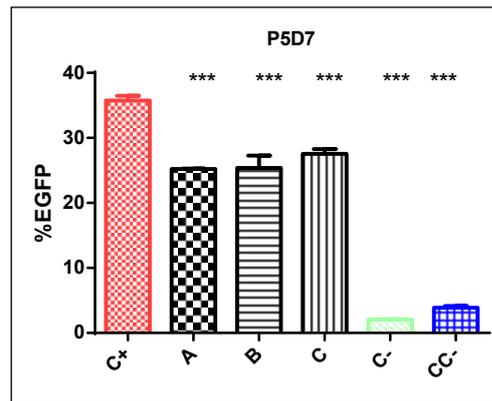
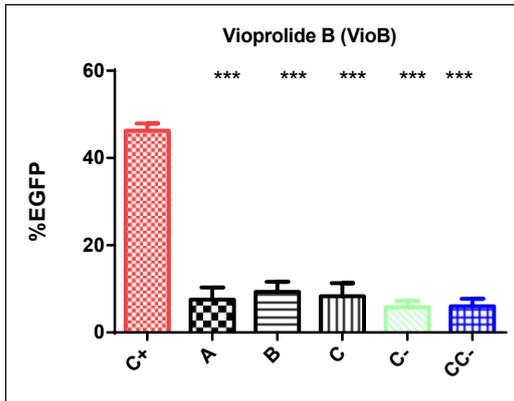
Las condiciones estudiadas se detallan a continuación:

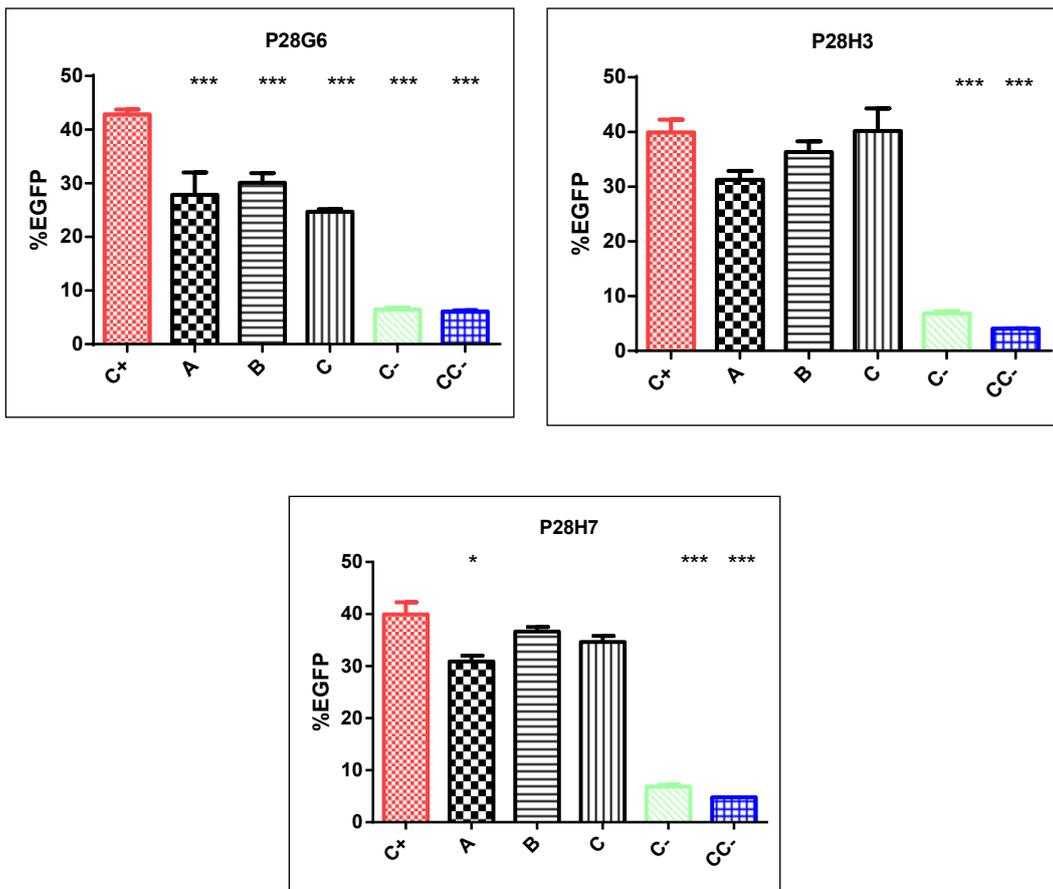
- A- IFN 1 h → se descarta y lava → compuesto 1 h → se descarta y lava → IFN por 24 h
- B- IFN 1 h → se descarta y lava → compuesto 2 h → se descarta y lava → IFN por 24 h
- C- IFN 1 h → se descarta y lava → compuesto 3 h → se descarta y lava → IFN por 24 h

El objetivo de este ensayo consistió en estudiar el comportamiento de los compuestos cuando los mismos son incubados en ausencia de IFN durante 1, 2 o 3 h, luego de que las células fueron tratadas con un pulso de IFN durante 1 h, tiempo suficiente para activar su vía de acción.

Las muestras correspondientes a este ensayo fueron procesadas de la misma forma que en los ensayos previos. Se aplicó el *test* estadístico de Tukey para corroborar si las diferencias que se observaron para cada condición resultaron significativas (Fig. 44).







**Fig. 44:** Análisis de los compuestos en estudio luego de combinar ambos efectos: residual y capacidad para revertir la vía de activación de los IFNs-I.

C+: control positivo; C-: control negativo; CC-: control compuesto; A, B, C, D: diferentes condiciones evaluadas.

El estudio de los efectos combinados de los compuestos seleccionados se realizó mediante el EGR, empleando la línea reportera WISH-Mx2/EGFP, la cual fue inducida con rhIFN-β1a 10 UI/ml y en cada caso correspondiente, el compuesto de interés en su dosis efectiva. Luego del tratamiento de las células reporteras con los compuestos e IFN, se determinó el %EGFP. En el eje de ordenadas se graficó el %EGFP en función de las condiciones ensayadas (eje de abscisas).

\*, \*\*,\*\*\*: indican el grado de significación estadística con relación al control positivo del ensayo, correspondientes a p<0,1; p<0,01 y p<0,001, respectivamente. Se aplicó el test estadístico de ANOVA seguido del test post-ANOVA de Tukey.

Los resultados de estos ensayos fueron muy variables. Algunos compuestos como es el caso de VioB, GepA, P5D7 y P5H10 mostraron una respuesta intermedia a las obtenidas para el estudio de los dos efectos por separado. Es decir, un efecto más marcado al observado para el estudio del efecto residual, pero menos importante que el registrado para el estudio de la reversión de la activación de la vía de señalización del IFN.

Por su parte, los compuestos SuLa, Pella, Tubl, P28E1, P28E9, P28H3 y P28H7, exhibieron un comportamiento similar en todas las situaciones evaluadas. Particularmente, el compuesto P6C11 mostró una tendencia diferente, para la condición A y no así para las restantes.

El compuesto P6H1 demostró un efecto superior al obtenido para el estudio de tales parámetros por separado.

Finalmente, los compuestos P28G6 y P28F7 produjeron un resultado similar al observado en el ensayo de efecto residual.

Todas estas diferencias muestran las particularidades de cada compuesto respecto de la actividad de los IFNs-I, sobre la cual son estudiados. No obstante, todos ellos mostraron un efecto residual y la capacidad para revertir la activación de la vía de señalización del IFN, obviamente, con comportamientos diferenciales, dependiendo de la condición evaluada.

#### **7.5.6. Valoración de la AVA empleando las líneas celulares reporteras para evaluar el efecto de los compuestos seleccionados**

Los IFNs-I presentan actividad antiviral innata, de esta manera, las variantes  $\alpha/\beta$  son producidas directamente en respuesta a una infección viral, promoviendo un ambiente antiviral en las células (Richards y Macdonald, 2011).

Para determinar la mencionada actividad, *in vitro*, se realiza una valoración biológica que mide el grado de resistencia adquirido por las células en cultivo contra la multiplicación viral como consecuencia del tratamiento con IFN.

Es por esto, que uno de los objetivos de la caracterización de los compuestos fue evaluar su efecto sobre la actividad antiviral de los IFNs-I y comprobar, de este modo, si el comportamiento de los compuestos en estudio reproduce lo observado previamente mediante el empleo del EGR.

De esta manera, se desarrollaron ensayos de actividad antiviral, empleando la línea reportera WISH-Mx2/EGFP, como modelo de análisis (siguiendo el protocolo descrito en la sección 16.4.1.6. de Materiales y Métodos).

Las células fueron incubadas con distintas diluciones de rhIFN- $\beta$ 1a en presencia de los compuestos seleccionados. Estos fueron estudiados empleando una concentración constante de los mismos, correspondiente a su dosis efectiva (determinada en la sección 7.5.1). Luego de 6 h de incubación, las células fueron infectadas con el virus VSV. Finalmente, el ensayo se reveló mediante tinción de la monocapa celular viable remanente, con el colorante cristal violeta y posterior lectura espectrofotométrica.

En todos los casos, el ensayo se realizó por duplicado, incluyendo los controles correspondientes: control celular, control de lisis y control de compuesto.

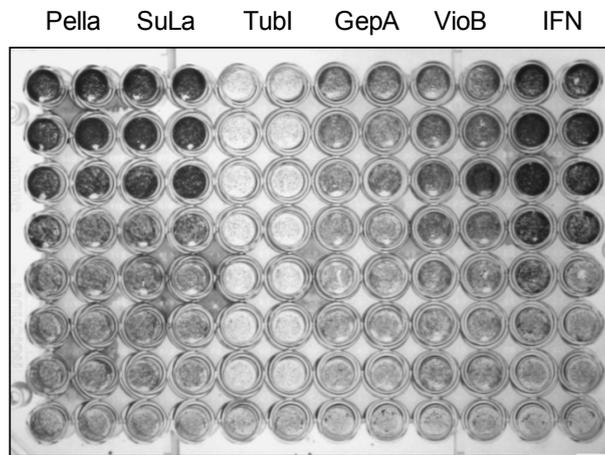
El estudio de los compuestos naturales y sintéticos provenientes de las bibliotecas de Alemania se realizó de forma cualitativa, tomando una fotografía de la placa de análisis luego del revelado con el colorante cristal violeta y comparando visualmente las intensidades de color obtenidas para cada caso. Se procedió de esta manera dado que esta parte del trabajo se realizó en el instituto HZI de Alemania, y el mencionado protocolo es el que ellos emplean habitualmente.

Al comparar la intensidad del color obtenida para las curvas de dosis-respuesta del IFN y de cada uno de los compuestos evaluados en presencia de IFN, se visualizó una respuesta semejante a la del control (sólo IFN) en las células tratadas con los compuestos SuLa y Pella, sin evidenciar marcadas diferencias (Fig. 45).

Ahora bien, al comparar las señales obtenidas en las curvas de los compuestos VioB y GepA con el correspondiente estándar del ensayo, se observó que la intensidad del color fue menor, sugiriendo que los mismos estarían ejerciendo un efecto modulador negativo de la actividad antiviral de los IFNs-I, disminuyendo la protección celular frente a la infección viral.

El compuesto Tubl, demostró un comportamiento particular. En base a la imagen de la placa correspondiente al ensayo AVA, se podría concluir que este compuesto tendría un efecto inhibitor de la potencia del IFN debido a la menor intensidad de color en las curvas de dosis-respuesta de las células tratadas con IFN y Tubl, comparado con la curva control. Sin embargo, este compuesto fue catalogado como potenciador de la actividad del IFN mediante su evaluación por EGR. No obstante, resulta adecuado mencionar, que previo al revelado del ensayo, las células se observaron al microscopio óptico, comprobándose que aquéllas tratadas con dicho compuesto se encontraban viables, pero con una morfología diferente; similar a la de células en suspensión y no con la morfología característica de las células en adherencia. Esta observación, conjuntamente con conocimientos previos del compuesto aportados por el grupo de trabajo del HZI, permitieron suponer que el Tubl estaría actuando sobre las moléculas de adhesión de las células impidiendo su adherencia. El diseño de los ensayos AVAs es inviable para determinar la actividad antiviral de los IFNs empleando células en suspensión o, como es el caso particular de las células tratadas con Tubl, que han sufrido alguna modificación sobre su propiedad de adherencia. Esto se debe a que el revelado del ensayo se basa en la tinción con el colorante cristal violeta de las células que permanecen adheridas luego de la infección viral. Previo a este paso de tinción, el sobrenadante es removido, con el cual se eliminan también las células no adheridas al

sustrato. Por este motivo, se realizaron otros estudios que permitieron caracterizar al compuesto Tubl y que se describirán más adelante.



**Fig. 45:** Efecto de los compuestos naturales sobre la actividad antiviral del rhIFN-β1a. Las células WISH-Mx2/EGFP fueron incubadas con rhIFN-β1a en presencia de los compuestos naturales anteriormente seleccionados. Para ello, fueron empleados en sus correspondientes dosis efectivas. Luego de 6 h las células fueron infectadas con el virus VSV. Al cabo de 18 h, se determinó la actividad antiviral mediante tinción de la monocapa viable remanente con el colorante cristal violeta y posterior visualización.

Las Tablas XXVII, XXVIII y XXIX muestran los resultados obtenidos luego de la evaluación del efecto de los compuestos seleccionados, sobre la actividad antiviral de los IFNs-I.

**Tabla XXVII:** Efecto de los compuestos naturales sobre la actividad de los IFNs-I evaluada mediante ensayo AVA.

Compuestos naturales					
Compuesto	Vio B	Tub I	Pella	SuLa	Gep A
Efecto sobre AVA	↓	NE	SES	SES	↓

SES: Sin efecto significativo, no evidenciaron diferencias con respecto al control del ensayo.  
 NE: no estudiado por alteraciones evidenciadas en el ensayo.

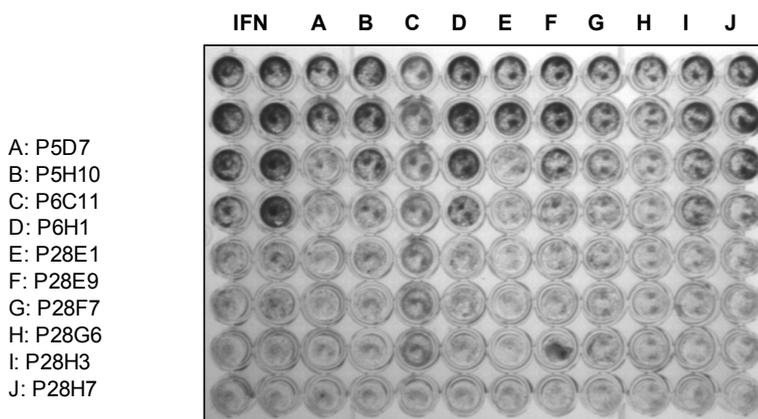
Del análisis de los compuestos sintéticos provenientes de la biblioteca provista por el HZI (Alemania) se pudo concluir que los compuestos P5H10, P6H1, P28E9, P28H3 y P28H7 no mostraron un efecto significativo diferencial sobre la actividad antiviral del IFN.

**Tabla XXVIII:** Efecto de los compuestos sintéticos sobre la actividad de los IFNs-I evaluada mediante ensayo AVA.

Compuestos sintéticos										
Compuesto	P5D7	P5H10	P6C11	P6H1	P28E1	P28E9	P28F7	P28G6	P28H3	P28H7
Efecto sobre AVA	↓	SES	↓	SES	↓	SES	↓	↓	SES	SES

SES: Sin efecto significativo: no evidenciaron diferencias respecto del control del ensayo.

Por su parte, los compuestos P5D7, P6C11, P28E1, P28F7 y P28G6 demostraron un efecto inhibitor de la potencia del IFN, confirmando el comportamiento previamente observado mediante el ensayo de gen reportero. Este efecto pudo visualizarse mediante una disminución en la protección celular, contra la infección viral en aquellas células que fueron tratadas con IFN y compuesto, y luego infectadas con el virus, en relación a las células tratadas únicamente con IFN e infectadas (Fig. 46).



**Fig. 46:** Efecto de los compuestos sintéticos sobre la actividad antiviral del rhIFN-β1a. Las células WISH-Mx2/EGFP fueron incubadas con rhIFN-β1a en presencia de los compuestos sintéticos anteriormente seleccionados. Para ello, se emplearon en sus correspondientes dosis efectivas. Luego de 6 h las células fueron infectadas con el virus VSV. Al cabo de 18 h, se determinó la actividad antiviral mediante tinción de la monocapa viable remanente con el colorante cristal violeta y posterior visualización.

Por otro lado, el análisis de los compuestos seleccionados a partir de la biblioteca QuiMed-FCien se realizó empleando el mismo protocolo de ensayo, pero cuantificando, finalmente, el valor de absorbancia para cada una de las condiciones estudiadas. Luego del procesamiento de los datos correspondientes a las curvas de dosis-respuesta, se construyó la Tabla XXIX donde se resume el efecto de cada uno de los compuestos estudiados sobre la actividad antiviral del IFN. Como se explicó

previamente, el efecto de los compuestos naturales y sintéticos provenientes de las bibliotecas HZI Nat y HZI Sint sobre la actividad biológica de los IFNs-I se realizó empleando únicamente la línea celular WISH-Mx2/EGFP en presencia de rhIFN- $\beta$ 1a, dado que este grupo de compuestos mostró un comportamiento congruente sobre todas las líneas reporteras analizadas y sobre todos los subtipos de IFNs-I. Sin embargo, no se observó el mismo comportamiento para los compuestos seleccionados a partir de la biblioteca sintética QuiMed- FCien. Por el contrario, cada compuesto mostró un comportamiento diferente de acuerdo con el IFN y la línea celular reportera en estudio. Es por ello que se seleccionó un número superior de compuestos a partir de esta biblioteca para su caracterización. De esta manera, el análisis del efecto de los compuestos sobre la actividad antiviral de los IFNs-I del mencionado origen, se realizó empleando las cuatro líneas reporteras en presencia de ambos IFNs-I (Tabla XXIX).

A partir de la actividad antiviral obtenida para cada condición, se calculó una relación ( $N$ ), que corresponde al cociente entre la actividad antiviral obtenida en presencia de los compuestos e IFN con respecto a la actividad antiviral obtenida empleando sólo la citoquina. Es decir, dicha relación representa el incremento o disminución de la actividad antiviral de los rhIFNs-I en presencia de cada compuesto. En la Tabla XXIX se resumen los resultados, indicando con una flecha, si esa relación incrementa ( $\uparrow$ ) o disminuye ( $\downarrow$ ) la AVA del IFN; o bien, si no demuestra diferencias significativas (SES).

Tales compuestos manifiestan comportamientos diferenciales dependiendo de la línea celular en estudio y del subtipo de IFN analizado. Como ejemplo, puede citarse al compuesto FV10, el cual no demostró efecto alguno sobre las líneas A549 ni HEP2 en presencia de ambos IFNs. Sin embargo, la línea HeLa exhibió incremento de la respuesta antiviral en presencia de ambos subtipos de IFNs. Asimismo, en el caso particular de la línea WISH en presencia de rhIFN- $\alpha$ 2a, demostró disminución de la actividad antiviral de la citoquina en estudio. Otro ejemplo para citar es el análisis del compuesto PHD101, el cual demostró un incremento de la actividad antiviral de ambos IFNs al ser evaluado sobre la línea HeLa, mientras que exhibió el efecto opuesto sobre las líneas HEP2 y WISH en presencia de ambos IFNs. Sin embargo, ningún efecto sobre la línea A549 fue observado en presencia de tal compuesto. Finalmente, se analizó el compuesto FII, el cual demostró sólo efecto inhibitor de la actividad antiviral sobre la línea WISH, destacándose que ese efecto resultó dependiente del subtipo de IFN analizado.

En general puede concluirse que los efectos desarrollados por los compuestos de esta biblioteca varían en función de línea celular y la variante de IFN empleado, por lo que deben ser estudiados junto a otros parámetros para confirmar su real accionar.

**Tabla XXIX:** Efecto de los compuestos sintéticos derivados de la biblioteca QuiMed-FCien sobre la actividad de los IFNs-I evaluada mediante ensayo AVA.

	rhIFN- $\beta$ 1a				rhIFN- $\alpha$ 2a			
	Parámetro $N'$							
	A549 L2G9	HeLa C6C3	HEp2 L1G5	WISH L1G3	A549 L2G9	HeLa C6C3	HEp2 L1G5	WISH L1G3
F13		0,58 (↓)	0 (↓)	0,77 (↓)		1,20 (↑)	0,01 (↓)	0,12 (↓)
PHD81			0,14 (↓)	0,78 (↓)			0,40 (↓)	0,37 (↓)
PHD100		0,64 (↓)		1 (SES)			0,14 (↓)	0,24 (↓)
PHD101		1,43 (↑)	0,53(↓)	0,86 (↓)		1,13 (↑)	0,27 (↓)	0,54 (↓)
FVII		0,73 (↓)	1,45 (↑)	0,87 (↓)		0,22 (↓)	0,97 (↓)	0,11 (↓)
PHD111		1,59 (↑)				1,71 (↑)		0,39 (↓)
PHD121		1,11 (↑)						
PHD122	0 (↓)	0,74 (↓)		0,23 (↓)	0 (↓)		0 (↓)	0 (↓)
CH14BEN		0,86 (↓)	0,05 (↓)			0,26 (↓)		0,14 (↓)
FV4Br		0,83 (↓)				0,56 (↓)		0,70 (↓)
FV17		1,23 (↑)	0,80 (↓)	0,84 (↓)		1 (SES)		0,59 (↓)
CH4Br		1,09 (↑)				0,84 (↓)		
FV18						0,55 (↓)		1,09 (↑)
FV10		1,17 (↑)				1,93 (↑)		0,38 (↓)
FII				0,87(↓)				0,03 (↓)
DU1		0,49(↓)						

N\*: Cociente entre el AVA en presencia de un dado compuesto e IFN y el AVA sólo en presencia de IFN.

(↓), (↑), (SES) representan la disminución, incremento o ausencia de efecto significativo de la respuesta de IFN, todos en presencia de compuesto.

### 7.5.7. Análisis del efecto de los compuestos sobre la actividad antiproliferativa (AA) de los IFNs-I

Los IFNs-I se caracterizan, además, por exhibir actividad antiproliferativa. Los estudios de Kataoka en 1982, concluyeron que la actividad antiproliferativa de los IFNs- $\alpha$  y - $\beta$  varía marcadamente dependiendo del tipo celular humano, siendo más sensible la respuesta por parte de las células Daudi. Por lo recientemente expuesto, la actividad antiproliferativa de los IFNs es determinada mediante un bioensayo que mide la acción antiproliferativa de los mismos sobre las células Daudi. De esta manera, las células son expuestas a diferentes potencias de IFN e incubadas por un período de tiempo, generalmente 96 h, para luego determinar el grado de inhibición de su proliferación. Para cuantificar la inhibición del crecimiento celular se evalúa la presencia de enzimas deshidrogenasas, indicadoras de células metabólicamente activas, que mediante el par redox constituido por los reactivos MTS/PMS catalizan la biorreducción

del primero en un cromógeno soluble (azul de formazán) que absorbe a una  $\lambda=490$  nm. La cantidad de producto generado es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas, equivalente a células viables en el cultivo. De la misma manera que se estudió el efecto de los compuestos sobre la actividad antiviral de los IFNs, se evaluó también el efecto de los compuestos sobre la actividad antiproliferativa de los IFNs-I. Este análisis se realizó siguiendo las indicaciones establecidas en la sección 16.4.1.7. de Materiales y Métodos.

Para estudiar los compuestos provenientes de las bibliotecas HZI Nat y HZI Sint se utilizó la línea reportera WISH-Mx2/EGFP en presencia de los rhIFN- $\beta$ 1a o rhIFN- $\alpha$ 2a; mientras que para los compuestos seleccionados a partir de la biblioteca de compuestos QuiMed-FCien, el ensayo se realizó con todas las líneas reporteras en presencia de cada IFN según la condición correspondiente a cada compuesto.

Previamente se optimizó el ensayo evaluando el rango de potencias de cada IFN necesaria para obtener las correspondientes curvas de dosis-respuesta. Asimismo, se optimizó la densidad celular necesaria para llevar a cabo el ensayo y el tiempo adecuado de incubación con los reactivos para el revelado de la actividad de las enzimas deshidrogenasas (Tabla XXX). En todos los casos, se obtuvieron curvas dosis-respuesta con mayores pendientes al revelar el ensayo luego de 3 h de incubación con los reactivos correspondientes.

**Tabla XXX:** Optimización del ensayo de actividad antiproliferativa para los IFNs-I empleando las líneas reporteras Mx2/EGFP.

Línea celular	Densidad celular (cél/ml)		Rango de potencias (UI/ml)	
	rhIFN- $\beta$ 1a	rhIFN- $\alpha$ 2a	rhIFN- $\beta$ 1a	rhIFN- $\alpha$ 2a
HeLa-Mx2/EGFP	$1,25 \times 10^4$	$1,25 \times 10^4$	$3,9 \times 10^1 - 1,2 \times 10^3$	$3,9 \times 10^1 - 1,2 \times 10^3$
WISH-Mx2/EGFP	$1,25 \times 10^4$	$1,25 \times 10^4$	$0,9 \times 10^1 - 3,0 \times 10^2$	$9,4 \times 10^1 - 3,0 \times 10^3$
A549-Mx2/EGFP	$5 \times 10^4$	$5 \times 10^4$	$1,6 \times 10^2 - 5,0 \times 10^3$	$1,6 \times 10^2 - 5,0 \times 10^3$
HEp2-Mx2/EGFP	$1,25 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	$1,6 \times 10^2 - 5,0 \times 10^3$	$1,6 \times 10^2 - 5,0 \times 10^3$

Teniendo en cuenta las densidades celulares y potencias señaladas en la Tabla XXX se analizó el efecto de los compuestos seleccionados. Los mismos fueron evaluados empleando su dosis efectiva, pero manteniendo la misma proporción de compuesto por célula empleada en los ensayos previos. Se incluyeron controles celulares de crecimiento para el ensayo, los cuales fueron evaluados por triplicado.

Se determinó la AA en presencia de los compuestos e IFN con respecto a la AA obtenida empleando sólo la citoquina, y se calculó un valor  $N$ , el cual representa la relación entre la AA de la muestra y la AA del estándar. Este valor  $N$  determina el grado de incremento o disminución de la AA de IFN, como resultado del tratamiento con cada compuesto. Asimismo, se indica con una flecha el efecto ejercido por el compuesto

sobre la AA del IFN. Aquellos casos señalados con (SES) indican que la respuesta obtenida fue semejante a la del control, sin observarse diferencias significativas.

Las Tablas XXXI, XXXII y XXXIII resumen los valores y efectos obtenidos para cada caso estudiado.

**Tabla XXXI:** Evaluación del efecto de los compuestos naturales sobre la AA de los rhIFNs-I.

	WISH-Mx2/EGFP	
	Parámetro $N^*$	
	rhIFN- $\beta$ 1a	rhIFN- $\alpha$ 2a
<i>VioB</i>	0,64 (↓)	0,58 (↓)
<i>Tubl</i>	1,38 (↑)	1,04 (SES)
<i>GepA</i>	0,99 (SES)	0,90 (↓)
<i>Sula</i>	1,00 (SES)	0,94 (SES)
<i>Pella</i>	0,55 (↓)	1,00 (SES)

\*N: Cociente entre el AA en presencia de un dado compuesto e IFN y el AA sólo en presencia de IFN.

(↓), (↑), (SES) representan la disminución, incremento o ausencia de efecto significativo de la respuesta del IFN, todos en presencia de compuesto.

Los compuestos naturales mostraron efectos variados en cuanto a la actividad antiproliferativa de los rhIFN-I.

Dado que los IFNs tienen la capacidad para inhibir la proliferación celular, un incremento de su actividad se refleja en una disminución de la proliferación del cultivo celular estudiado, y contrariamente, la disminución de su actividad, se evidencia mediante una proliferación celular superior a la obtenida en el cultivo celular tratado únicamente con el IFN correspondiente. Así, pudo visualizarse un incremento de la proliferación celular sobre aquellas células incubadas con el compuesto *VioB* en presencia de ambos IFNs. El compuesto *GepA* no mostró una disminución significativa de la AA de los rhIFN y, además, teniendo en cuenta el rango de error propio del ensayo (10-20%), podría decirse que el mismo no presenta un efecto significativo sobre la AA de las citoquinas. El compuesto *Pella*, exhibió una disminución de la AA del IFN- $\beta$ 1a. Sin embargo, no mostró un efecto significativo sobre la AA del IFN- $\alpha$ 2a. En el caso particular del compuesto *Sula* no se observaron diferencias con respecto a ninguno de las citoquinas evaluadas. Finalmente, se dilucidó una disminución en la proliferación celular de aquellas células incubadas con *Tubl* e IFN- $\alpha$ 2a, lo que se traduce en un aumento de la AA de esta citoquina. Sin embargo, no se observó ningún efecto diferencial respecto del control, para las células tratadas con el mismo compuesto en presencia de IFN- $\beta$ 1a.

Casi la totalidad de los compuestos sintéticos de la biblioteca del HZI no demostraron un efecto contundente sobre la AA de los IFNs estudiados. Sólo el

compuesto P28H3 exhibió una disminución de la AA de los rhIFN-β1a y rhIFN-α2a. Por su parte, el compuesto P6C11 presentó un efecto inhibitor de la AA del rhIFN-α2a.

**Tabla XXXII:** Evaluación del efecto de los compuestos sintéticos del HZI sobre la AA de los rhIFNs-I.

	WISH-Mx2/EGFP	
	Parámetro N <sup>*</sup>	
	rhIFN-β1a	rhIFN-α2a
P5D7	1,09 (SES)	1,05 (SES)
P5H10	1,09 (SES)	0,95 (SES)
P6C11	0,96 (SES)	0,85 (↓)
P6H1	1,05 (SES)	0,97 (SES)
P28E1	1,09 (SES)	0,90 (SES)
P28E9	1,01 (SES)	0,98 (SES)
P28F7	0,96 (SES)	0,98 (SES)
P28G6	0,98 (SES)	0,91 (SES)
P28H3	0,89 (↓)	0,88 (↓)
P28H7	1,10 (SES)	1,08 (SES)

\*N: Cociente entre el AA en presencia de un dado compuesto e IFN y el AA sólo en presencia de IFN.

(↓), (↑), (SES) representan la disminución, incremento o ausencia de efecto significativo de la respuesta del IFN, todos en presencia de compuesto.

**Tabla XXXIII:** Evaluación del efecto de los compuestos sintéticos QuiMed-FCien sobre la AA de los rhIFNs-I.

	rhIFN-β1a				rhIFN-α2a			
	Parámetro N <sup>*</sup>							
	A549 L2G9	HeLa C6C3	HEp2 L1G5	WISH L1G3	A549 L2G9	HeLa C6C3	HEp2 L1G5	WISH L1G3
F13		0,87(↓)	1,20(↑)	1,00 (SES)		0,97 (SES)	1,05 (SES)	1,02 (SES)
PHD81			0,89(↓)	1,05 (SES)			0,98(SES)	1,00 (SES)
PHD100		0,90(↓)		1,00 (SES)			1,04 (SES)	0,93 (↓)
PHD101		0,93 (↓)	0,78(↓)	1,04 (SES)		1,01 (SES)	0,89(↓)	1,00 (SES)
FVII		0,74(↓)	0,86(↓)	0,95(↓)		0,75(↓)	0,84(↓)	0,91(↓)
PHD111		0,83(↓)				0,93 (↓)		1,01 (SES)
PHD121		0,93 (↓)						
PHD122	0,93 (↓)	0,93 (↓)	0,93 (↓)	1,00 (SES)	0,86(↓)		1,20 (↑)	1,03 (SES)
CH14BEN		0,91(↓)	0,85(↓)			1,03 (SES)		0,61(↓)
FV4Br		0,78(↓)				0,83(↓)		0,98 (SES)
FV17		0,70(↓)	0,77(↓)	1,01 (SES)		0,78(↓)		1,01 (SES)
CH4Br		0,95 (SES)				0,95 (SES)		
FV18						0,87(↓)		0,94 (↓)
FV10		0,88(↓)				0,88(↓)		1,03 (SES)
FII				1,02 (SES)				0,97 (SES)
DU1		0,91(↓)						

\*N: Cociente entre el AA en presencia de un dado compuesto e IFN y el AA sólo en presencia de IFN.

(↓), (↑), (SES) representan la disminución, incremento o ausencia de efecto significativo de la respuesta del IFN, todos en presencia de compuesto.

En cuanto al análisis de los compuestos sintéticos provenientes de la biblioteca QuiMed-FCien nuevamente se obtuvieron resultados muy variables, dependiendo de la línea celular empleada y el IFN-I analizado. Casi la totalidad de los compuestos evaluados con la línea reportera HeLa-Mx2/EGFP en presencia de rhIFN- $\beta$ 1a, mostraron un leve incremento de la proliferación celular, traducido como una disminución de la AA de la citoquina en cuestión. Sin embargo, ese efecto fue mínimo, e incluso casi despreciable en algunos casos. Un comportamiento similar se obtuvo para los compuestos evaluados mediante esta misma línea pero en presencia de rhIFN- $\alpha$ 2a.

Por su parte, la mayoría de los compuestos evaluados sobre la línea reportera WISH-Mx2/EGFP no mostraron una diferencia significativa en la proliferación celular respecto de los controles correspondientes; sólo alguno de los compuestos reflejó una disminución de la AA de los IFNs estudiados, pero nuevamente, ese efecto fue mínimo.

En el caso de los compuestos analizados sobre la línea HEp2 reportera, en presencia del rhIFN- $\beta$ 1a, también se observó un efecto inhibitor de la AA de la citoquina. Sin embargo, esa disminución de la actividad del IFN reflejado en un incremento de la proliferación celular fue mínima. Y para el caso de estudio del rhIFN- $\alpha$ 2a, prácticamente no se evidenciaron diferencias significativas.

Finalmente, el compuesto PHD122, el único evaluado sobre la línea A549-Mx2/EGFP en presencia de ambos IFNs-I, mostró un incremento en el crecimiento celular con respecto al control correspondiente, visualizándose una disminución de la AA de ambos IFNs.

En general, no se han obtenido grandes variaciones sobre la AA de los rhIFNs- $\beta$ 1a y rhIFN- $\alpha$ 2a, en ninguna de los grupos de compuestos seleccionados a partir de las distintas bibliotecas de origen natural y sintética.

Por otra parte, cabe destacar que si bien los compuestos seleccionados son todos inhibidores de la respuesta de ambos IFNs, se ha observado, en algunos casos particulares, un comportamiento opuesto al visualizado previamente, mediante EGR. Estas diferencias podrían explicarse postulando aspectos particulares. Por un lado, la sensibilidad de los sistemas para poder detectar el efecto modulador de cada compuesto sobre la potencia de las citoquinas evaluadas y, por otro lado, un efecto diferencial del compuesto sobre cada una de las actividades del IFN; es decir, que el mismo actúe modulando particularmente una u otra vía de acción del IFN para desempeñar su rol antiviral, antiproliferativo o la vía que regula la expresión de EGFP en el EGR.

### 7.5.8. Estudio de las fases del ciclo celular de células WISH-Mx2/EGFP y HeLa-Mx2/EGFP tratadas con los compuestos seleccionados de las bibliotecas de compuestos naturales y sintéticos

La medida del contenido de ADN en células individuales brinda información acerca de la ploidía de una población celular, siendo esto de singular importancia en estudios de distribución en las diferentes fases del ciclo celular. Así, por ejemplo, para estudiar el efecto sobre las fases del ciclo celular de una determinada molécula o fármaco, se puede emplear una línea celular establecida y cuantificar el impacto de ésta sobre las fases del ciclo.

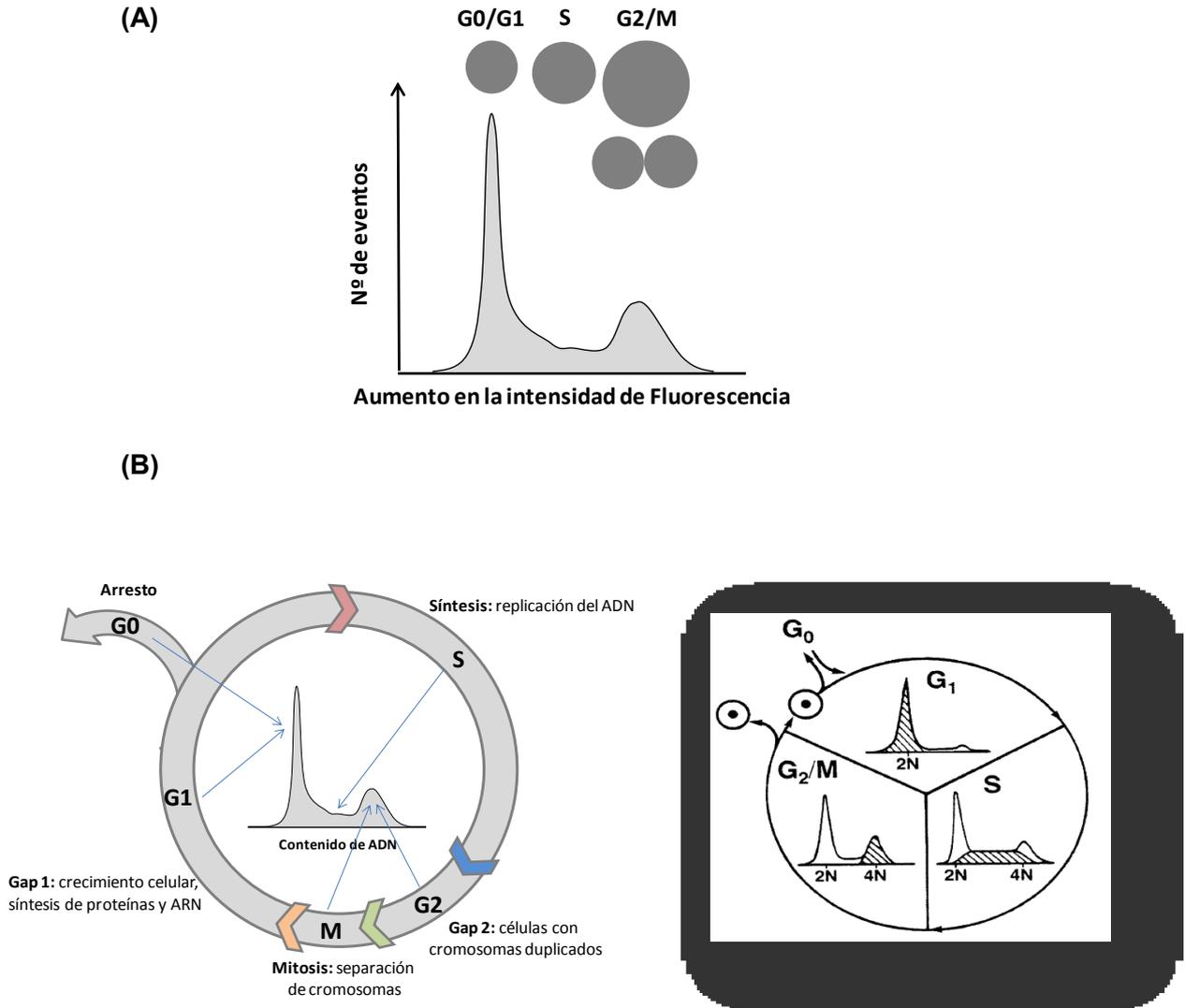
Por otro lado, la posibilidad que brinda la citometría de flujo de realizar mediciones en forma cuantitativa y en corto tiempo ha permitido la identificación/cuantificación de la distribución de una población celular durante las fases del ciclo celular: G1, S y G2/M (Fig. 47). Particularmente las fases G2 y M, no pueden ser discriminadas en este tipo de análisis dado que presentan el mismo contenido de ADN. Una consideración importante al momento de realizar el análisis del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular es que deben excluirse del análisis los agregados y dobletes celulares. Por ejemplo, un doblete de células que se encuentran en la fase G1 del ciclo, puede ser registrado por el citómetro como una célula con el contenido de ADN semejante al de la fase G2/M (Fig. 47). En la actualidad, la mayoría de los citómetros presentan un módulo que permite discriminar los dobletes basado en el análisis del ancho del pulso de los datos adquiridos, en este caso el ancho de pulso de la fluorescencia proveniente del IP.

Las células que no se encuentran en división presentan un contenido normal de ADN y se ubican en la fase G1 (del inglés *Gap 1*), y es durante la cual sintetizan proteínas y diversas moléculas necesarias para la etapa posterior de síntesis (fase S). En esta fase, las células inician la proliferación, replicando el ADN y finalmente, en la fase G2 es durante la cual la célula repara los errores del ADN duplicado para luego, en la mitosis (fase M), segregar el ADN duplicado en dos células hijas (Rabinovich, 1994).

La forma habitual de representar los datos del análisis de la distribución en las fases del ciclo celular es un histograma, donde se visualiza un primer pico angosto y pronunciado correspondiente a la fase G1. Esta es la más predominante ya que representa a las células que no están en división. La fase G2 puede visualizarse como un pico más pequeño con un valor del contenido de ADN equivalente al doble del obtenido para el pico G1. Entre ambos picos se observa la fase S, donde se produce netamente la síntesis del ADN (Fig. 47).

Para la mayoría de las líneas celulares se estima que las mismas permanecen aproximadamente 12 h en la fase G1, 6 h en la fase S, 4 h en fase G2 y 0,5 h en fase M.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de los compuestos seleccionados, ya sea sólo o en presencia de IFN, sobre la distribución de las fases del ciclo celular en las células WISH-Mx2/EGFP y HeLa-Mx2/EGFP.



**Fig. 47:** Representación de las fases del ciclo celular. Ejemplo de histogramas con las diferentes fases, las cuales se correlacionan con un aumento de la intensidad de fluorescencia debido al contenido de ADN (A) y con los procesos celulares que ocurren en cada etapa (B).

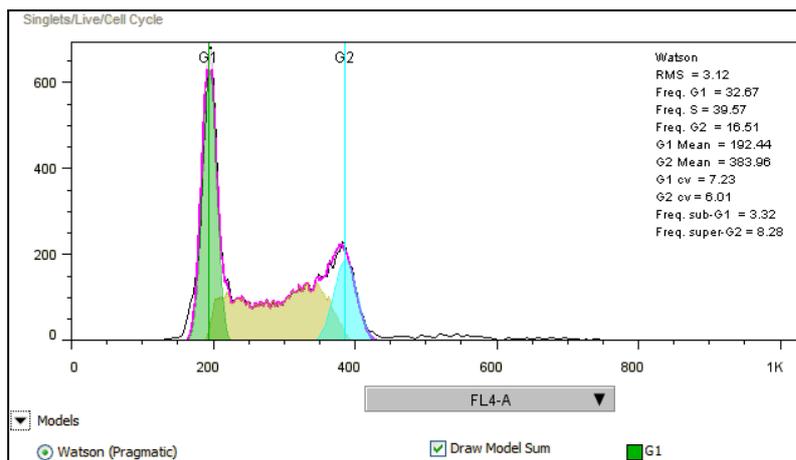
Los compuestos seleccionados fueron evaluados en presencia y ausencia de ambos rhIFNs- $\beta$ 1a y rhIFNs- $\alpha$ 2a, sobre la línea reportera WISH-Mx2/EGFP para el caso de las moléculas provenientes de las bibliotecas cedidas por el grupo de trabajo del HZI, (Alemania), mientras que se utilizaron las líneas WISH-Mx2/EGFP y HeLa-Mx2/EGFP para las moléculas sintéticas provenientes de la biblioteca de Uruguay. Esta diferencia

se debe fundamentalmente a que los primeros mostraron un efecto semejante sobre todas las líneas reporteras ensayadas y en presencia de ambos IFNs-I, mientras que el segundo grupo evidenció un comportamiento diferente según el IFN estudiado y la línea reportera empleada. De esta manera, para esta última situación se seleccionó una línea celular normal, WISH-Mx2/EGFP, y una línea tumoral, HeLa-Mx2/EGFP.

El ensayo se ejecutó siguiendo el protocolo detallado en la sección 16.4.1.8. de Materiales y Métodos. Este estudio se realizó utilizando potencias de rhIFNs constantes: 20 UI/ml para rhIFN- $\beta$ 1a y 60 UI/ml para rhIFN- $\alpha$ 2a. Por su parte, cada uno de los compuestos fue analizado en la concentración correspondiente a su dosis efectiva.

Una vez que las muestras fueron preparadas, cada una de ellas fue analizada mediante citometría de flujo. Previo a la adquisición de los datos, se realizaron los ajustes pertinentes del equipo empleando las células sin tratamiento como control. Se adquirieron un total de 10.000 eventos para cada condición analizada. Los datos colectados fueron procesados utilizando el *software* FlowJo®. Éste permite realizar análisis de datos citométricos, y cuenta con una aplicación específica para ciclo celular, posibilitando la exclusión de los dobletes y la aplicación de modelos matemáticos estadísticos apropiados para asegurar que las muestras se ajusten al modelo elegido de ciclo celular. Finalmente, se calcula el porcentaje de células que están presentes en cada fase del ciclo celular. Para este análisis se aplicó el modelo de Watson (Pragmático). De esta manera, se obtiene para cada muestra analizada un perfil semejante al de la Fig. 48. Los porcentajes obtenidos para cada fase del ciclo celular, según la condición estudiada, se compararon con los valores controles, mediante la aplicación de tratamiento estadístico utilizando el programa GraphPad Prism 6 Demo. Se utilizó un *test* ANOVA comparando cada una de las muestras entre sí y con los controles del ensayo para evaluar la existencia de diferencia significativa entre cada caso estudiado. Se aplicó el *test* de Bonferroni, que es un procedimiento de comparación múltiple y aplicación de *test* estadístico en un solo paso. Éste se emplea conjuntamente con un ANOVA, para determinar si existe diferencia significativa entre las medias comparadas (Lowry, 2008). La diferencia significativa fue delimitada utilizando un  $p < 0,05$ .

En las Tablas XXXIV y XXXV se resumen los resultados obtenidos luego del tratamiento de las células con IFN y los compuestos seleccionados de las bibliotecas de Alemania y Uruguay.



**Fig. 48:** Ejemplo de análisis de las fases del ciclo celular evaluado mediante citometría de flujo y posterior procesamiento con el software Flowjo®.

RMS: *root mean square error*: este parámetro es una medida de la distancia entre el modelo y los datos, por lo tanto, cuanto más chico es, mejor el ajuste de los datos al modelo. Freq. G1, G2: indica la frecuencia de aparición de una dada población en la muestra (%). Mean: indica la intensidad de fluorescencia media de la población estudiada. Nótese que G2 mean corresponde al doble de G1 mean, lo que indica el doble de contenido de ADN. SV: indica la desviación estándar de la población estudiada.

**Tabla XXXIV:** Efecto de los compuestos de las bibliotecas HZI Nat y HZI Sint sobre las fases del ciclo celular de células WISH-Mx2/EGFP

Efecto de los compuestos sobre el ciclo celular			
	Ausencia de rhIFN	rhIFN-β1a	rhIFN-α2a
VioB	↓G1↑S↑G2	↓G1↑S↑G2	↓G1↑S↑G2
Tubl*	↓G1↑S↑↑G2↑↑Sub G1	↓G1↑S↑G2↑Sub G1	↓G1↑S↑G2↑↑Sub G1
GepA	↓G1↑S↑G2	↓G1↑S↑G2	↓G1↑S↑G2
SuLa	↑G1↓S↓G2	↑G1↓S↓G2	↑G1↓S↓G2
Pella	↑G1↓S↓G2	↑G1↓S↓G2	↑G1↓S↓G2
P5D7	SES	SES	SES
P5H10	↓S↓G2	↓S↓G2	↓S↓G2
P6C11*	↓G2↑SubG1	↓S↓↓G2↑↑↑SubG1	↓G1↓S↓↓G2↑↑↑SubG1
P6H1	SES	SES	SES
P28E1	SES	SES	SES
P28E9	SES	SES	SES
P28H3	↓S	↓S	↓S
P28H7*	↓S	↓↓↓S↓G2↑↑↑SubG1	↓S
P28F7*	↓S↑↑SubG1	↓S↑SubG1	↓S↑↑↑SubG1
P28G6	↑G1↓S	↑G1↓S	↑G1↓S

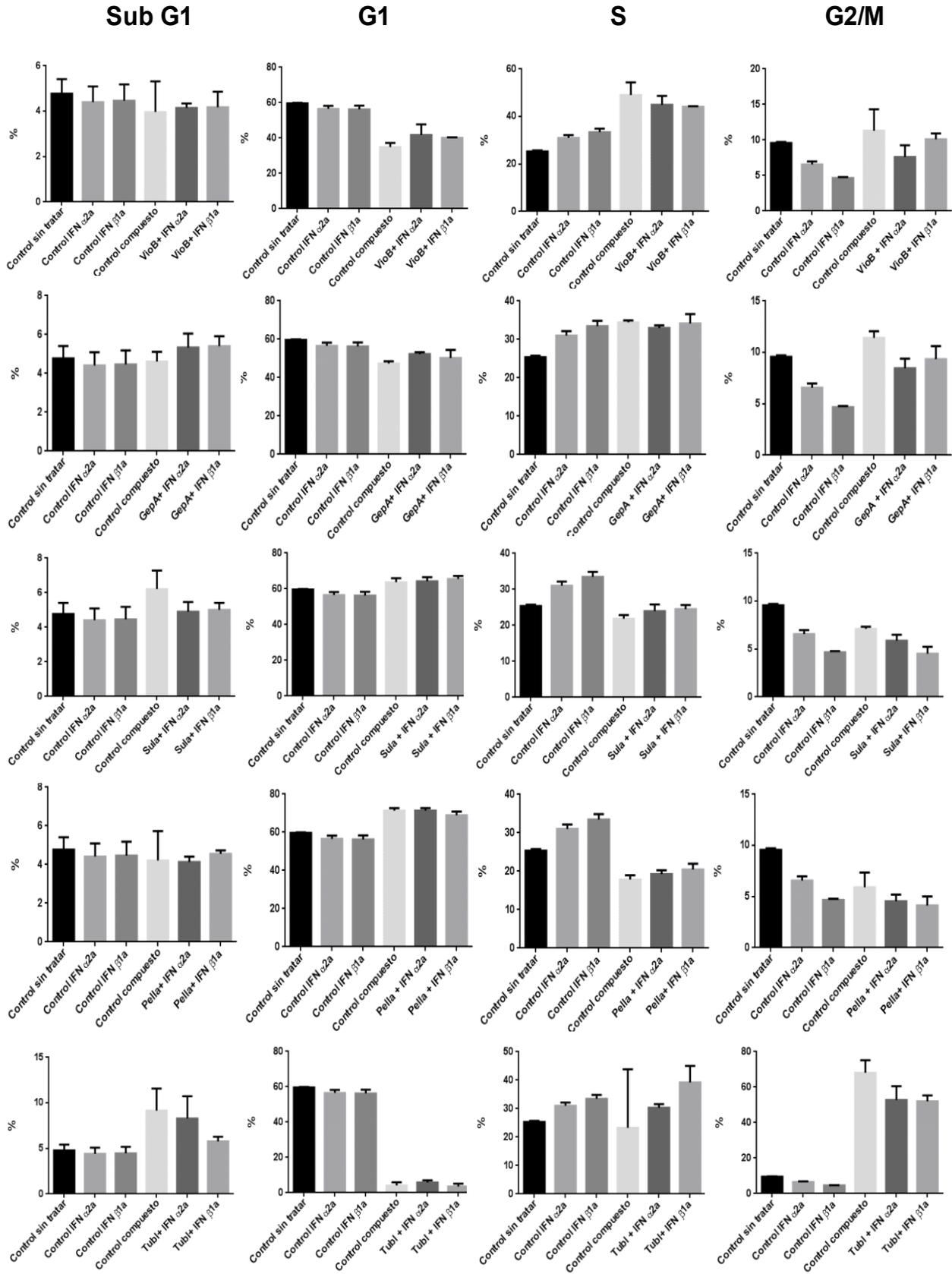
G1, S, G2, Sub G1: representan cada una de las fases del ciclo celular.

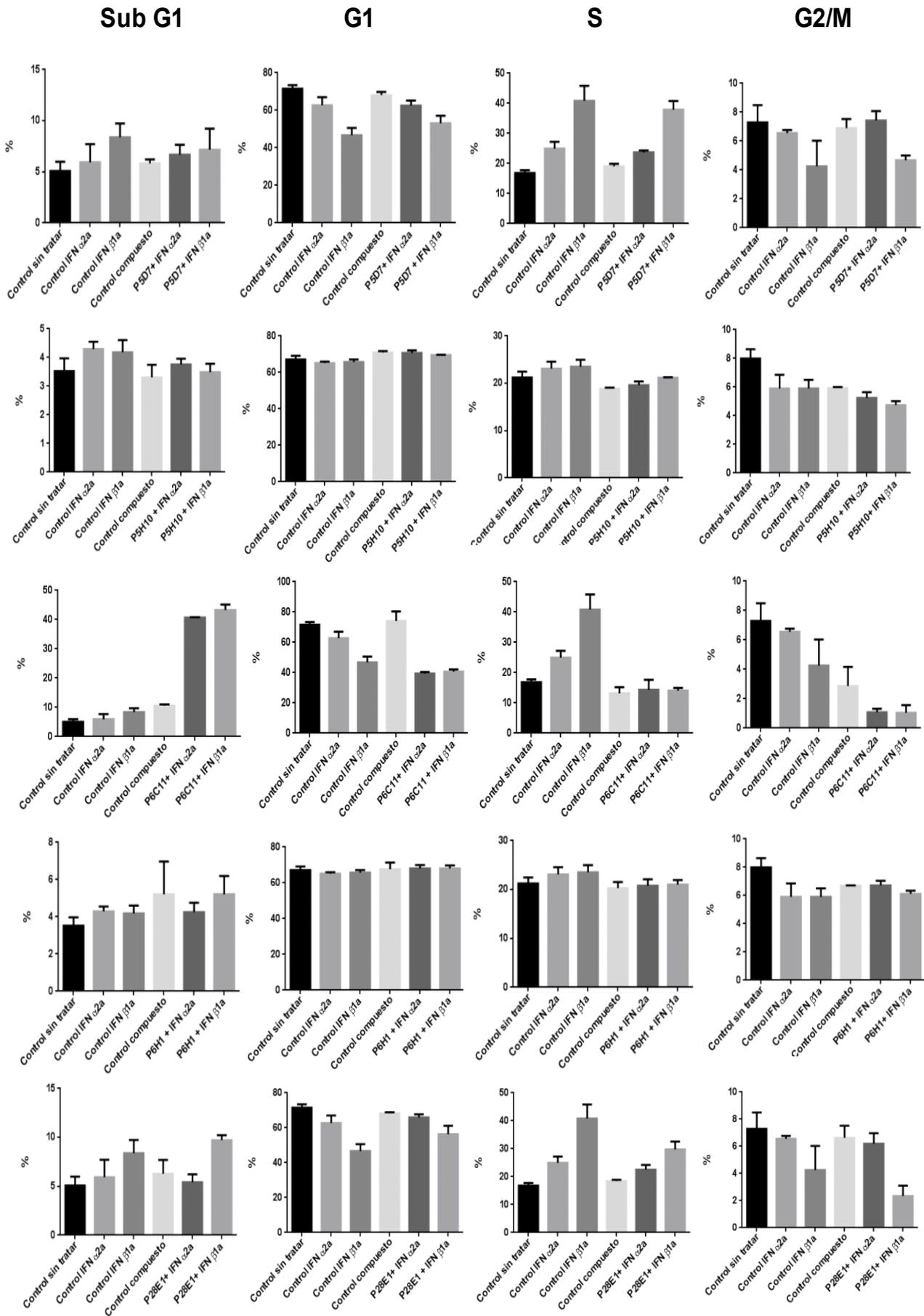
(↓), (↑), (SES) representan la disminución, incremento o ausencia de efecto significativo de la respuesta de IFN en presencia de compuesto sobre las fase del ciclo celular comparado con la situación control (sólo IFN).

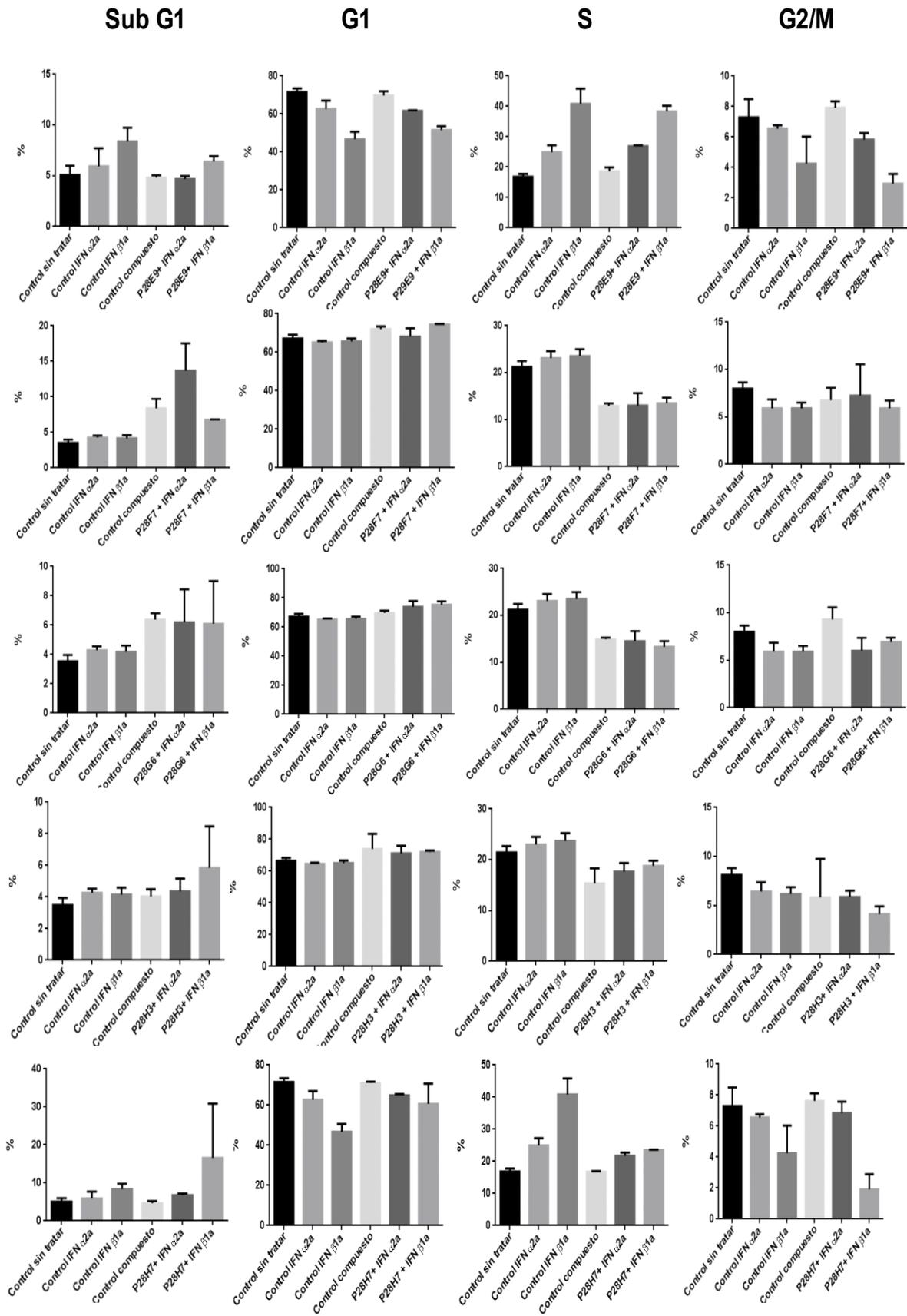
↑, ↑↑, ↑↑↑, ↓, ↓↓, ↓↓↓: Un incremento en el número de flechas indica un aumento o disminución en la intensidad de la respuesta obtenida.

\*: Efecto diferencial entre el compuesto *per se* y el compuesto en presencia de los hIFNs-I.

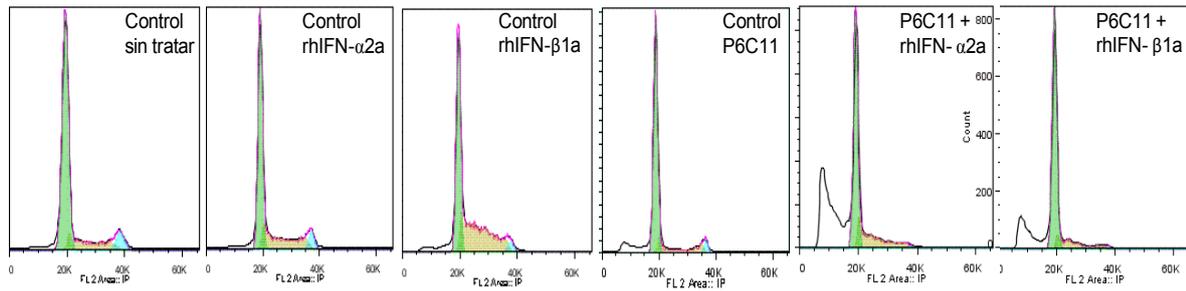
A



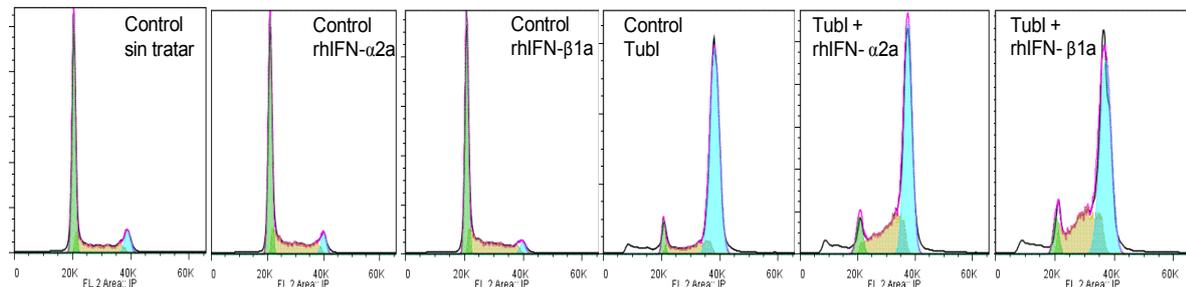




**B**  
**B1**



**B2**



**Fig. 49: Efecto de los compuestos de las bibliotecas HZI Nat y HZI Sint sobre las fases del ciclo celular analizado en células WISH-Mx2/EGFP.**

A: Gráficos correspondientes a las frecuencias (%) de cada una de las fases del ciclo celular (pico sub G1, Fase G1, Fase S, Fase G2/M) en las diferentes condiciones estudiadas (Control sin tratar, Control IFN- $\alpha$ 2a, Control IFN- $\beta$ 1a, Control compuesto, Compuesto + IFN- $\alpha$ 2a, Compuesto + IFN- $\beta$ 1a). Se realizó el análisis estadístico mediante la aplicación de *test* Bonferroni conjuntamente con ANOVA para determinar la existencia de diferencias significativas entre las muestras y los controles.

B: Ejemplo de histogramas correspondientes a las fases del ciclo celular estudiado sobre células WISH-Mx2/EGFP, en presencia del compuesto sintético P6C11 (B1) o el compuesto natural Tubi (B2). Los datos fueron analizados mediante el *software* FlowJo, realizando los ajustes correspondientes al modelo de Watson (Pragmático).

Luego del análisis realizado, se concluyó que existen compuestos que no produjeron cambios significativos sobre la distribución de las fases del ciclo celular de la línea WISH-Mx2/EGFP comparada con la situación control, mientras que hay otros compuestos que sí lo hicieron (Tabla XXXIV). Sin embargo, en la mayoría de las situaciones donde se evidenció diferencias significativas con respecto al control, ello fue producto de la acción del compuesto por sí solo sobre las células, ya que se observaron diferencias entre las células tratadas con compuesto (tanto control como muestras) respecto de los controles sin tratar y de IFN, pero no se evidenciaron diferencias significativas entre el control de compuesto y las muestras compuesto + IFN  $\alpha/\beta$ . No obstante, para el caso particular del compuesto P6C11 se evidenció un efecto

combinado del mismo en presencia de los IFNs, produciendo una disminución del porcentaje de células en la Fase G2 y un incremento del pico sub G1.

Con respecto a los resultados donde se evidencia  $\downarrow G1 \uparrow S \uparrow G2$ , esto podría explicarse de dos formas: puede asociarse a un incremento en la síntesis de ADN y mitosis, con un incremento en la proliferación celular; o por el contrario, a un bloqueo de las células en alguna de las fases del ciclo celular, arrojando las mismas y, como consecuencia, generando una disminución de la fase G1 y un incremento de las fases siguientes S y G2.

Por otro lado, algunos de los compuestos estudiados mostraron un comportamiento  $\uparrow G1 \downarrow S \downarrow G2$ , lo que sugiere un bloqueo de la proliferación celular acompañado de un incremento de la fase G1.

Además, en algunos casos se pudo evidenciar la aparición de la fase o pico sub G1, siendo esto altamente indicativo de un estado de muerte celular programada o apoptosis. El proceso de apoptosis es un fenómeno de muerte celular causado por procesos fisiológicos regulados. Se caracteriza por una serie de cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares en la célula, los cuales pueden ser inducidos por estímulos internos o externos. Mediante el empleo de la citometría de flujo (CF) se pueden seguir ciertas características de este fenómeno como expresión de proteínas involucradas en la apoptosis, activación de caspasas, cambios en el potencial de membrana mitocondrial, en la membrana plasmática, disminución del tamaño celular, cambios en la cromatina y degradación del ADN (el cual se pone de manifiesto por la aparición del pico sub G1).

De esta manera, la CF contribuye a la identificación y cuantificación del *pool* de células en apoptosis. En la actualidad existen programas informáticos capaces de analizar las fases del ciclo celular incluida la población sub G1, la cual se evidencia como un pico previo al pico correspondiente a la fase G1. Particularmente, los compuestos que demostraron este efecto fueron P6C11 y Tubl fundamentalmente, y en menor medida P28F7 y P28H7. Por tal motivo, se decidió complementar los análisis de ciclo celular con estudios de microscopía de fluorescencia de aquellas células tratadas, logrando así información adicional con respecto a la morfología e integridad celular, formación de *blebbing* o fragmentación nuclear (ver punto 7.5.9).

Como se explicó previamente, los compuestos pertenecientes a la biblioteca QuiMed-FCien mostraron respuestas variables dependientes de la línea celular y del rhIFN utilizado en los monitoreos de EGR. Es por este motivo que en un comienzo se seleccionaron 18 de estos compuestos respondedores para su caracterización, estudiando su toxicidad y dosis efectiva: FV17, PHD111, F11, PHD100, PHD101, AM1, CH4Br, FV10, DU1, CDUB, PHD122, CH14BEN, FV4Br, FVII, F13, FV18, PHD81 y

PHD121. A continuación y con el objetivo de seguir analizando aquellos compuestos que presentaran respuestas más importantes, se determinó el porcentaje de inhibición que cada uno ejercía sobre la actividad de los rhIFNs (Sección 7.5.1., Tabla XXV de Resultados y Discusión) y se decidió proseguir con la caracterización de los compuestos que mostraron una disminución de la actividad de los IFNs superior al 30%. De esta manera, se dejó de lado el análisis de AM1 y CDUB. Finalmente, para evaluar el efecto de estas moléculas sobre las fases del ciclo celular se escogieron las líneas WISH-MX2/EGFP como modelo celular normal y la línea celular HeLa-Mx2/EGFP como modelo celular tumoral. Por consiguiente, para este análisis sólo se tuvieron en cuenta los compuestos que evidenciaron una repuesta moduladora negativa de la actividad de los rhIFNs-I superior al 30% sobre estas líneas celulares: F13, PHD81, PHD101, FVII, PHD111, FV4Br, FV17, CH4Br, FV18 y FV10.

**Tabla XXXV:** Efecto de los compuestos sintéticos derivados de la biblioteca QuiMed-FCien (Uruguay) sobre las fases del ciclo celular de las células WISH-Mx2/EGFP y HeLa-Mx2/EGFP.

Línea celular	Efecto de los compuestos sobre el ciclo celular					
	HeLa-Mx2/EGFP			WISH-Mx2/EGFP		
Ausencia de rhIFN	rhIFN-β1a	rhIFN-α2a	Ausencia de rhIFN	rhIFN-β1a	rhIFN-α2a	
F13	↑Sub G1	↑Sub G1	↑Sub G1	↑G1↓S	↑G1↓S	↑G1↓S
PHD81*	↓↓G2	↓G2	↓G2	↓G1↑S↑G2	↓G1↑S↑G2	↓G1↑S↑G2
PHD101	SES	SES	SES	SES	SES	SES
FVII*	↓S↓↓G2↑Sub G1	↓G1↓↓S↑↑SubG1	↓G1↓S↑↑↑SubG1	↑G1↓S↓G2	↑G1↓S↓G2	↑G1↓S↓G2
PHD111*	↓G1↑Sub G1	↓G1↓S↑Sub G1	↓G1Sub G1	↓S↑↑G2	↓S↑G2	↓S↑G2
FV4Br*	↓S↓G2↑Sub G1	↓G1↓↓S↑↑SubG1	↓↓G1↓S↓G2↑↑↑Sub G1	SES	SES	SES
FV17*	↓G1↑Sub G1	↓G1↓S↑Sub G1	↓G1↓S↑Sub G1	SES	SES	SES
CH4Br*	SES	SES	SES	-	↑G1↓S↓G2	↑G1↓S↓G2
FV18*	↓G1↑Sub G1	↓↓G1↓S↑↑Sub G1	↓↓G1↓S↑↑Sub G1	↑G2	-	↑G2
FV10*	↓G1↑Sub G1	↓↓G1↓S↑Sub G1	↓↓G1↓S↑↑Sub G1	SES	SES	SES

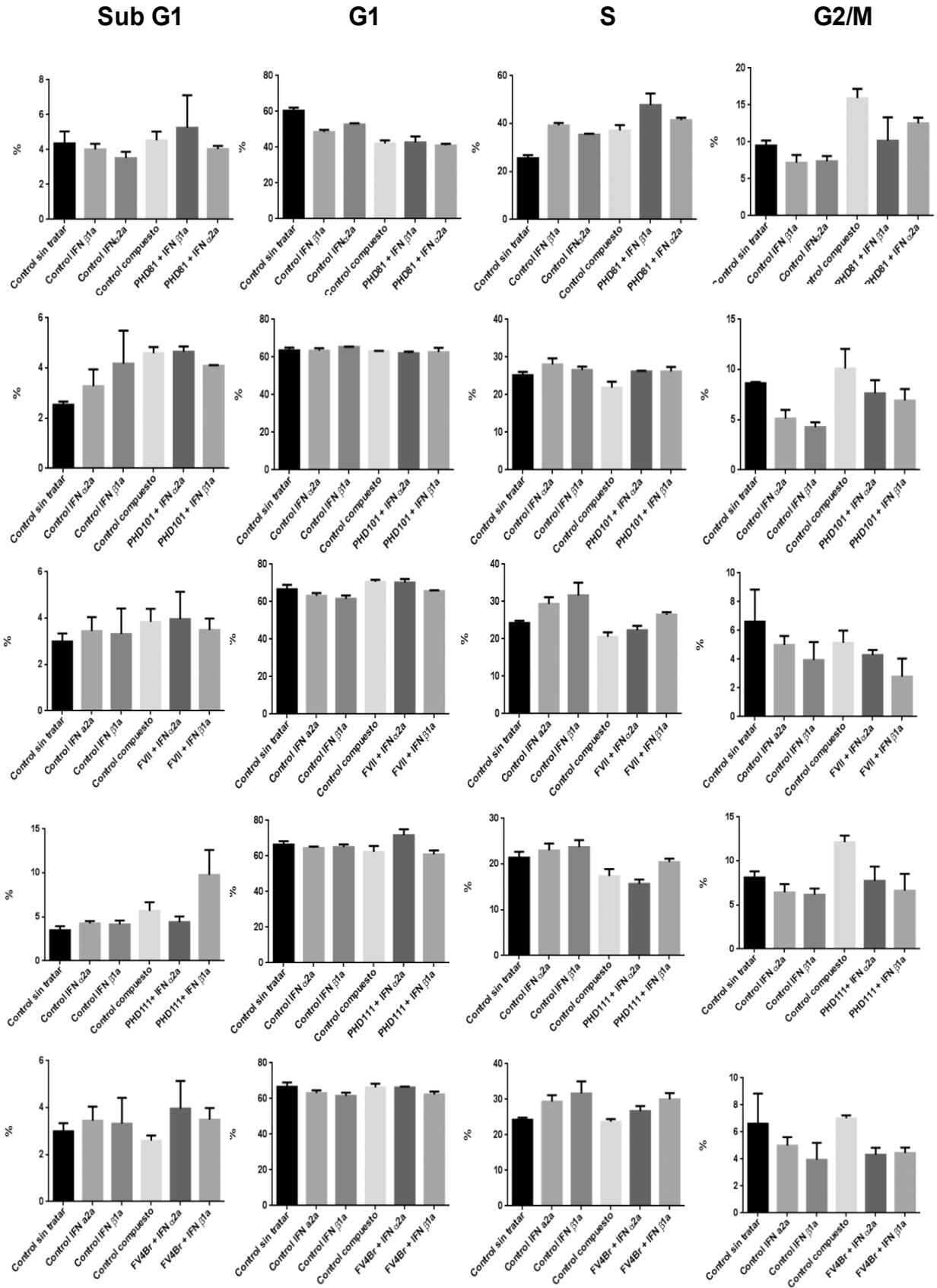
G1, S, G2, Sub G1: representan cada una de las fases del ciclo celular.

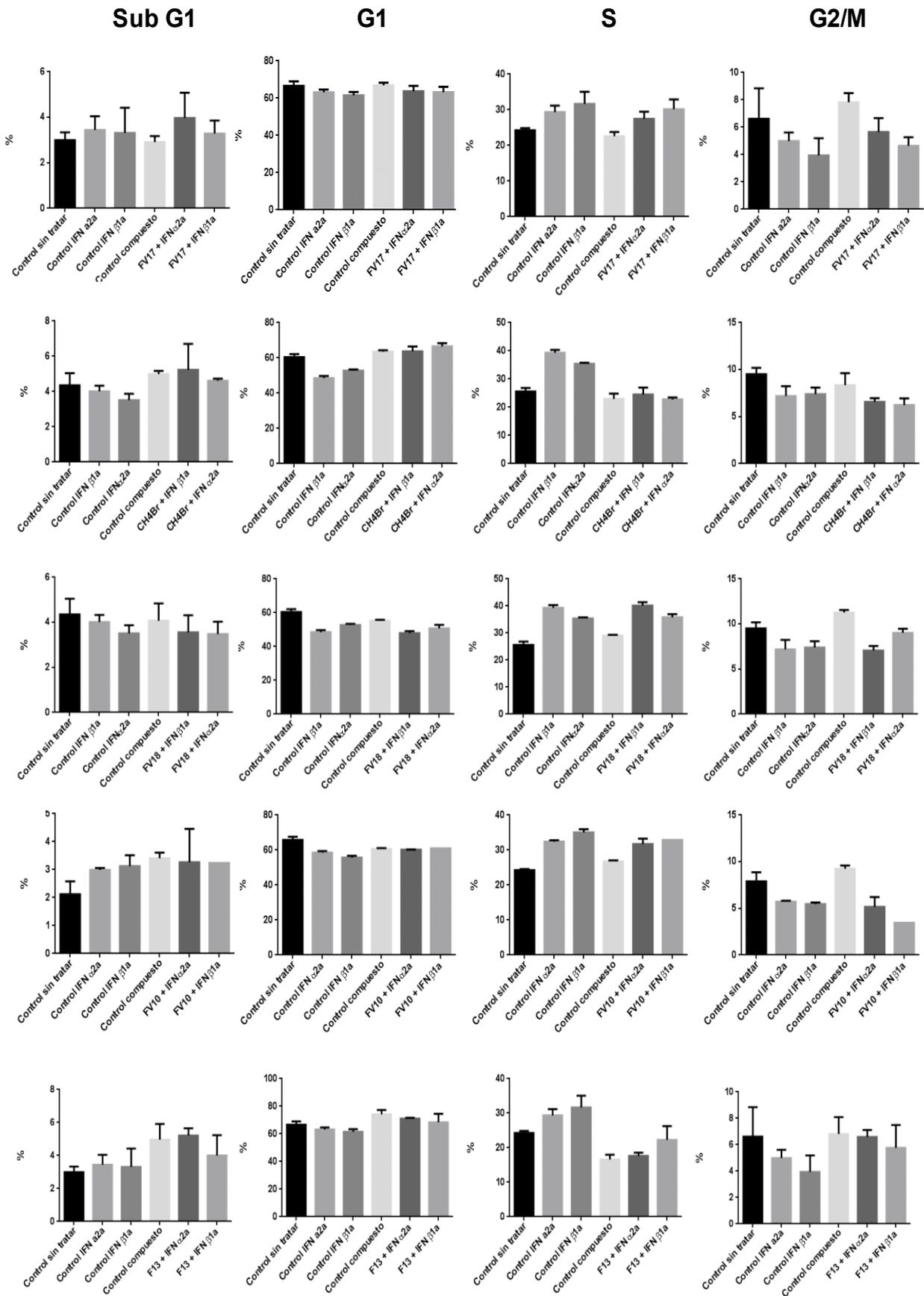
(↓), (↑), (SES) representan la disminución, incremento o ausencia de efecto significativo de la respuesta de IFN en presencia de compuesto sobre las fase del ciclo celular comparado con la situación control (sólo IFN).

↑, ↑↑, ↑↑↑, ↓, ↓↓, ↓↓↓: Un incremento en el número de flechas indica un aumento o disminución en la intensidad de la respuesta obtenida.

\*: Efecto diferencial entre el compuesto *per se* y el compuesto en presencia de los hIFNs-I.

A1





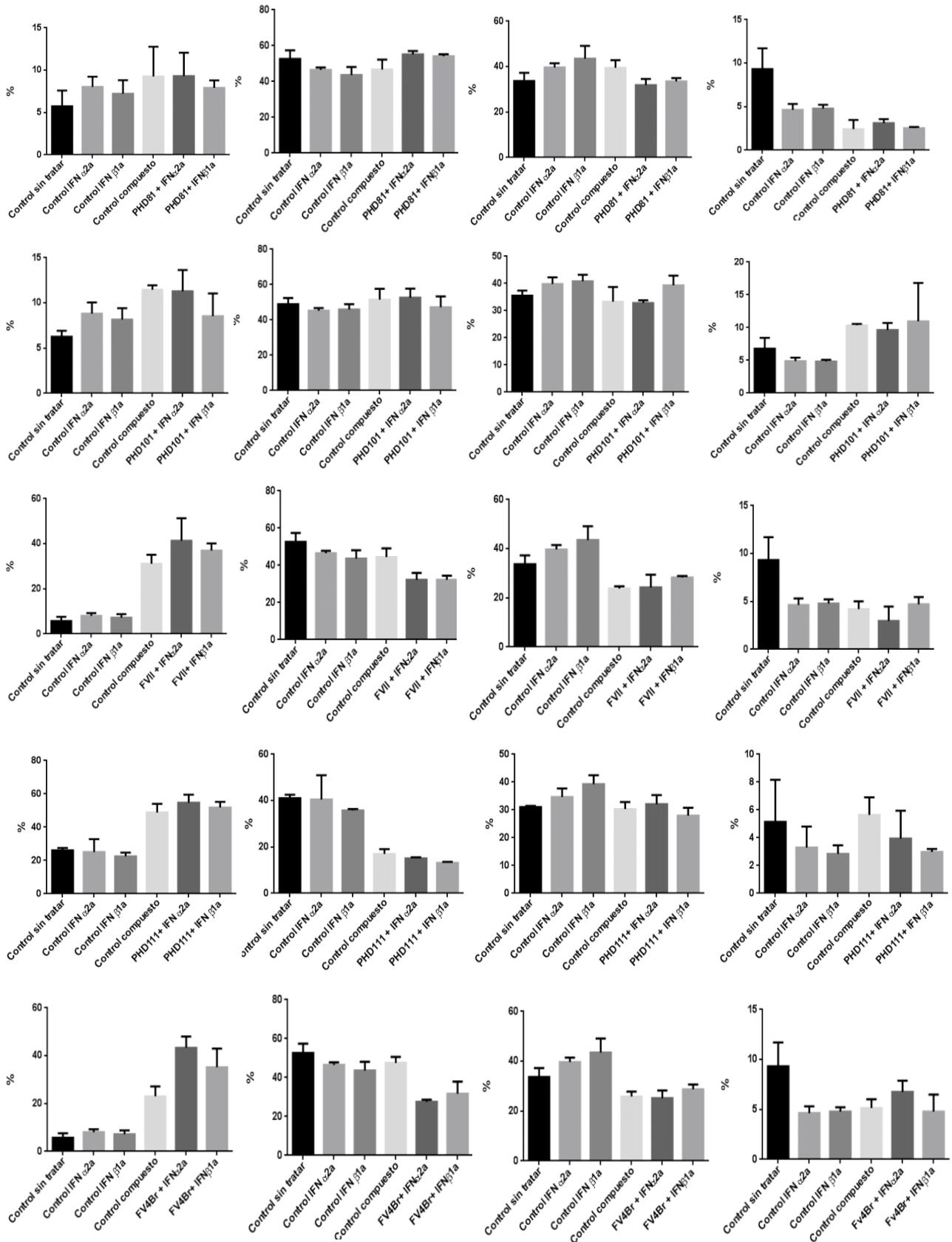
A2

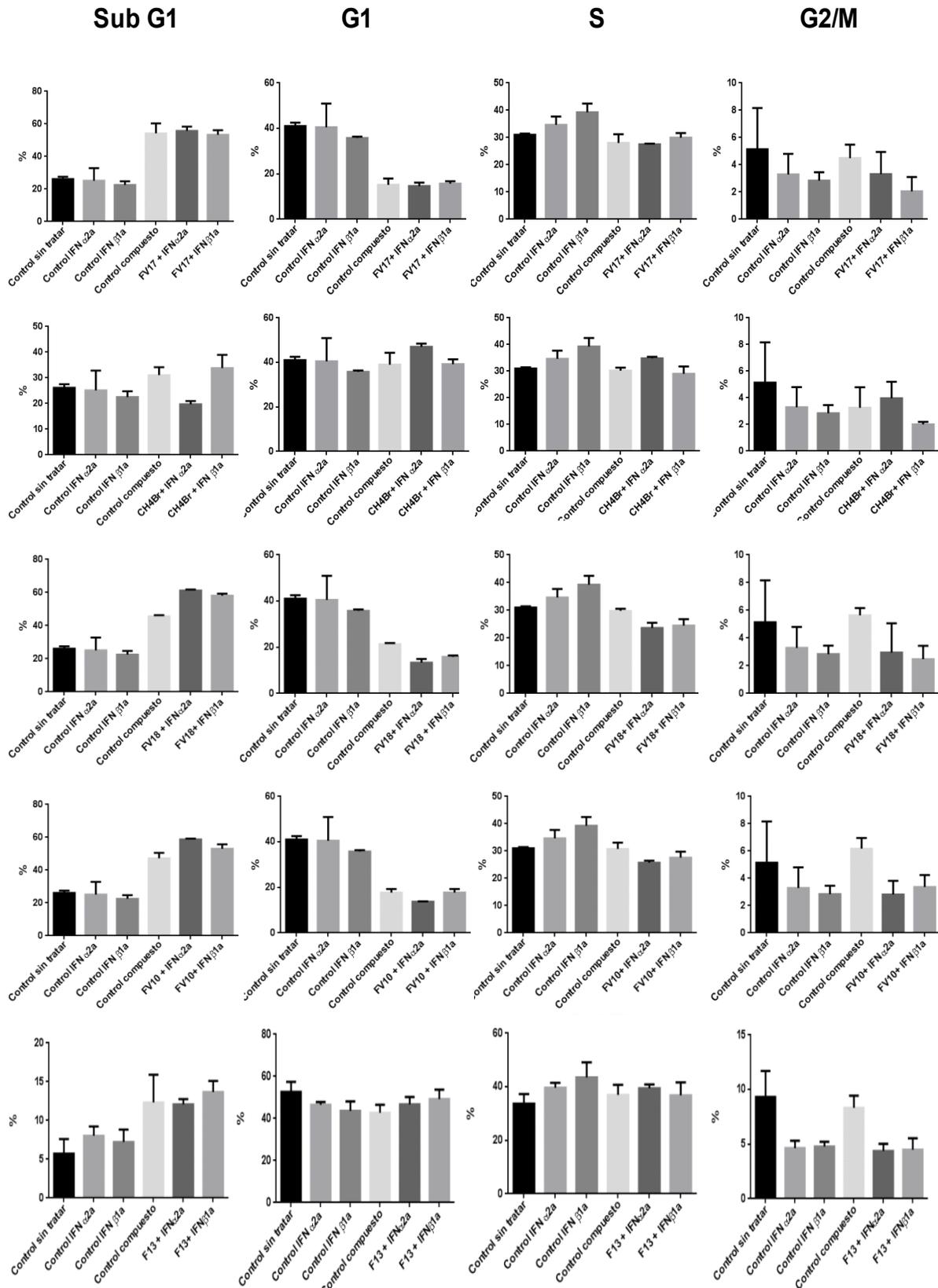
Sub G1

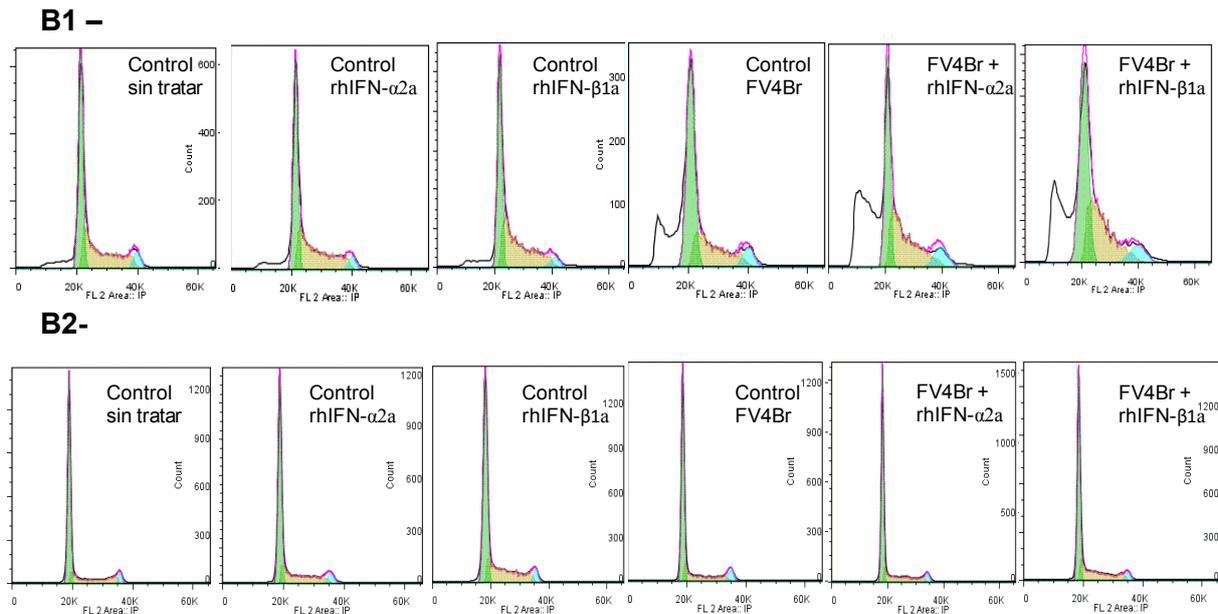
G1

S

G2/M







**Fig. 50:** Efecto de los compuestos sintéticos derivados de la biblioteca QuiMed-FCien (Uruguay) sobre las fases del ciclo celular analizado en células WISH-Mx2/EGFP (A1) y HeLa-Mx2/EGFP (A2).

- A: Gráficos correspondientes a las frecuencias (%) de cada una de las fases del ciclo celular (pico sub G1, Fase G1, Fase S, Fase G2/M) en las diferentes condiciones estudiadas (Control sin tratar, Control IFN- $\alpha$ 2a, Control IFN- $\beta$ 1a, Control compuesto, Compuesto + IFN- $\alpha$ 2a, Compuesto + IFN- $\beta$ 1a). Se realizó análisis estadístico mediante la aplicación del *test* Bonferroni conjuntamente con ANOVA para determinar la existencia de diferencias significativas entre las muestras y los controles.
- B: Ejemplo de histogramas correspondientes a las fases del ciclo celular estudiado sobre células HeLa-Mx2/EGFP (B1) y WISH-Mx2/EGFP (B2) en presencia del compuesto sintético FV4Br. Los datos fueron analizados mediante el *software* FlowJo, realizando los ajustes correspondientes al modelo de Watson (Pragmático).

El análisis del efecto de los compuestos sintéticos provenientes de la biblioteca QuiMed-FCien sobre el ciclo celular se realizó sobre diferentes líneas celulares HeLa-Mx2/EGFP y WISH-Mx2/EGFP debido al comportamiento variado que los mismos presentaron en el EGR. Un ejemplo de ello se muestra en la comparación de los histogramas correspondientes a las fases del ciclo celular de células HeLa-Mx2/EGFP y WISH-Mx2/EGFP tratadas con el compuesto FV4Br (Fig. 50 B1 y B2).

La mayoría de estos compuestos no mostraron diferencias significativas con respecto a los correspondientes controles evaluados sobre células WISH-Mx2/EGFP. Por otra parte, para aquellos compuestos que afectaron la distribución de las fases del ciclo celular se comprobó que fue fundamentalmente debido a un efecto propio del compuesto sobre las células y no debido a su capacidad moduladora de la actividad de los IFNs-I. Sin embargo, se pueden destacar algunas excepciones, a saber: i) el compuesto PHD81 produjo un incremento de la proporción de células que se encuentran en Fase S en presencia ambos IFNs-I; ii) el compuesto PHD111 (cuando está solo) produce un aumento del porcentaje de células que se encuentran en Fase G2

y este efecto del compuesto es contrarrestado al tratar las células conjuntamente con los IFNs-I; iii) una situación similar al compuesto PHD111 se observó para los compuestos F13 y FV10.

Estos mismos compuestos evaluados sobre células HeLa-Mx2/EGFP mostraron efectos diferentes. Puntualmente pudo observarse que todos los compuestos FV o F mostraron una Fase sub G1. Estos compuestos son flavonas, y fueron originalmente diseñadas para presentar propiedades antitumorales, lo cual explica los resultados obtenidos con estos compuestos donde se evidencia un incremento de la población de células apoptóticas (pico sub G1) sobre las células de origen tumoral (HeLa) y no así sobre células de linaje normal (WISH).

Nuevamente, en la mayoría de los casos, las diferencias observadas se debieron fundamentalmente a los efectos que ejercieron los compuestos por sí solos. No obstante, para el compuesto FV4Br se evidenció una disminución de la fracción de las células en Fase G1, con un aumento de la apoptosis evaluado a través del incremento de la Fase sub G1, cuando se estudió en presencia de los hIFNs-I. Este mismo comportamiento se registró para el compuesto FVII.

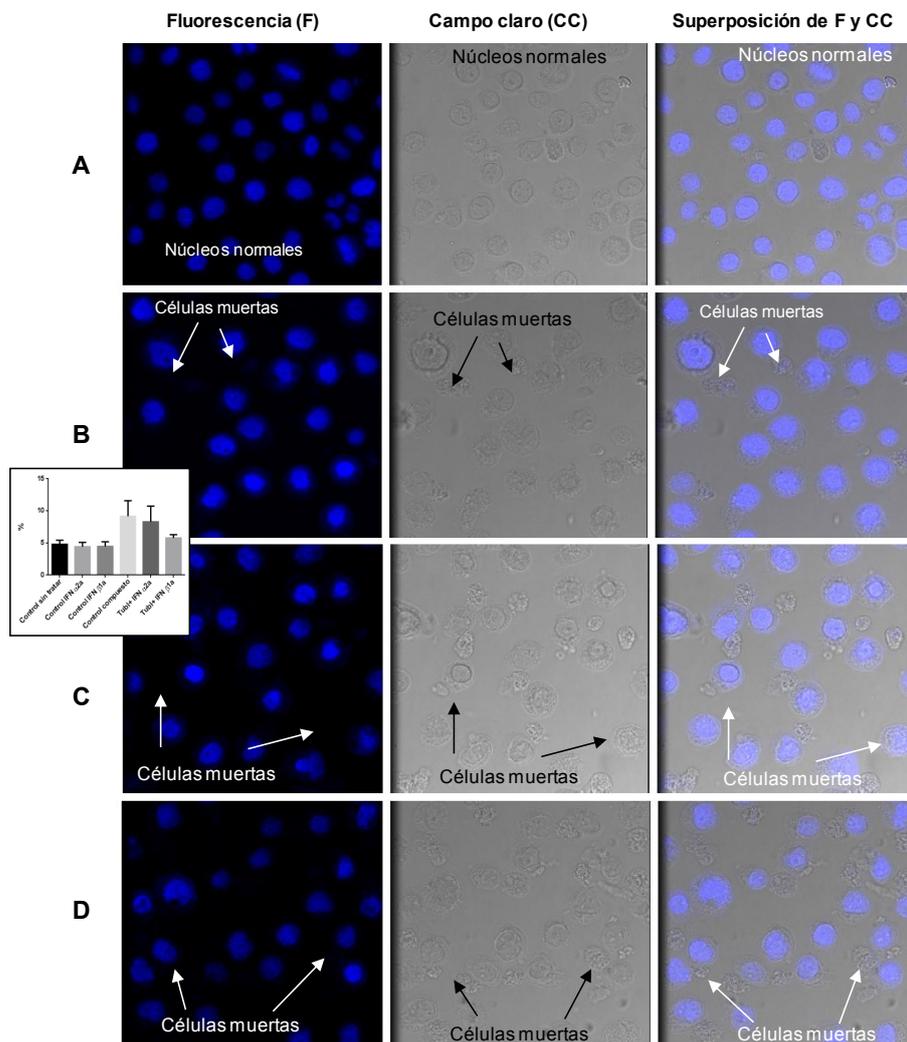
Por su parte, los compuestos CH4Br y PHD101 no mostraron diferencias significativas en ninguna de las fases del ciclo celular estudiado sobre células HeLa-Mx2/EGFP.

En la Tabla XXXV y la Fig. 50 se representan los efectos de cada compuesto sobre ambas líneas celulares estudiadas en presencia de los hIFNs-I.

#### **7.5.9. Evaluación de la apoptosis inducida por los compuestos mediante microscopía de fluorescencia**

Durante el análisis de las diferentes fases del ciclo celular mediante CF, la presencia de un pico sub G1 indica células o fracciones celulares con un contenido menor de ADN que las células normales. Este pico con menor intensidad de fluorescencia sugiere que ha ocurrido fragmentación del ADN como consecuencia de un proceso de apoptosis celular, por lo que durante el proceso de fijación/permeabilización esos fragmentos de ADN pequeños se van eliminando por lavados y las células finalmente intercalan menor cantidad de yoduro de propidio (IP) en sus moléculas de ADN y se manifiesta por la aparición de esta fracción. Por lo tanto, la aparición del pico sub G1 en células tratadas con un determinado compuesto sugiere que puede deberse a un inductor de apoptosis. Con el propósito de corroborar el fenómeno de apoptosis medido a través de otra metodología, diferente al análisis de ciclo celular, se evaluó la integridad celular mediante microscopía de fluorescencia luego del tratamiento con los

compuestos seleccionados. Solamente fueron objeto de estudio aquellos compuestos que manifestaron un incremento en el pico sub G1 evaluado por CF (según lo reportado en el punto 7.5.8). Los mismos se describen a continuación: Compuestos derivados de la biblioteca HZI Nat: Tubl; compuestos pertenecientes a la biblioteca HZI Sint: P6C11 y P28H7; compuestos de la biblioteca QuiMed-FCien: PHD111, F13, FV10, FV17, FV18, FV4Br y FVII. Para los compuestos de las bibliotecas HZI Nat y HZI Sint se emplearon células WISH-Mx2/EGFP, mientras que para los compuestos sintéticos derivados de la biblioteca de QuiMed-FCien se utilizaron sólo las células HeLa-Mx2/EGFP, que fue sobre las cuales se manifestó un pico sub G1 evaluado por CF.



**Fig. 51:** Análisis de la apoptosis inducida por el compuesto Tubl en células WISH Mx2/EGFP evaluada por microscopía de fluorescencia.

A: Células sin tratamiento; B: Células + Tubl; C: Células + Tubl + rhIFN-α2a; D: Células + Tubl + rhIFN-β1a.

El estudio se realizó empleando la línea reportera WISH-Mx2/EGFP, la cual fue incubada con Tubl en la concentración correspondiente a su dosis efectiva, en presencia o ausencia de rhIFN-β1a 10 UI/ml o rhIFN-α2a 60 UI/ml. Luego de los tratamientos las células fueron fijadas, permeabilizadas, marcadas con IP y montadas en portaobjetos. La adquisición de las imágenes se realizó empleando un microscopio de epifluorescencia Olympus IX81, objetivo 60x, acoplado a una CCD cámara Hamamatsu.

De los compuestos naturales, el único que indujo un aumento de sub G1 fue el Tubl y debido a una limitante en la cantidad disponible de este compuesto en particular, para el ensayo de microscopía se emplearon las mismas células utilizadas durante el análisis del ciclo celular. Para ello, las células fijadas, marcadas con IP, y que no fueron utilizadas durante la CF, fueron lavadas y resuspendidas en 20  $\mu$ l de PBS. Dicha suspensión celular se sembró sobre un portaobjetos, la muestra fue montada con una gota de glicerol y finalmente se analizó por microscopía de fluorescencia, empleando un aumento de 60 X (Fig. 51).

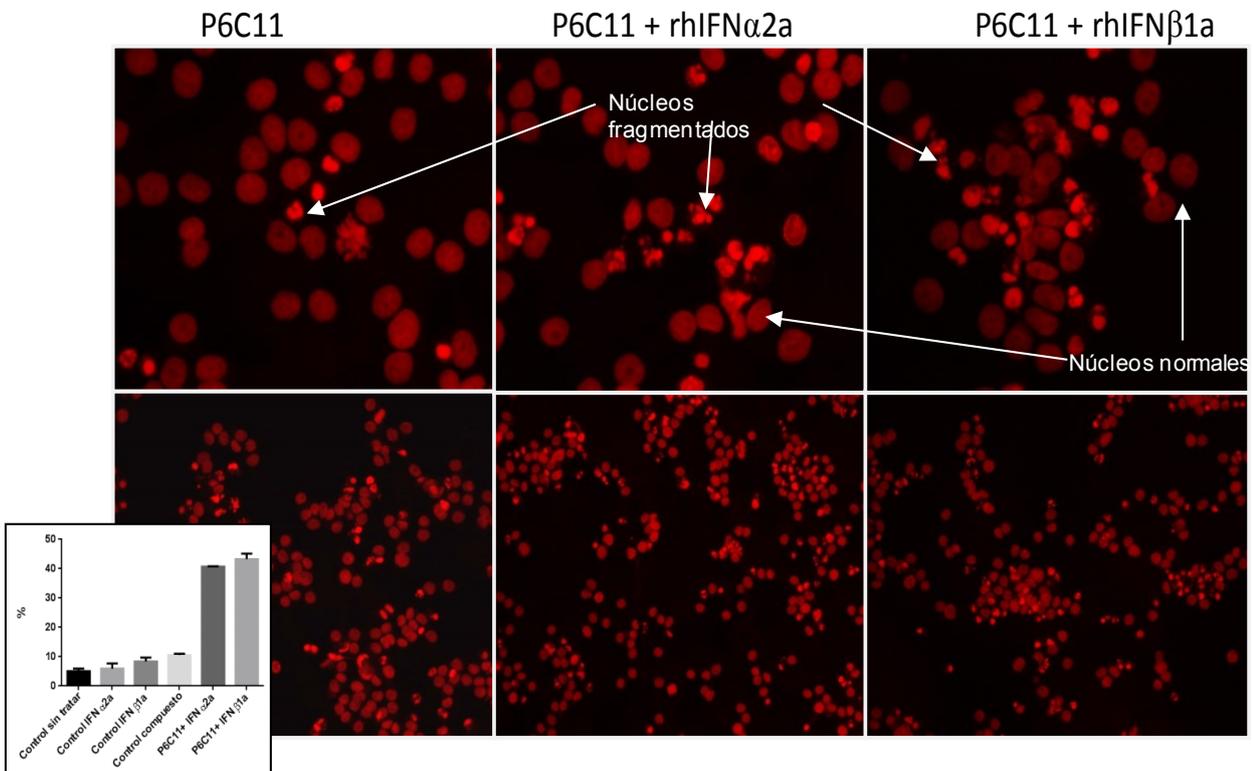
Si bien no se observan núcleos fragmentados, sí se ponen de manifiesto alteraciones en la morfología celular, con presencia de contornos irregulares, y núcleos difusos, indicativo de células muertas o en estado apoptótico. En cambio, en el caso de células normales se observan células bien redondeadas con núcleos bien delimitados, lo que se visualiza claramente en la superposición de imágenes correspondientes al campo claro con las de fluorescencia (panel de la derecha). Estos resultados sugieren que Tubl puede ser un inductor de apoptosis, o al menos desencadenar mecanismos que conduzcan a la muerte celular.

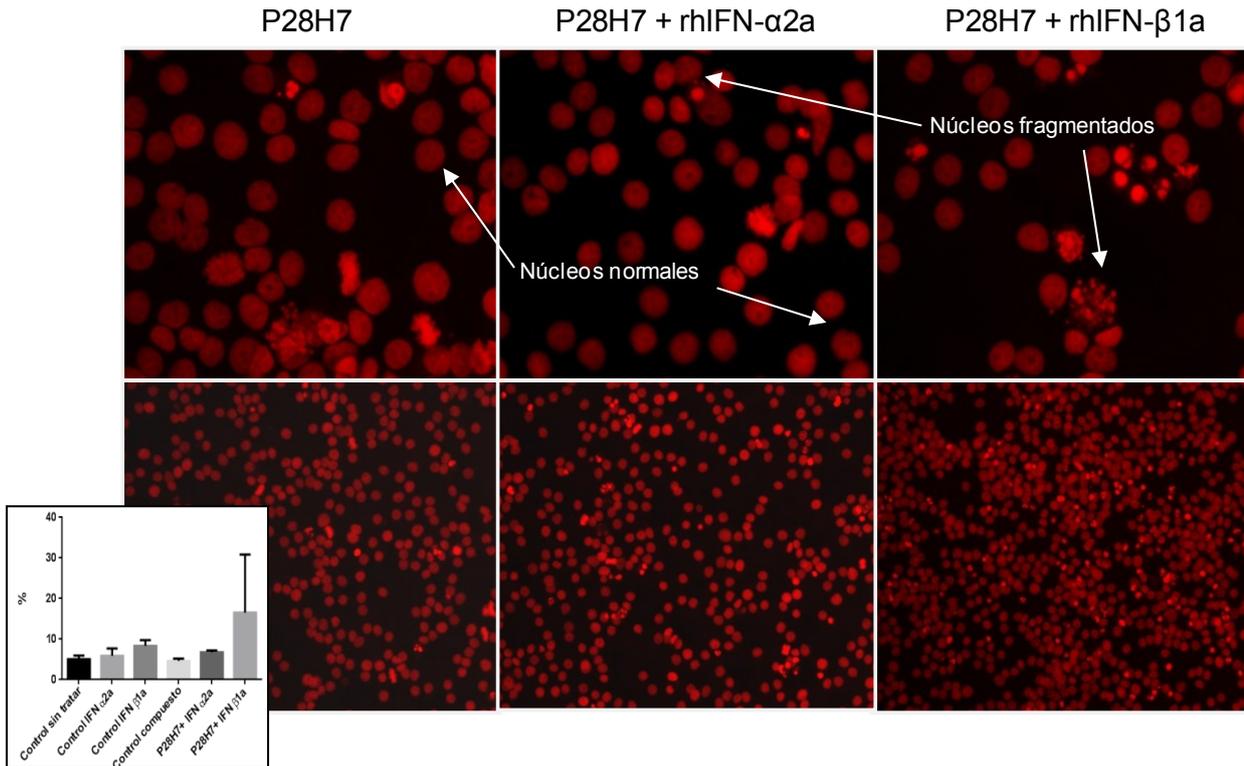
Para el estudio de la inducción de apoptosis por parte de los compuestos sintéticos P6C11 y P28H7 en células WISH-Mx2/EGFP se siguió el protocolo descrito en la sección 16.4.1.9. de Materiales y Métodos. El análisis de las muestras se efectuó empleando objetivos con aumentos diferentes; 60 X y 20X, con el propósito de capturar imágenes para examinar detalladamente cada núcleo celular; o para realizar un análisis global de la muestra (inclusión de mayor número de núcleos en el análisis), respectivamente.

Del análisis de las imágenes obtenidas para ambos compuestos, pudo observarse la presencia de signos de apoptosis tales como fragmentación nuclear, formación de *blebbings* o cuerpos apoptóticos, así como cambios evidentes en la morfología celular. Asimismo, las alteraciones de la integridad celular fueron más drásticas en aquellas células tratadas con los compuestos en presencia de los hIFNs-I, en comparación con las células tratadas únicamente con el compuesto. De la integración de estos resultados se concluye que tanto el P6C11 como el P28H7 fueron capaces de inducir la apoptosis celular, la cual se vio incrementada cuando cada compuesto es combinado con los hIFNs-I. Para el caso particular de P28H7 se observó que este efecto fue más intenso cuando las células fueron tratadas en forma combinada con el rhIFN- $\beta$ 1a (Fig. 52). No obstante, las células controles, donde sólo se incubó a las mismas con medio de cultivo o con los respectivos IFNs, no evidenciaron signos de apoptosis.

Finalmente, se analizó el efecto de los compuestos sintéticos provenientes de la biblioteca de compuestos QuiMed- FCien (Uruguay),, siguiendo el mismo protocolo de ensayo con la única diferencia que se emplearon las células HeLa-Mx2/EGFP. En aquellos casos donde se observó por CF que el efecto era debido sólo al compuesto, el análisis por microscopía se realizó sólo con el compuesto, mientras que en aquellos casos donde se evidenció un efecto potenciado del compuesto y los hIFNs-I, el estudio se llevó a cabo incluyendo todas las condiciones de acuerdo con el siguiente detalle:

- PHD111: compuesto
- F13: compuesto
- FV10: compuesto
- FV17: compuesto
- FV18: compuesto
- compuesto + rhIFN- $\alpha$ 2a
- compuesto + rhIFN- $\beta$ 1a
- FV4Br: compuesto
- compuesto + rhIFN- $\alpha$ 2a
- compuesto + rhIFN- $\beta$ 1a
- FVII: compuesto
- compuesto + rhIFN- $\alpha$ 2a
- compuesto + rhIFN- $\beta$ 1a

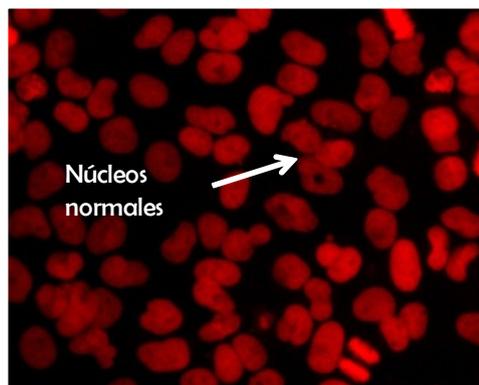


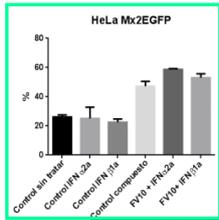


**Fig. 52:** Análisis de la apoptosis inducida por los compuestos en células WISH-Mx2/EGFP evaluada por microscopía de fluorescencia.

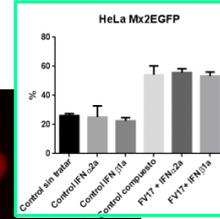
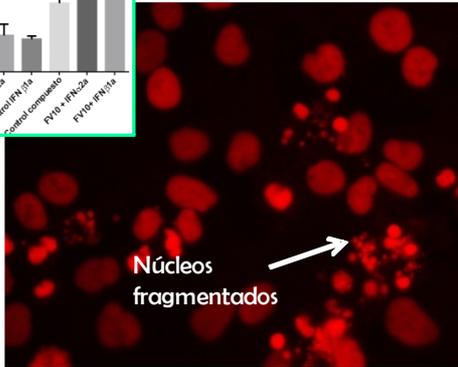
El estudio se realizó empleando la línea reportera WISH-Mx2/EGFP, la cual fue incubada con los compuestos en la concentración correspondiente a su dosis efectiva, en presencia o ausencia de rhIFN-β1a 10 UI/ml o rhIFN-α2a 60 UI/ml. Luego de los tratamientos las células fueron fijadas, permeabilizadas, marcadas con IP y montadas en portaobjetos. La adquisición de las imágenes se realizó empleando un microscopio de epifluorescencia Olympus IX81, objetivos de 60X (panel superior) o 20X (panel inferior), acoplado a una CCD cámara Hamamatsu.

**Control sin tratar**

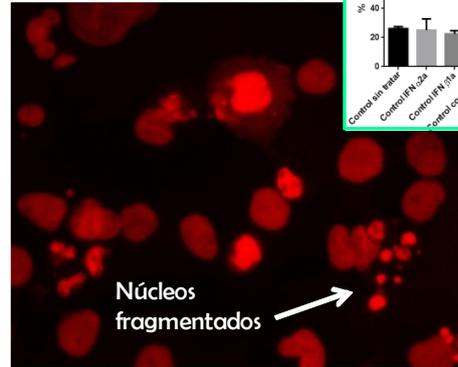




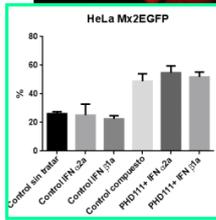
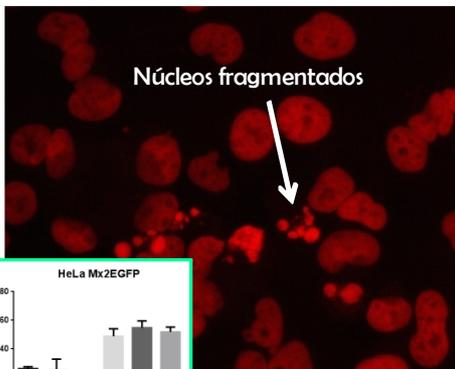
**FV10**



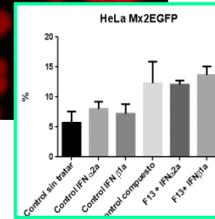
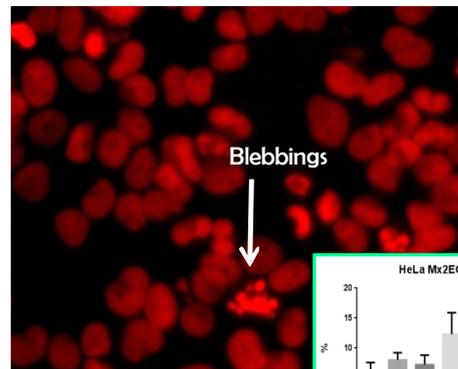
**FV17**



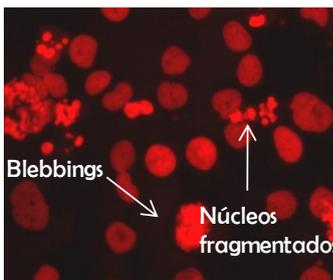
**PHD111**



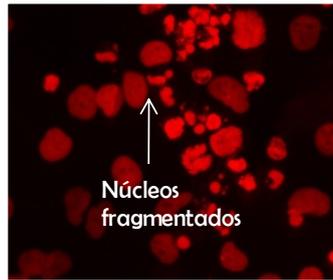
**F13**



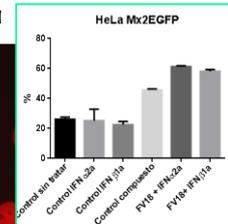
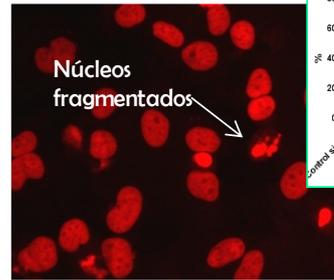
**FV18**



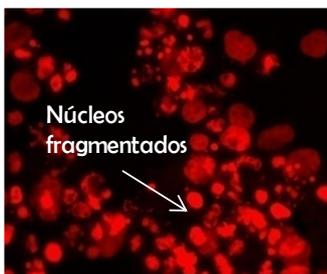
**FV18 + rhIFN  $\alpha$ 2a**



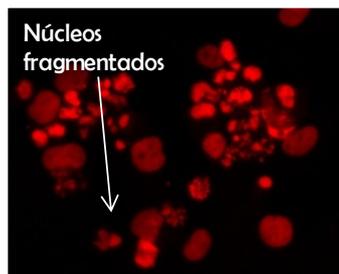
**FV18+ rhIFN  $\beta$ 1a**



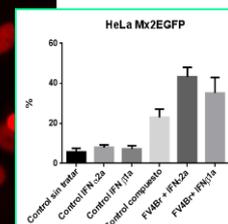
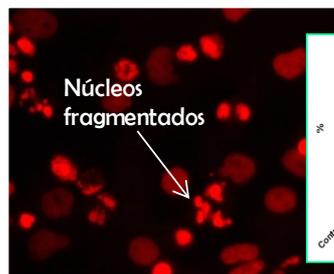
**FV4Br**

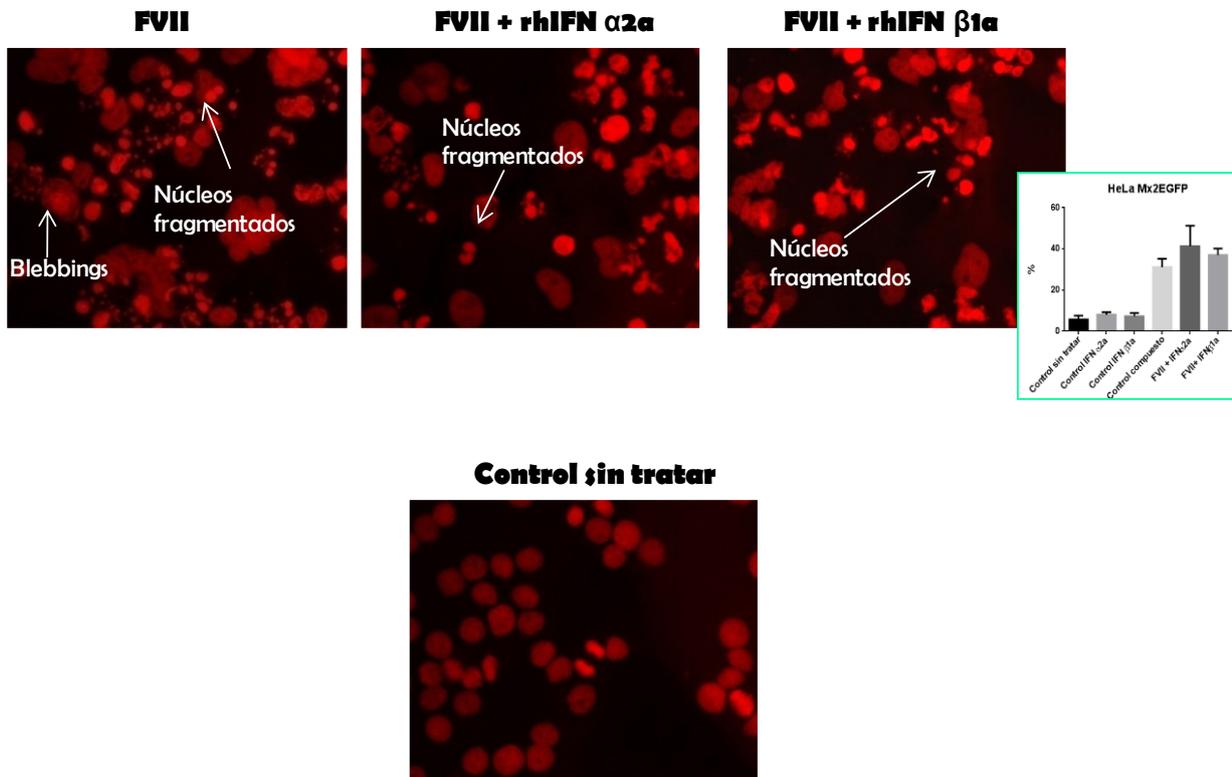


**FV4Br + rhIFN  $\alpha$ 2a**



**FV4Br+ rhIFN  $\beta$ 1a**





**Fig. 53:** Análisis de la apoptosis inducida por los compuestos sintéticos FV10, FV17, PHD111, F13, FV18, FV4Br y FVII en células HeLa-Mx2/EGFP evaluada por microscopía de fluorescencia.

El estudio se realizó empleando la línea reportera HeLa-Mx2/EGFP, la cual fue incubada con los diferentes compuestos en la concentración correspondiente a su dosis efectiva, en presencia o ausencia de rhIFN- $\beta$ 1a 10 UI/ml o rhIFN- $\alpha$ 2a 60 UI/ml. Luego de los tratamientos las células fueron fijadas, permeabilizadas, marcadas con IP y montadas en portaobjetos. La adquisición de las imágenes se realizó empleando un microscopio de epifluorescencia Olympus IX81, objetivo 60x, acoplado a una CCD cámara Hamamatsu.

Los compuestos FV10, FV17, F13 y PHD111 se analizaron solos, en ausencia de los IFNs, dado que el efecto evidenciado por CF está dado por el compuesto solo; mientras que los compuestos FV18, FV4Br y FVII se analizaron en presencia de los IFNs porque mostraron un efecto diferencial al ser combinado con estos últimos.

Del análisis realizado puede concluirse que todos los compuestos sintéticos estudiados presentan un efecto inductor de la apoptosis sobre las células reporteras derivadas de células HeLa. En la Fig. 53 se observa claramente la presencia de núcleos fragmentados, formación de *blebbings* o cuerpos apoptóticos, fragmentación celular, y cambios en la morfología celular, entre otros. De esta forma se corroboraron las observaciones realizadas por CF durante el análisis de la evaluación de ciclo celular. El incremento en la fase sub G1 estuvo directamente correlacionado con un efecto

pro-apoptótico inducido por el compuesto, afectando la viabilidad celular. Es necesario recordar que todos estos compuestos son flavonas, y como se mencionó previamente, presentan actividad antitumoral, motivo por el cual resulta coherente que los mismos afecten la proliferación de células HeLa, que son células tumorales y no así, células WISH, que derivan de un linaje celular humano normal.

Por otra parte, es importante destacar que no todos los compuestos actúan de la misma forma. Algunos de ellos resultaron más agresivos, tal es el caso de FV4Br y FVII respecto de los compuestos del mismo grupo FV10 o F13. Particularmente, el compuesto FV10 es la base estructural de las flavonas y sobre esta base se realizaron diferentes sustituciones, sintetizando las restantes flavonas antes mencionadas. Es evidente que de acuerdo con la sustitución realizada y el grupo químico agregado, el accionar de los compuestos se ve modificado, pudiendo potenciar su efecto en algunos casos.

Finalmente, se puede observar claramente que el efecto que presentó el compuesto FV18 se incrementó en presencia del rhIFN- $\alpha$ 2a.

#### **7.6. Evaluación del efecto combinado de compuestos sintéticos provenientes de la biblioteca QuiMed-FCien sobre la actividad del hIFN- $\alpha$ 2a**

Con el propósito de identificar compuestos o combinaciones de los mismos que revistan utilidad para el tratamiento de enfermedades que exhiben un incremento patológico de IFN como ocurre con el Lupus Eritematoso Sistémico y, a su vez, disponer de muestras que exhiban diferente grado de modulación de la respuesta de los IFNs, se diseñaron mezclas de los compuestos inhibidores derivados de la biblioteca QuiMed-FCien. De este modo se seleccionaron 5 compuestos que se denominaron arbitrariamente A, B, C, D y E, refiriéndose a F13, PHD101, FVII, FV4Br y FV10, respectivamente. Estos compuestos fueron seleccionados de acuerdo a su grado de inhibición y que pertenecieran a distintos grupos químicos de base.

El análisis se llevó a cabo empleando el EGR con las células WISH-Mx2/EGFP en presencia de rhIFN- $\alpha$ 2a. Para elegir las combinaciones de compuestos se utilizó el *software Design Expert* versión 7.0 (Stat-ease, inc., EEUU). El programa determinó el número de corridas y combinaciones a evaluar teniendo en cuenta el procedimiento de superficies de respuesta, según se muestra en la Tabla XIII de Materiales y Métodos. De esta forma, se analizaron 16 combinaciones por duplicado, calculando el porcentaje de proteína reportera obtenida para cada condición. Dichos resultados fueron procesados aplicando el tratamiento estadístico provisto por el *software* GraphPad

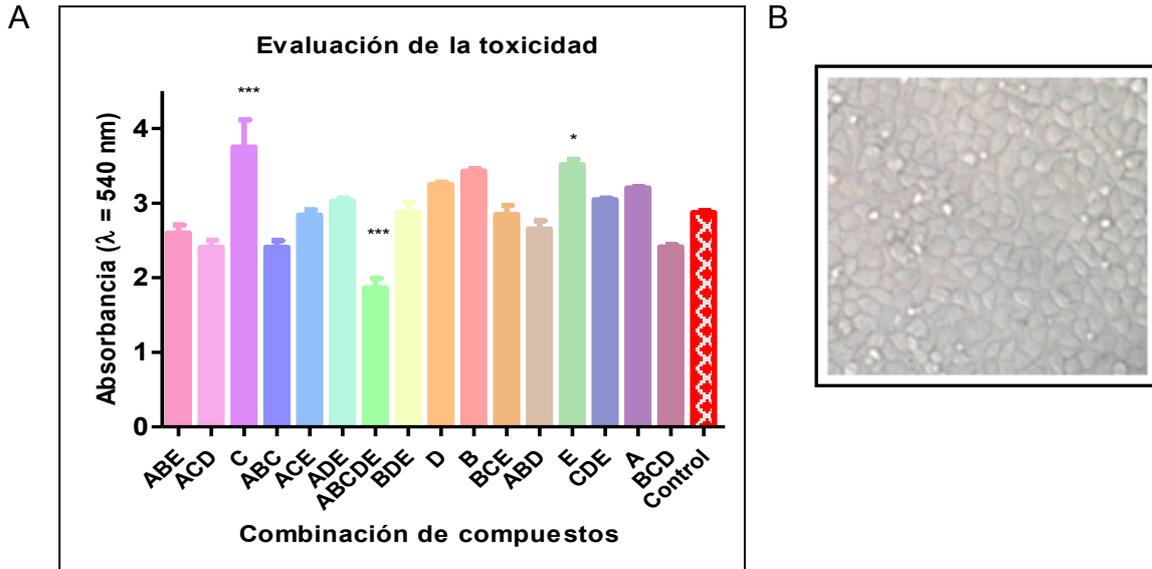
Prism ® 5.01. La existencia de diferencias significativas fue analizada mediante aplicación de un *test* ANOVA seguido por el *test* de comparación múltiple de Dunnett, debido a que el mismo permite la comparación de todas las muestras con respecto a un control (Fig. 54).

Inicialmente, se evaluó la potencial toxicidad de todas las mezclas, empleando el método de tinción con el colorante cristal violeta. Las células fueron incubadas con los compuestos individuales o las combinaciones correspondientes y, luego de 24 h, se procedió a la determinación de la viabilidad celular de manera de evaluar la citotoxicidad. Cabe mencionar que la concentración de compuestos empleada por unidad de célula fue la misma, ya sea estudiando un sólo compuesto o mezclas de ellos. Al analizar la morfología celular y la integridad de la monocapa celular mediante microscopía de las células incubadas con los compuestos o con sus mezclas, no se evidenció efecto tóxico sobre las células WISH-Mx2/EGFP.

Sin embargo, al analizar los datos obtenidos en el ensayo de toxicidad, luego de la lectura espectrofotométrica y de aplicar el tratamiento estadístico a las muestras correspondientes, se obtuvo una diferencia significativa con respecto al control de ensayo para las combinaciones C, E y ABCDE (Fig. 54 A). Las dos primeras mostraron una absorbancia significativamente superior a la del control del ensayo, lo que no representa un inconveniente dado que no refleja pérdida de viabilidad celular, sino, por el contrario, mayor tinción con el colorante. Esto puede atribuirse a un error en el lavado de esos pozos puntuales y a que, consecuentemente, haya quedado colorante en exceso, dando una señal de absorbancia superior a la obtenida para el control. Finalmente, la combinación de 5 compuestos, denominada ABCDE reveló un valor de absorbancia significativamente menor a la del control, lo cual podría estar indicando un efecto tóxico por parte de los compuestos combinados.

Luego de corroborar la ausencia de toxicidad de la mayoría de los compuestos y sus combinaciones o bien sólo un efecto leve por parte de la combinación ABCDE, se procedió a llevar a cabo el EGR para evaluar el efecto de los compuestos combinados sobre dicho ensayo.

Para todas las combinaciones se observó un porcentaje EGFP inferior con respecto al correspondiente tratamiento con uno solo de los compuestos y con relación al control de sólo IFN (Tabla XXXVI y Fig. 55), confirmando de esta manera un efecto cooperativo de las combinaciones para incrementar el efecto modulador inhibitorio sobre la actividad de los hIFNs-I. Particularmente, la combinación de los 5 compuestos seleccionados fue la que mostró la máxima inhibición de la respuesta del hIFN evaluado. No obstante, las combinaciones de compuesto ABC y ACD mostraron un elevado grado de inhibición de la actividad del rhIFN- $\alpha$ 2a.



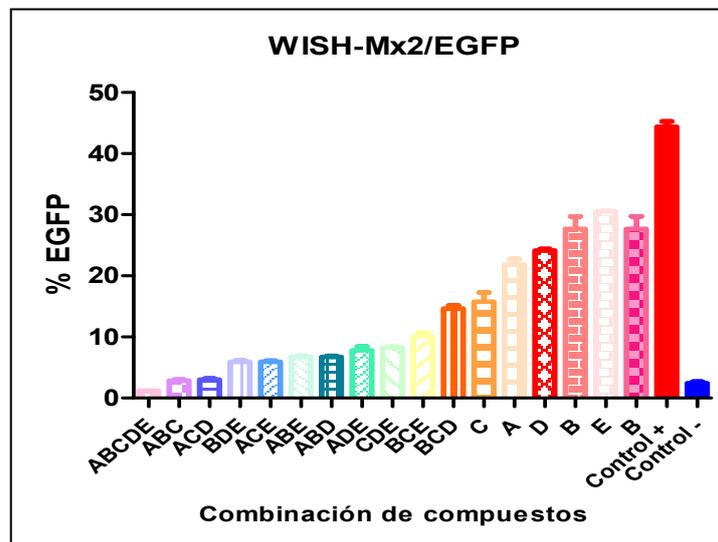
**Fig. 54:** Evaluación de la toxicidad de las combinaciones de compuestos sintéticos mediante EGR empleando la línea celular WISH-Mx2/EGFP en presencia del rhIFN-α2a.

\*, \*\*, \*\*\*: indican el grado de significación estadística con relación al control del ensayo correspondientes a  $p < 0,1$ ;  $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ , respectivamente.

Control: células sin tratamiento; ABE, ACD, C, ABC, ACE, ADE, ABCDE, BDE, D, B, BCE, ABD, E, CDE, A, BCD: tratamiento con compuestos o combinaciones de los mismos. Compuestos: F13 (A); PHD101 (B); FVII (C); FV4Br (D); FV10 (E).

A) Las células fueron incubadas con las mezclas de compuestos y luego de 24 h se determinó la integridad de la monocapa celular mediante tinción con cristal violeta y posterior lectura espectrofotométrica del colorante incorporado.

B) Imagen de la microscopía correspondiente a la monocapa de células incubadas con la combinación de compuestos ABCDE.



**Fig. 55:** Efecto combinado de compuestos inhibidores de la actividad de los hIFNs-I evaluado mediante EGR empleando la línea WISH-Mx2/EGFP.

En el eje de ordenadas se graficó el % EGFP en función de los diferentes compuestos y sus combinaciones. Control +: células tratadas sólo con IFN; Control -: células sin tratamiento; ABE, ACD, C, ABC, ACE, ADE, ABCDE, BDE, D, B, BCE, ABD, E, CDE, A, BCD: tratamiento con compuestos o combinaciones de los mismos. Compuestos: F13 (A); PHD101 (B); FVII (C); FV4Br (D); FV10 (E).

**Tabla XXXVI:** Efecto combinado de compuestos inhibidores de la actividad de los hIFNs-I evaluado mediante EGR empleando la línea WISH-Mx2/EGFP.

Compuestos/ Combinación de los mismos <sup>a</sup>	% EGFP
Control IFN	44,5
Control negativo	2,5
ABCDE	1,3
ABC	3,0
ACD	3,1
BDE	6,0
ACE	6,0
ABD	6,8
ABE	6,8
ADE	7,9
CDE	8,3
BCE	10,2
BCD	14,7
C	15,9
A	22,0
D	24,2
B	27,8
E	30,7

<sup>a</sup>ABCDE, ABC, ACD, BDE, ACE, ABD, ABE, ADE, CDE, BCE, BCD, C, A, D, B, E: cada una de las condiciones evaluadas.

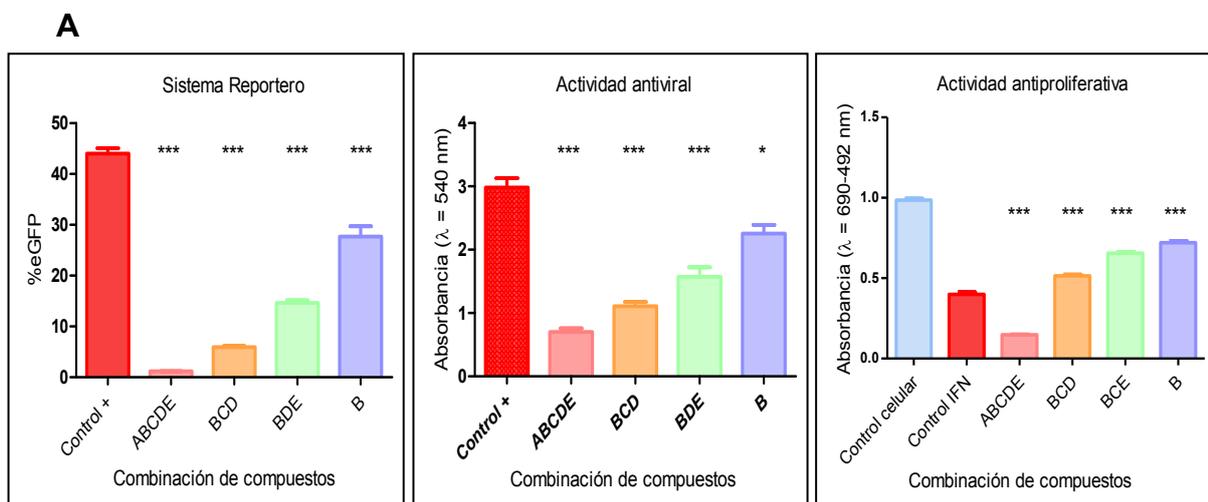
#### 7.6.1. Comparación de los ensayos EGR, AVA y AA para evaluar la acción moduladora de las combinaciones de compuestos sobre la actividad del rhIFN- $\alpha$ 2a

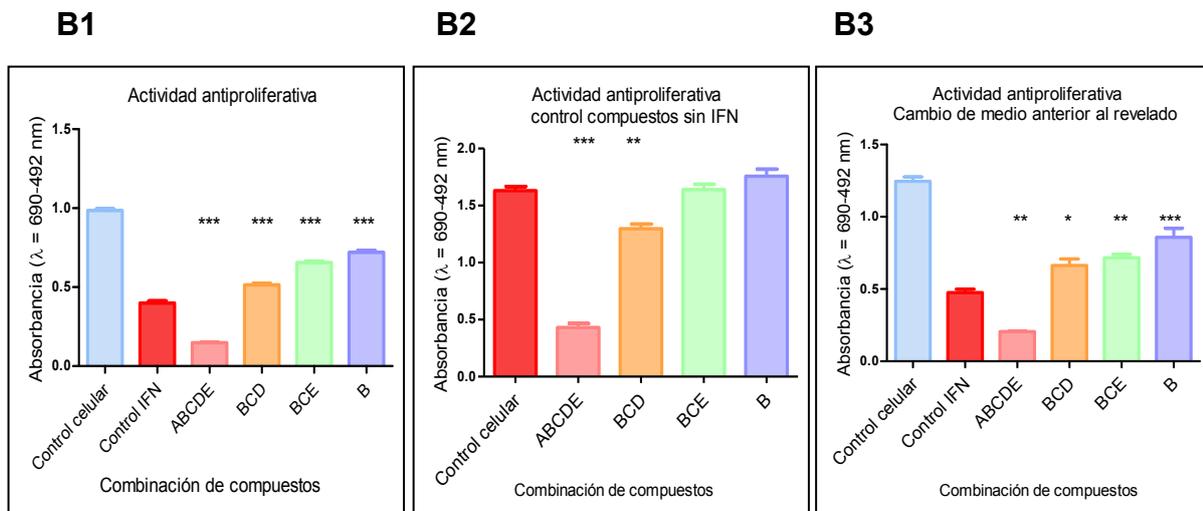
Para llevar a cabo la comparación de las tres metodologías: EGR, AVA y AA se eligieron 3 combinaciones de compuestos (ABCDE, BCD y BDE) y un sólo compuesto (B) para evaluar su acción (Fig. 56 A). Para todos los ensayos se utilizó la línea celular reportera WISH-Mx2/EGFP.

Estas combinaciones fueron elegidas de acuerdo con la capacidad de los compuestos para demostrar diferentes grados de inhibición de la acción del rhIFN- $\alpha$ 2a. De esta forma, se trabajó con una mezcla que proporcione la máxima inhibición de la actividad del IFN (ABCDE y BDE), otra que aporte un incremento en la respuesta moduladora, sin ser máxima (BCD) y uno de los compuestos por sí solo para poder realizar las comparaciones adecuadas. Luego de cada uno de los ensayos realizados se

aplicó el tratamiento estadístico adecuado de manera de realizar la evaluación estadística correspondiente.

Los resultados obtenidos para cada combinación mediante el ensayo EGR y AVA fueron consistentes, demostrando que existe una cooperación entre los compuestos para disminuir la respuesta del rhIFN- $\alpha$ 2a, siendo la respuesta más intensa para la mezcla de los 5 compuestos. Esto pudo observarse como una disminución en el % EGFP máximo alcanzado para el caso del EGR y en la menor absorbancia para el ensayo AVA producto de una mayor lisis celular como consecuencia de una menor protección inducida en las células por los IFNs frente a la infección viral. Sin embargo, al evaluar el comportamiento de estas combinaciones mediante el ensayo de AA, el resultado obtenido no fue el esperado. Conforme aumenta el efecto inhibitor de los compuestos sobre la actividad de los IFNs (AA), debería aumentar la señal obtenida como resultado de una proliferación celular mayor. Sin embargo, se observó un comportamiento atípico, donde disminuyó significativamente la proliferación celular respecto del control de IFN para la combinación ABCDE. Para el resto de las mezclas la proliferación celular fue significativamente mayor que la obtenida para el control de IFN. No obstante, el incremento en la proliferación no fue consistente con la disminución en la AVA y EGR (Fig. 56 A).





**Fig. 56:** Caracterización de la combinación de compuestos sintéticos de la biblioteca QuiMed-FCien. Combinaciones: **ABCDE:** F13+PHD101+FVII+V4Br+V10 – **BCD:** PHD101+FVII+V4Br – **BCE:** PHD101+FVII+V10 – **B:** PHD101

A- Evaluación del efecto de las combinaciones seleccionadas mediante EGR, AVA y AA.

B1- Evaluación de la AA.

B2- AA de los compuestos en ausencia del IFN en estudio.

B3- Evaluación de la AA cambiando el medio previo al agregado del reactivo colorimétrico empleado para el revelado del ensayo.

El comportamiento visualizado para las combinaciones de compuestos evaluadas mediante ensayos de actividad antiproliferativa fue incoherente. Por este motivo se postuló la hipótesis de que ciertas combinaciones de compuestos pudieran actuar directamente sobre el reactivo PMS/MTS empleado para revelar el ensayo de AA, desarrollando resultados inespecíficos. Es por ello que se repitió el ensayo AA, pero previo al agregado del reactivo de revelado se realizó el cambio de medio de cada pozo, de manera de eliminar el compuesto remanente, y en su lugar se agregó medio de cultivo fresco. Sin embargo, el patrón de respuestas fue semejante al obtenido previamente (Fig. 56 B1 y 56 B3). No obstante, al realizar la comparación del efecto obtenido mediante cada uno de los ensayos previos, empleando el correspondiente tratamiento estadístico es evidente una diferencia significativamente inferior para las mezclas ABCDE, BCD y BCE, respecto del control positivo; es decir, se observa un menor incremento de la proliferación celular, comparado con los resultados obtenidos en el ensayo AA original. Esto sugiere que puede existir al menos un mínimo de interacción entre las mezclas de compuestos seleccionadas y el reactivo de revelado.

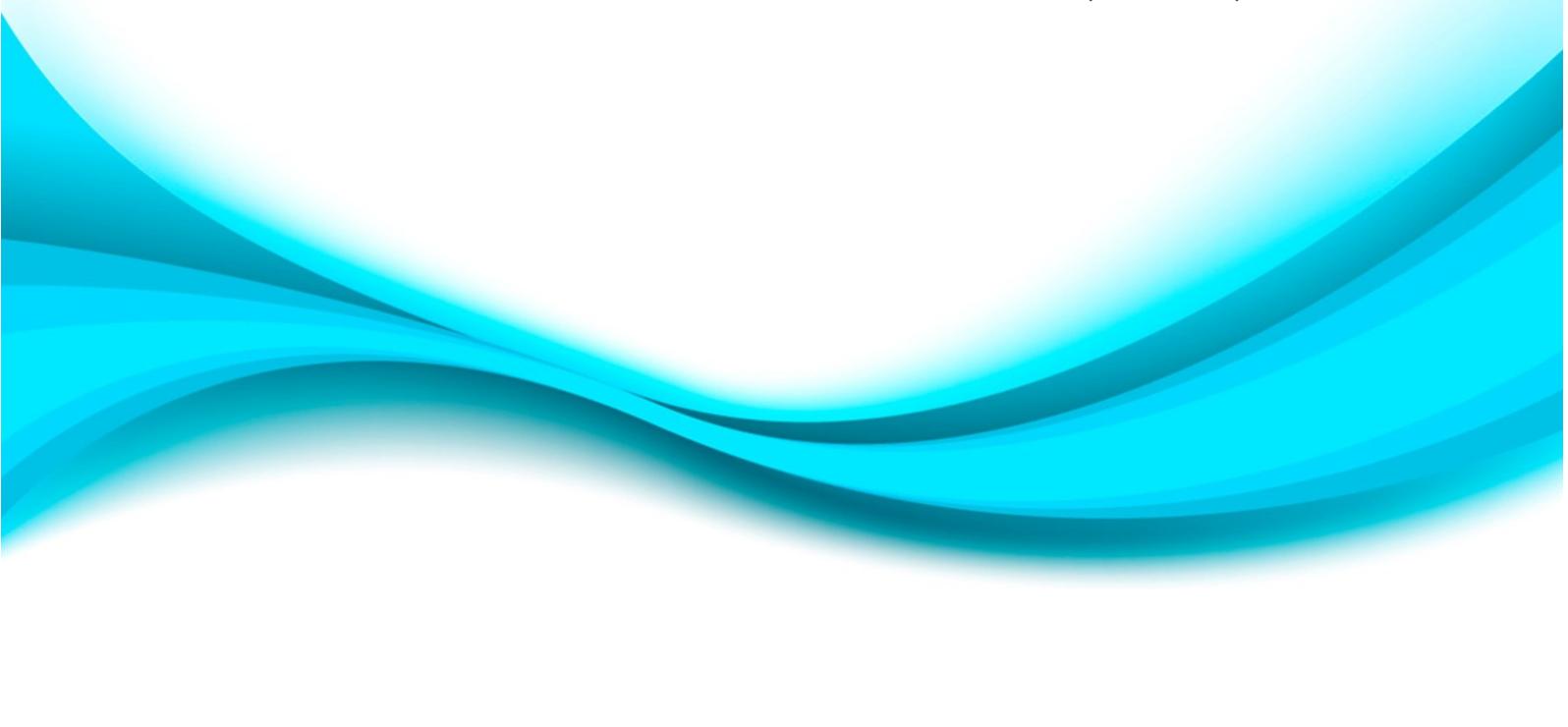
Por otro lado, se estudió el efecto de las mezclas en ausencia de IFN para evaluarse el efecto que se está percibiendo es producto o no de las propias mezclas de

compuestos. Como resultado, no se obtuvieron diferencias significativas con respecto al control de IFN para las mezclas BCE y el compuesto B, mientras que sí se observó una diferencia significativa para las combinaciones ABCDE y BCD (Fig. 56 B1 y 56 B2). Esto implica que existió una acción propia de los compuestos, o bien, que particularmente estas combinaciones afectarían la actividad metabólica celular para el sistema en estudio, impidiendo la proliferación del cultivo. Sin embargo, la combinación BCD, a pesar de haber exhibido un efecto negativo sobre la actividad de las deshidrogenasas, fue capaz de incrementar indirectamente la proliferación por inhibición de la actividad del IFN. Por lo tanto, desde el punto de vista del ensayo de AA, la combinación BCD, BCE y el compuesto sin combinar B producirían la inhibición de la actividad antiproliferativa que exhibe el IFN sobre las células WISH comportándose como el sistema AVA y el EGR que, a su vez, demostraron una conducta similar para las todas las combinaciones ensayadas,

# CONCLUSIONES

“Después de escalar una montaña muy alta, descubrimos que hay muchas otras montañas por escalar”

Nelson Mandela



## **CONCLUSIONES**

Los interferones conforman una familia de glicoproteínas especies específicas, que constituyen la primera barrera de defensa del organismo, desempeñando un rol fundamental en la defensa del mismo frente a numerosas patologías. Participan de la respuesta inmune y adaptativa efectiva tanto de forma autócrina como parácrina, estimulando más de 300 genes, cuyos productos inducen o inhiben mecanismos involucrados en los procesos inflamatorios (Richards y MacDonald, 2011; Lopez y Hermesh, 2011). Sus principales roles incluyen actividad antiviral, antiproliferativa e inmunomoduladora.

Debido a las propiedades antes mencionadas, estas moléculas son ampliamente utilizadas como biofármacos para el tratamiento de numerosas patologías de naturaleza viral como la hepatitis B y patologías tumorales de diversos orígenes etiológicos. Es por ello que, durante mucho tiempo e incluso en la actualidad, han sido blanco de estudio en la búsqueda por comprender su mecanismo de producción y de acción, la forma en que interactúan con otras moléculas del sistema inmune y el modo en que regulan la activación de otros genes, con el objetivo final de incrementar su potencial bioterapéutico.

La tecnología de ADN recombinante ha permitido el clonado de las secuencias de los IFNs-I para su expresión tanto en bacterias (*E. coli*) como en levaduras y aún en células de mamíferos, logrando de esta manera su producción en forma recombinante. Sin embargo, las proteínas obtenidas difieren en su estructura química y sus propiedades biológicas, por lo cual es necesario realizar estudios clínicos comparativos que permitan asegurar su eficiencia terapéutica. Asimismo, esta tecnología permite obtener grandes cantidades de la proteína en preparaciones casi puras. No obstante, para poder ser utilizados como bioterapéuticos es fundamental cumplir con los controles de calidad del producto terminado que garanticen su actividad biológica y, como consecuencia, aseguren una correcta relación dosis de IFN/eficiencia terapéutica (Billiau, 2006).

Históricamente, la actividad de los IFNs *in vitro* ha sido medida por su capacidad para inducir un estado antiviral en líneas celulares susceptibles. Basados en este enfoque, se han desarrollado una gran variedad de ensayos antivirales empleando distintos pares virus/células susceptibles a la infección viral. Además, la inhibición del crecimiento celular se ha sugerido como metodología factible para determinar la potencia de las preparaciones de IFN en células susceptibles. Asimismo, numerosos bioensayos han sido desarrollados con el mismo propósito. De esta manera, la ingeniería genética ha permitido la preparación de secuencias híbridas de ADN

formadas por promotores inducibles por IFN unidos a enzimas cuyas actividades están bien caracterizadas. Ejemplos de ellas son la luciferasa, fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante, entre otras. En consecuencia, se han diseñado bioensayos altamente específicos, llamados EGR (Meaguer, 2002; Oliveira y col., 2012).

En la actualidad, la Farmacopea Europea aún sugiere el empleo de ensayos de actividad antiviral para determinar la potencia de los IFNs. Sin embargo, esta metodología presenta grandes variaciones intra- e inter-ensayos inherentes al cultivo celular, a las manipulaciones técnicas, las condiciones del procedimiento y los reactivos empleados. Es un ensayo que requiere del empleo de virus, como el virus VSV. Si bien éste no representa un riesgo para los humanos, implica el uso de cabinas de seguridad biológica tipo 2 para su manipulación y la necesidad de asegurar su título infectivo y *stock* viral mediante diferentes ensayos adicionales al ensayo AVA (Girard y Fleischaker, 1984), lo que se refleja en un incremento de técnicas para llevar a cabo el objetivo buscado.

Con el propósito de reemplazar la mencionada metodología, se desarrollaron en forma preponderante, los EGRs. En ellos, la unión específica entre los IFNs-I y su receptor específico en la superficie celular, desencadena una activación transcripcional rápida de numerosos genes de respuesta a IFN; incluyendo los genes Mx, los cuales median los efectos biológicos de estas citoquinas. La inserción de un gen reportero bajo la dirección de un promotor inducible específicamente por IFNs-I dentro de una línea celular susceptible a IFN, permite el desarrollo de un bioensayo rápido, fácil y sensible (Lleonart y col., 1990). Siguiendo esta hipótesis, se han desarrollado bioensayos de gen reportero para cuantificar hIFNs utilizando distintas líneas celulares que dieron lugar a los ensayos Vero Mx-hGH (Lleonardt y col., 1990), Vero Mx-Luc (Canosi y col., 1996), Glio GFAP/lacZ, HEK293-ISRE-SEAP, CHO-ISRE-SEAP (Caserman y col., 2006) y HeLa Mx2/Luc (Seo y col., 2009), luciferasa RGA basado en células HT1080 transfectadas con el promotor de inducción temprana con IFN 6-16 (Lam y col., 2008) y luciferasa RGA basado en células U397 transfectadas con el elemento de respuesta sensible al IFN (ISRE) (Lallemand y col., 2010). Sin embargo, ninguno de ellos es recomendado por la Farmacopea Europea y de EE.UU para determinar la potencia de los hIFNs-I. Asimismo a pesar de la existencia de numerosos EGRs para hIFNs-I, ninguno tuvo en cuenta el empleo simultáneo de una línea celular que es típicamente empleada para determinar la actividad biológica de estas moléculas como lo es la línea celular WISH y el gen reportero EGFP, cuyas ventajas fueron indicadas en el desarrollo del manuscrito.

De acuerdo con lo previamente postulado, en una primera etapa de este trabajo de tesis, y teniendo en cuenta las recomendaciones de la Farmacopea Europea, se generó

una línea celular reportera para cuantificar la potencia de los IFNs-I. Células WISH, las cuales expresan naturalmente los receptores para los IFNs-I en su superficie celular, fueron modificadas genéticamente, mediante transfección estable con el vector de expresión pMx2-EGFP, donde el gen de la proteína EGFP reportera, se encuentra bajo el control del promotor Mx2 inducible específicamente por IFNs-I. En el sistema reportero generado, el porcentaje de células que expresaron EGFP, como consecuencia de la activación del promotor Mx2, se correlacionó en forma directa con la cantidad de hIFN- $\alpha$  o hIFN- $\beta$  presente en la muestra a analizar (Bürgi y col., 2011). Para cuantificar el porcentaje de células EGFP positivas, se empleó la citometría de flujo, una herramienta analítica que ha cobrado gran importancia para este tipo de ensayos, durante el último tiempo, proporcionando resultados confiables de una manera sencilla, rápida y robusta.

Dada la diversidad genotípica contenida en una línea celular recombinante, la línea WISH-Mx2/EGFP se clonó por el método de dilución límite para seleccionar un clon, que asegura que todas las células respondan de manera uniforme. El clon, denominado L1G3, fue finalmente elegido para desarrollar un EGR útil para cuantificar la potencia de los IFNs-I.

Una vez desarrollado y optimizado el EGR el mismo fue extensamente caracterizado y validado contra ensayos existentes para cumplir con el fin propuesto, obteniendo resultados exitosos. El nuevo bioensayo demostró numerosas ventajas al compararlo con el ensayo de actividad antiviral propuesto por la Farmacopea Europea para cuantificar la potencia biológica de los IFNs-I, e incluso con otros ensayos reporteros.

Dentro de las ventajas observadas para el EGR empleando la línea WISH-Mx2/EGFP (Bürgi y col., 2012), cabe destacar que:

1. Es posible utilizar una única línea celular para cuantificar la potencia de los dos tipos principales de IFNs-I: IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ .
2. Constituye un ensayo que no requiere el empleo de virus, dado que su respuesta se mide en función de la cantidad de proteína reportera generada, como consecuencia de la activación del promotor específico por parte del IFN.
3. La proteína reportera EGFP es sumamente estable al calor, pH extremos, desnaturizantes químicos, es fácil de monitorear y no requiere del agregado de un sustrato químico (como es el caso de la proteína reportera luciferasa) para ser detectada, lo cual reduce el costo y el tiempo del ensayo.

4. Como se emplea citometría de flujo o microscopía de fluorescencia para su detección, no requiere lisis celular para obtener y cuantificar a la molécula reportera, simplificando el ensayo. Tales aspectos son críticos, dado que emplear reporteros inestables o que no puedan cuantificarse fácilmente trunca los objetivos de rapidez, sencillez y reproducibilidad del ensayo.
5. En este sistema reportero, la proteína EGFP comienza a detectarse a partir de las 8 h post tratamiento con IFN, alcanzando la máxima señal de reportero al cabo de 24 h.
6. Presenta una elevada capacidad de detección representada por un bajo límite de detección de la potencia de IFN (a partir de 4 mUI/ml). Tal capacidad está asociada al sistema de lectura, dado que se utiliza como herramienta biológica al citómetro de flujo, que presenta la particularidad de detectar cantidades mínimas de fluorescencia con una buena resolución.
7. Constituye un bioensayo altamente específico, debido a que su promotor Mx2 sólo se activa en presencia de IFN-I.
8. Exhibe amplios rangos de respuesta lineal, con una sensibilidad extremadamente alta, marcando una diferencia importante con el modelo AVA.
9. Brinda una alta reproducibilidad ya que presenta coeficientes de variación intra- e inter-ensayos inferiores con respecto a los obtenidos mediante el empleo de los ensayos AVA.
10. Finalmente, a partir del estudio de la estabilidad del clon reportero, se determinó el tiempo durante el cual puede ser empleado garantizando una respuesta confiable y certera. La estabilidad del clon L1G3 fue de por lo menos 57 generaciones, lo cual implicó un total de pasajes sucesivos del mismo en cultivo durante aproximadamente 80 días.

Teniendo en cuenta las numerosas ventajas exhibidas por el EGR desarrollado mediante la obtención de la línea celular WISH-Mx2/EGFP, y con el propósito de analizar la respuesta de los IFNs-I frente a líneas celulares de naturaleza tumoral, provenientes de diferentes linajes celulares, se generaron 3 líneas reporteras adicionales (Bürgi y col., 2011). De esta manera, se desarrollaron las líneas HEp2 (carcinoma epidérmico humano), HeLa (adenocarcinoma cervical humano) y A549 (carcinoma pulmonar humano). Todas ellas fueron sometidas a evaluación del mismo modo que se procedió con la línea WISH-Mx2/EGFP, confirmándose las ventajas observadas previamente para la mencionada línea celular.

En conclusión, en la primera etapa del trabajo de tesis se generaron 4 líneas de diferente linaje celular y reporteras de la actividad de los hIFNs-I. Las mismas fueron validadas con ensayos afines, evidenciando capacidad para cuantificar la potencia de los hIFNs-I con alta sensibilidad, reproducibilidad, de manera sencilla y rápida; lo que las convierte en candidatas interesantes para reemplazar los bioensayos existentes para determinar la actividad biológica de los hIFNs-I.

En una segunda etapa de este trabajo, los cuatro modelos reporteros fueron utilizados como herramientas biológicas para el monitoreo de bibliotecas de compuestos, posibles moduladores de la actividad biológica de los hIFNs-I.

Como se mencionó previamente, debido a sus propiedades antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras, los IFNs son ampliamente utilizados como biofármacos. No obstante, estas moléculas son depuradas rápidamente del organismo, motivo por el cual se necesita el uso de reiteradas y elevadas dosis para lograr una concentración sostenida en el tiempo de los niveles terapéuticos deseados que permita cumplir con el propósito del tratamiento. Sin embargo, en diversos regímenes durante su administración, se ha evidenciado la aparición de efectos secundarios, lo que en numerosas oportunidades, conduce a la interrupción de los mismos, sin poder alcanzar el objetivo clínico buscado.

Por otra parte, se han registrado patologías en las cuales se produce una liberación excesiva de IFN endógeno, generando efectos nocivos para el organismo. En consecuencia, el IFN se presenta como una molécula central cuyo accionar debe regularse para evitar los inconvenientes clínicos mencionados. En este sentido, es indispensable incrementar su eficacia terapéutica en aquel grupo de patologías que requieran de su administración exógena y, por otro lado, bloquear sus efectos nocivos en aquel conjunto de enfermedades donde la producción de IFN endógeno constituye parte de la etiología o curso de las mismas. Es decir, que su accionar debe ser modulado/regulado para poder evitar los inconvenientes indicados. De esta manera, resulta indispensable identificar moléculas capaces de regular la actividad biológica de dichas citoquinas, para concretar este objetivo.

No obstante, el monitoreo del efecto de diferentes compuestos sobre la actividad biológica de los IFNs requiere de métodos versátiles, sencillos, robustos y que contribuyan con una elevada velocidad de procesamiento. Es por ello que, en una etapa más avanzada del presente trabajo de tesis, y contando con las nuevas herramientas biológicas para cuantificar la potencia de los hIFNs-I (EGRs), éstas fueron empleadas para monitorear bibliotecas de compuestos sintéticos y naturales, posibles moduladores de la actividad de los hIFNs-I. En total se analizaron 552 compuestos utilizando las

4 líneas celulares que dieron origen a los 4 EGRs en presencia de rhIFN- $\alpha$ 2a y rhIFN- $\beta$ 1a.

Previamente al monitoreo de las bibliotecas de compuestos se determinó para cada modelo reportero, el valor  $Z'$ , que refleja la calidad y aptitud de cada ensayo en términos de discriminación entre las muestras positivas y las muestras negativas. Idealmente, este factor debería ser superior a 0,5 para obtener buenos resultados, minimizando la aparición de falsos positivos y falsos negativos. Todos los sistemas reporteros aquí reportados presentaron valores  $Z'$  superiores a 0,7, garantizando la aptitud de los mismos para este tipo de estudios.

En una primera instancia, se analizó una biblioteca completa de 176 compuestos naturales y parte de una biblioteca sintética de compuestos (288 de los mismos), ambas cedidas gentilmente para su estudio por el Departamento de Química Biológica del HZI (Braunschweig, Alemania). Además, se estudió una biblioteca de 88 compuestos sintéticos, cedidos gentilmente para su análisis por el grupo de Química Medicinal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República (Montevideo, Uruguay).

El estudio de la biblioteca de compuestos naturales permitió identificar y caracterizar 5 compuestos, de los cuales 4 resultaron inhibidores y 1, potenciador de la respuesta de los hIFNs-I. Todos ellos afectaron en mayor medida a las líneas celulares WISH y A549.

En cuanto al monitoreo de la biblioteca de compuestos sintéticos del HZI, se seleccionaron 10 compuestos, todos ellos reguladores negativos de la actividad de los hIFNs-I. En este caso, la mayoría de ellos afectó principalmente a las líneas celulares WISH, HeLa y HEp2.

Finalmente, el monitoreo de la biblioteca de compuestos sintéticos provista por el grupo de trabajo de Uruguay reveló resultados más heterogéneos que los obtenidos con los compuestos de las restantes bibliotecas. Ese comportamiento diferencial fue dependiente de la línea celular analizada y el subtipo de IFN analizado. Es por este motivo, que se seleccionó un grupo mayor de compuestos para su caracterización. No obstante, todos ellos mostraron una respuesta inhibidora de la actividad de los IFNs evaluados, siendo detectados fundamentalmente por las líneas celulares WISH y HeLa. Teniendo en cuenta el análisis de compuestos de las 3 bibliotecas es posible concluir que la línea celular WISH fue la que exhibió mayor susceptibilidad para detectar compuestos moduladores de la respuesta de IFN.

Todos los compuestos seleccionados fueron extensamente estudiados y caracterizados mediante numerosos ensayos, con el objetivo de conocer las propiedades inherentes a cada uno de ellos y las condiciones bajo las cuales los mismos desarrollan una respuesta más notable.

El estudio de sus propiedades contempló ensayos para determinar la toxicidad de cada uno de ellos sobre cada línea celular reportera, análisis de la dosis efectiva y estudio del efecto que los mismos ejercen sobre la actividad antiviral y antiproliferativa de los hIFNs-I. Este último análisis tuvo como objetivo comparar el comportamiento de cada compuesto evaluado mediante EGR y los ensayos arriba mencionados. Para la mayoría de los casos se comprobó el comportamiento observado previamente en el EGR. Sin embargo, algunas moléculas que habían demostrado un efecto inhibitor de la potencia de los hIFNs-I, mediante su estudio por EGR, no ejercieron ningún efecto sobre la actividad AVA o AA. Esto puede atribuirse a la diferencia propia entre los ensayos, debido a su método de revelado y/o su límite de detección, entre otros.

Considerando los compuestos seleccionados a partir de la biblioteca de origen natural, se desarrollaron estudios tendientes a evaluar el nivel celular donde posiblemente ejercen su efecto inhibitor o potenciador de la actividad biológica de los hIFNs-I. Para ello, se empleó una línea reportera de origen murino que contiene las proteínas STAT1 y STAT2 unidas a proteínas reporteras y mediante microscopía de fluorescencia se monitoreó la ubicación de las mismas a diferentes tiempos post-inducción celular con el compuesto y el mIFN. De esta forma, se pudo deducir que los compuestos Pella y VioB son inhibidores de la actividad de los IFNs a nivel de unión a sus receptores específicos en la superficie celular, mientras que los compuestos naturales Sula y GepA desempeñan su efecto en un paso posterior a la traslocación de las proteínas STAT al núcleo celular. Estos últimos podrían estar actuando de diferentes maneras, inhibiendo la unión de los factores de transcripción o la activación de genes de respuesta a IFN, entre otros, pero siempre, ejerciendo su potencial inhibitor a nivel nuclear. Estos resultados son muy interesantes, dado que permitió concluir que los compuestos naturales estudiados presentan un efecto neto sobre la actividad de los IFNs-I. Es decir, como consecuencia de los ensayos realizados, se comprobó que los compuestos naturales desempeñaron la misma conducta para modular la actividad biológica de los IFNs-I tanto murinos como humanos. Además, exhibieron el mismo comportamiento al ser evaluados mediante dos sistemas reporteros diferentes, uno murino y otro humano. Ambos modelos contienen distintas construcciones reporteras, las cuales incluyen diferentes promotores inducibles específicamente por IFNs-I. En el organismo, estos promotores dirigen la expresión de proteínas efectoras involucradas en la red biológica de la vía de acción de los IFNs-I para llevar a cabo la protección del organismo frente a diferentes patógenos.

Por otro lado, se observó un incremento del gen reportero en el modelo murino al tratar las células con el compuesto Tubl, confirmando su efecto modulador positivo de la actividad biológica de la citoquina en estudio, visualizado previamente mediante el

empleo del sistema reportero Mx2/EGFP humano. El empleo de otras líneas reporteras de la actividad de los mIFNs permitió confirmar la acción inhibitoria o potenciadora de los compuestos de origen natural sobre la actividad de los IFNs-I y validar el nuevo EGR utilizado para detectar tales compuestos. Con el fin de demostrar utilidades adicionales de la nueva línea reportera y simultáneamente obtener información complementaria en relación a las propiedades de los compuestos, se evaluó la existencia de efecto residual. Con esta terminología se designa si las propiedades moduladoras de la actividad de los IFNs-I de si dichas moléculas se mantienen aún cuando son descartados del medio de incubación. Por otro lado, se analizó también, la capacidad de los mismos para revertir la activación de los IFNs; es decir, si el compuesto es capaz de ejercer su efecto inhibitor sobre la actividad del IFN aún cuando ya se ha iniciado la cascada de activación/señalización del mismo. Ambos estudios fueron realizados empleando el EGR con la línea celular WISH-Mx2/EGFP.

Los compuestos naturales evaluados con excepción del compuesto VioB, presentaron un efecto residual para modular la actividad de los IFNs. En el caso de los compuestos sintéticos, se obtuvo un efecto residual positivo sólo para los compuestos P5D7, P6C11, P28E1, P28F7 y P28G6. En general se observó un efecto residual más marcado de los compuestos naturales con relación a los compuestos sintéticos.

En cuanto a la evaluación de la reversión o potenciación de la activación de la vía del IFN, se observó la capacidad de la totalidad de los compuestos inhibidores estudiados, tanto naturales como sintéticos, para revertir dicha activación. Particularmente, en el caso del compuesto potenciador TubI, se evidenció un incremento de su efecto modulador de la actividad de los hIFNs-I, cuando el mismo se agregó 1-2 h posterior a la incubación con IFN.

Con el objetivo de completar la caracterización de los compuestos moduladores de la respuesta de los IFNs-I, previamente seleccionados, se evaluó el efecto de cada uno de ellos sobre la distribución en las distintas fases del ciclo celular. Estos estudios se realizaron mediante citometría de flujo. A su vez, para aquellos compuestos que resultaron posibles inductores de apoptosis debido a la aparición de un pico sub G1 en el histograma de contenido de ADN, se confirmó la presencia de este fenómeno mediante microscopía de fluorescencia empleando una marcación con yoduro de propidio y posterior análisis de la integridad celular.

Los compuestos seleccionados fueron evaluados en presencia y ausencia de ambos rhIFNs-I (IFN- $\beta$ 1a e IFN- $\alpha$ 2a) sobre la línea reportera WISH-Mx2/EGFP para el caso de las moléculas provenientes de la biblioteca cedida por el grupo de trabajo del HZI (Alemania); mientras que se utilizaron las líneas WISH-Mx2/EGFP y HeLa-Mx2/EGFP para las moléculas sintéticas provenientes de la biblioteca de

Uruguay. Esta diferencia se debió fundamentalmente a que los primeros mostraron un efecto semejante sobre todas las líneas reporteras ensayadas. En cambio, el segundo grupo evidenció un comportamiento diferencial según la línea reportera empleada.

A modo de conclusión general, se observaron diferencias significativas entre las células tratadas con el compuesto en estudio y las no tratadas en lo que se refiere a porcentajes de células distribuidas en cada fase del ciclo celular. Sin embargo, en la mayoría de los casos, esa conducta se debió exclusivamente al compuesto y no a un efecto del mismo sobre la actividad del IFN, debido a que células tratadas sólo con el compuesto manifestaron el mismo comportamiento. No obstante, para el caso particular del compuesto P6C11, derivado de la biblioteca del HZI, se evidenció un efecto potenciador en presencia de los IFNs produciendo una disminución en el porcentaje de células en la fase G2 y un incremento del pico sub G1.

Por otra parte, el análisis de los compuestos provenientes de la biblioteca de Uruguay en células WISH-Mx2/EGFP reflejó que el compuesto PHD81 produjo un incremento de la fracción de células que se encuentran en la fase S en presencia de ambos IFNs-I. Por otro lado, para el compuesto PHD111 se observó que cuando está solo se produce un aumento del porcentaje de células que se encuentran en fase G2 y este efecto es contrarrestado al tratar las células conjuntamente con los IFNs-I. Asimismo al analizar los compuestos seleccionados de esta biblioteca, se observaron diferencias notables en su accionar dependiendo de la línea celular empleada y el tipo de IFNs-I. Particularmente, los compuestos FV o F -que son flavonas para las cuales está reportado que presentan propiedades antitumorales- reflejaron un incremento de la fase sub G1 sobre las células HeLa-Mx2/EGFP, no así sobre las células WISH-Mx2/EGFP. Teniendo en cuenta que la línea celular HeLa es de origen tumoral resulta coherente este comportamiento observado, ya que al realizar los estudios de ciclo celular, la presencia o incremento de un pico sub G1 fue altamente indicativo de un proceso de muerte celular. Por ello, resulta adecuado que estos compuestos, que presentan propiedades antitumorales, manifiesten un comportamiento selectivo induciendo la muerte en células tumorales y no en células normales.

Los compuestos Tub1 y P6C11 indujeron la aparición de un pico sub G1 sobre la línea celular WISH-Mx2/EGFP, mientras que los compuestos F13, FVII, PHD111, FV4Br, FV17, FV18 y FV10 demostraron el mismo comportamiento, pero sobre la línea celular HeLa-Mx2/EGFP. Los estudios realizados por microscopía de fluorescencia permitieron confirmar, que todos los compuestos arriba mencionados se comportaron como inductores de apoptosis.

Debido a que la mayoría de los compuestos identificados resultaron inhibidores de la actividad de los IFNs-I, podría pensarse en su potencial terapéutico para el

tratamiento de diversas patologías que presentan una respuesta exacerbada de las mencionadas citoquinas. Un ejemplo de éstas es el Lupus Eritematoso Sistémico, donde se observa una liberación excesiva de IFN alfa.

De esta manera, para aislar compuestos o combinaciones que cumplan con dicho rol inhibitor de los incrementos patológicos de hIFN- $\alpha$  y, a su vez, para reforzar la comparación del EGR con los ensayos tradicionales AVA y AA, se evaluó el efecto combinado de algunos compuestos inhibidores. Para ello, se seleccionaron 5 compuestos sintéticos de la biblioteca de Uruguay: F13, PHD101, FVII, FV4Br, FV10. Mediante el empleo de un *software* adecuado, se diseñaron diferentes combinaciones de los mismos, las cuales fueron analizadas empleando el EGR WISH-Mx2/EGFP desarrollado en presencia de rhIFN- $\alpha$ 2a. Todas las combinaciones de compuestos estudiadas revelaron un incremento de su capacidad para modular de forma negativa la respuesta de los IFNs-I, incluso, alcanzando la completa inhibición de la actividad de la citoquina para la combinación de los 5 compuestos seleccionados. Posteriormente, se seleccionaron 3 de las combinaciones para confirmar la conducta visualizada previamente mediante EGR pero, en esta instancia, empleando los ensayos de actividad antiviral (AVA) y actividad antiproliferativa (AA).

Las combinaciones de 3 compuestos exhibieron capacidad para inhibir la actividad biológica del IFN- $\alpha$  mediante los tres ensayos llevados a cabo. En cambio, la combinación de 5 compuestos sólo demostró completa inhibición de la potencia del IFN medida por EGR y ensayo AVA y no se comportó de la misma forma para el ensayo AA. En este sentido se observó un efecto de inhibición de las enzimas deshidrogenasas responsables de la manifestación del efecto AA.

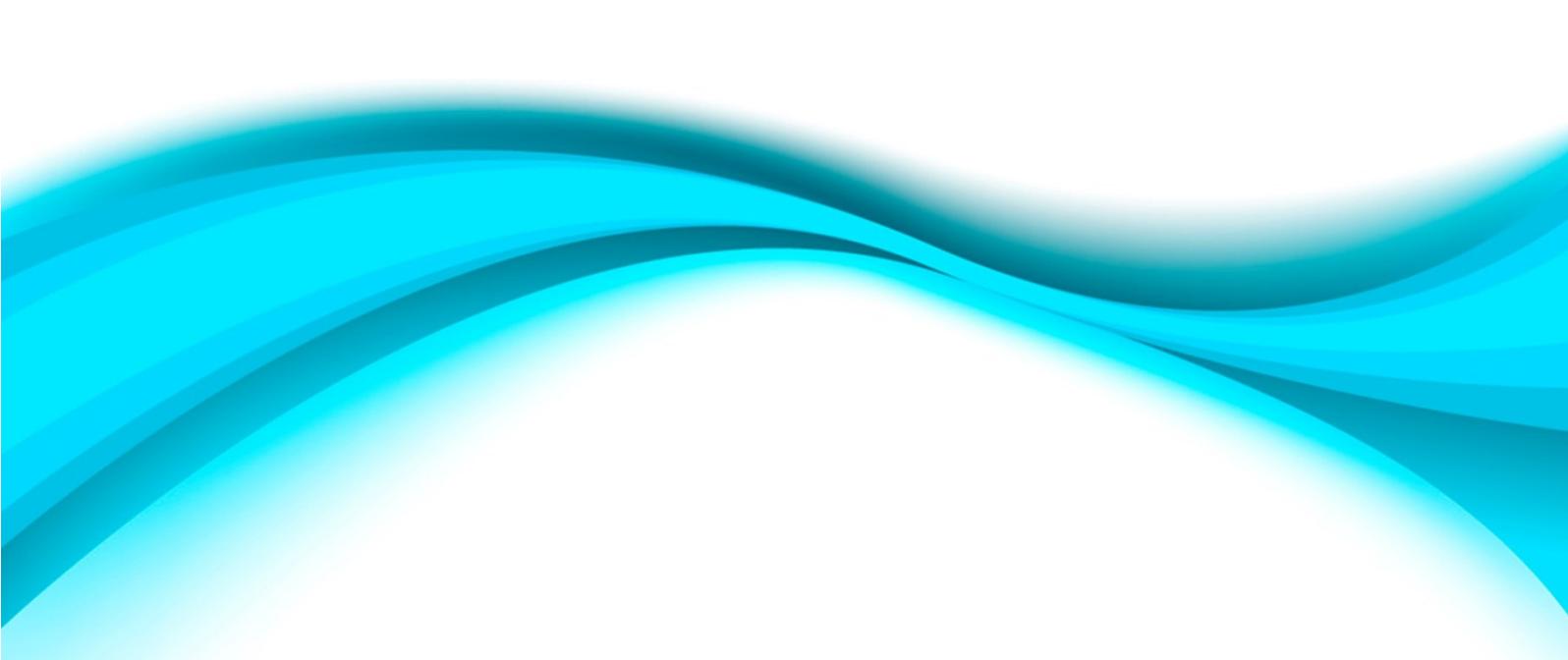
Como consecuencia del estudio y caracterización de los compuestos seleccionados, podemos concluir que las moléculas de origen natural (VioB, GepA, TubI, Pella y Sula) mostraron una respuesta moduladora más concluyente de la actividad de los hIFNs-I. Es decir, tales compuestos exhibieron mayor grado de inhibición y, a su vez, sus efectos pudieron corroborarse por dos modelos reporteros diferentes (murino y humano) mediante la activación de diferentes genes de respuesta a hIFNs-I (IRF7 y Mx2). Por su parte, los compuestos P6C11 y P28H7 de la biblioteca HZI Sint presentaron un efecto evidente sobre la inhibición de la respuesta de los hIFNs-I.

Por último, los compuestos seleccionados desde la biblioteca QuiMed-FCien exhibieron un comportamiento diferencial dependiendo del tipo de hIFN y la línea celular estudiados. No obstante, se obtuvieron resultados interesantes al evaluar combinaciones de los mismos para inhibir la respuesta de la citoquina. Por lo

tanto, resultaría de gran relevancia, continuar estudiando el comportamiento de las combinaciones, puntualmente BCE (PHD101, FVII y FV10) y BDC (PHD101, FV4Br y FVII), mediante otros ensayos, incluso evaluando el efecto inhibitor de la citoquina en un modelo *in vivo*. Por otro lado, se observó un efecto antitumoral por parte de las flavonas (FV o F) pertenecientes a esta misma biblioteca sobre las líneas celulares tumorales. Asimismo, los compuestos FV18, FV4Br y FVII mostraron un efecto pro-apoptótico incrementado en presencia de los hIFNs-I. Dado que estas flavonas presentan un efecto antitumoral *per se*, sumado a la actividad antiproliferativa e inmunomoduladora de los hIFNs-I y, teniendo en cuenta su acción conjunta, se proyecta evaluar el comportamiento *in vivo* de tales moléculas en combinación con los hIFNs-I sobre un modelo tumoral.

Finalmente, el desarrollo del presente trabajo de tesis proporcionó nuevas herramientas biológicas así como aportó nuevos conocimientos en el área de la biotecnología orientada a la cuantificación de la actividad biológica de citoquinas, en particular de los hIFNs-I. Así, el nuevo EGR constituye una metodología sencilla, robusta, específica, rápida, segura, con bajo límite de detección, de elevada sensibilidad y reproducibilidad y de gran utilidad. El mismo fue exitosamente empleado para identificar y caracterizar moléculas con capacidad para modular la potencia biológica de las citoquinas en estudio.

Como perspectivas futuras se plantea evaluar la posible utilización terapéutica de los candidatos seleccionados y caracterizados, los cuales podrían contribuir al tratamiento de importantes patologías humanas.



# BIBLIOGRAFÍA

" La ciencia más útil es aquella cuyo fruto es el más comunicable "

Leonardo Da Vinci

**BIBLIOGRAFIA**

- Arnheiter, H.; M. Frese; R. Kamadur; E. Meier, and O. Haller. (1996) *Mx transgenic mice-animal models of health*. *Curr Top Microbio* 206:119-147.
- Asano, A.; Jin, H.; Watanabe, T. (2003) *Mouse Mx2 gene: organization, mRNA expression ante the role if the interferon-response promoter in its regulation*. *Gene* 306 (2003) 105-113.
- Batteux, F., Palmer, P., Daeron, M., Weill, B., Lebon, P. (1999) *FCgammaRII (CD32)-dependent induction of interferon-alpha by serum from patients with lupus erythematosus*. *Eur. Cytokine Netw.* (1999) 10(4): 509-514.
- Belluti, F.; Fontana, G.; Dal Bo, L.; Carenini, N.; Giommarelli, Ch.; Zunino, F. (2010) *Design, synthesis and anticancer activities of stilbene-coumarin hybrid compounds: Identification of novel proapoptotic agents*. *Bioorgan Med Chem* 18(2010) 3543-3550.
- Bekisz, J.; Schmeisser, H.; Hernandez, J.; Goldman, N.; Zoon, K. (2004) *Human interferons alpha, beta and omega*. *Growth factors* 22 (4): 243-251.
- Billiau, A. (2006) *Interferon: the pathways of discovery I. Molecular and cellular aspects*. *Cytokine Growth F R.* 17: 381-409.
- Bollati-Fogolín M. and Müller W. (2005) *Virus free, cell-based assay for the quantification of murine type I interferons*. *J Immunol Methods*, 306:169-175.
- Bonjardim, C.; Ferreira, P.; Kroon, E. (2009) *Interferons: Signaling, antiviral and viral evasion*. *Immunol Lett* 122 (2009) 1-11.
- Bürgi, M.; Prieto, C.; Oggero, M.; Bollati Fogolín, M.; Etcheverrigaray, M.; Kratje, R. (2011) *New reporter cell clones to determine the biological activity of human type I Interferons*. *BMC Proceedings* 2011 5(Suppl 8):P4.
- Bürgi, M.; Prieto, C.; Etcheverrigaray, M.; Kratje, R.; Oggero, M.; Bollati Fogolín, M. (2012) *WISH cell line: From the antiviral system to a novel reporter gene assay to test the potency of human IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$* . *J Immunol Methods* 381 (2012) 70–74.
- Caserman, S.; Menart, V.; Gaines Das, R.; Williams, S.; Meager, A. (2006) *Thermal stability of teh WHO international standard of interferon alpha 2b (IFN- $\alpha$ 2b): Application of new reporter gene assay for IFN-  $\alpha$ 2b potency determinations*. *J Immunol Methods* 319 (2007) 6-12.
- Canosi, U., Mascia, M., Gazza, L., Serlupi-Crescenzi, S., Donini, F., Antonetti, F., Gall, G., (1996). *A highly precise reporter gene bioassay for type I interferon*. *J Immunol Methods* 199, 69.

- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C., (1994). *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science 263 (5148),802.
- Chuntharapai, A., Lai, J., Huang, X., Gibas, V., Kim, K.J., Presta, L.G., Stewart, T.A. (2001) *Characterization and humanization of a monoclonal antibody that neutralizes human leukocyte interferon: a candidate therapeutic for IDDM and SLE*. Cytokine (2001) 15(5): 250-260.
- Cohen, S.N.; Chang, A.C.Y.; Hsu, L. (1972) *Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA*. Proc Natl Acad Sci 69: 2110-2114.
- Contente, S., Kenyon, K., Rimoldi, D., Friedman, R.M., (1990). *Expression of gene rrg is associated with reversion of NIH 3T3 transformed by LTR-c--H-ras*. Science 249, 796.
- Cook, J.; Mitchell, J. (1989) *Viability measurements in mammalian systems*. Anal. Biochem. 179: 1-7.
- Cotlet, M.; Hofkens, J.; Habuchi, S.; Dirix, G.; Van Guyse, M.; Vanderleyden, J.; De Schryver, F. (2001) *Identification of different emitting species in the red fluorescen protein DsRed by means of ensemble and single-molecule spectroscopy*. Proc Natl Acad Sci USA 98:14398–14403.
- Deitch, A.D.; Law, H.; deVere White R. (1982) *A stable propidium iodide staining procedure for flow cytometry*. J Histochem Cytochem 30,967.
- De la Maza, L., Peterson, E., (1988). *Dependence of the in vitro antiproliferative activity of recombinant gamma IFN on the concentration of tryptophan in culture medium*. Cancer Res. 48, 346.
- De Maeyer, E.; De Maeyer-Guignard, J. (1994) Interferons. En: *The cytokine handbook, 2nd ed.* (Ed.: Thompson, A.W.). Academic Press Limited, San Diego, EE.UU., cap. 15, p. 265-288.
- de Veer, M.J.; Holko, M.; Frevel, M.; Walker, E.; Der, S.; Paranjape, J.M.; Silverman, R.H.; Williams, B.R. (2001) *Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays*. J Leukoc Biol 69: 912 920.
- Ellman J, Stoddard B, Wells J. (1997) *Combinatorial thinking in chemistry and biology*. Proc Natl Acad Sci 94:2779-82.
- Ekins, S. (2006) *Algorithms for network analysis in systems—ADME/Tox using the MetaCore and MetaDrug platforms*. Xenobiotica 2006, 36, 877–901.
- Ekins, S.; Shimada, J.; Chang, C. (2006) *Application of data mining approaches to drug delivery*. Adv Drug Deliv Rev 2006, 58, 1409–1430.

- Farmacopea Europea 6.3, 2009. Interferon Beta-1a Concentrated Solution. Council of Europe, Strasbourg, p. 4177.
- Familletti, P.C.; Rubinstein, S.; Petska, S. (1981) *A convenient and rapid cytopathic effect inhibition assay for interferon*. *Methods Enzymol.* 78: 387-394.
- Feld JJ, Hoofnagle JH. (2005) *Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C*. *Nature.* 2005;436:967-72.
- Felgner, P.; Gadek, T.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H.W.; Wenz, M.; Northrop, J.P.; Ringold, G.M.; Danielsen, M. (1987) *Lipofection: a highly efficient, lipid mediated DNA transfection procedure*. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7413-7417.
- Files, J.; Gray, J.; Do, L.; Foley, W.; Gabe, J.; Nestaas, E.; Pungor, Jr. E. (1998). *A Novel Sensitive and Selective Bioassay for Human Type I Interferons*. *J Interferon Cytokine Res* 18:1019-1024.
- Foulis, AK., Farquharson, MA, Meager, A. (1987) *Immunoreactive alpha-interferon in insulin-secreting beta cells in type I diabetes mellitus*. *Lancet* (1987) 2:1423-1427.
- Fogh, J.; Trempe, G. (1975) *Human Tumor Cells In Vitro* (J. Fogh, ed.), Plenum, 1975, 115-141.
- Frank An, W.; Tolliday, N. (2010) *Cell-Based assay for High-Throughput Screening*. *Mol Biotechnol* (2010) 45:180-186.
- Fray, M.D.; Mann, G.E.; Charleston, B. (2001). *Validation of an Mx/CAT reporter gene assay for the cuantification of bovine type-I interferon*. *J Immunol Methods* 249 (2001) 235-244.
- Freshney, R. (2000a) *Cell lines*. En: *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. Wiley Liss Inc, New Jersey, EE.UU., cap. 12, p. 177-193.
- Freshney, R. (2000b) *Cryopreservation*. En: *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. Wiley-Liss Inc, New Jersey, EE.UU., cap. 16, p. 297-308.
- Freshney, R. (2000c) *Cloning and selection*. En: *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. Wiley-Liss Inc, New Jersey, EE.UU., cap. 13, p. 195-213.
- Freshney, R. (2000d) *Serum-free media*. En: *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. Wiley-Liss Inc, New Jersey, EE.UU., cap. 9, p. 105-120.
- Fried, J.; Perez, AG.; Clarkson BD. (1976) *Flow cytofluorometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide. Properties of the method and mathematical analysis of the data*. *J Cell Biol* 71, 172.

- Gallop MA, Barrett RW, Dower WJ, Fodor SP, Gordon EM.(1994) *Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 1. Background and peptide combinatorial library.* J Med Chem 37:1233-51.
- Gewert, Dr.; Moore, G.; Tilleray, V.J.; Clemens, MJ. (1984) *Inhibition of cell proliferation by IFN $\alpha$ . Effect on cell division and DNA synthesis in human lymphoblastoid (Daudi) cells.* Eur J Biochem 1984;159:619-25.
- Giard, D.J., Fleischaker, R.J., Fabrikant, M. (1982) *Effect of temperature on the production of human fibroblast interferon (41411).* Proc Soc Exp Biol Med 170: 155-159.
- Girard, D.J., Fleischaker, R.J., (1984). *A study showing a high degree of inter-laboratory variation in the assay of human interferon.* J Biol Stand 12, 265.
- Gordon EM, Barrett RW, Dower WJ, Fodor SP, Gallop MA. (1994) *Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 2. Combinatorial organic synthesis, library screening strategies, and future directions.* J Med Chem 37:1385-401.
- Gorman, C. M.; Moffat, L. F.; Howard, B.H. (1982) *Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells.* Mol Cell Biol 2, 1044-1051.
- Goodbourn, S.; Didcock, L. And Randall, R. (2000). *Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures.* J Gen Virol. 81, 2341-2364.
- Green, A.E.; Athereya, B.; Lehr, H.B.; Coriell, L.L. (1967) *Viability of cultures following extended preservation in liquid nitrogen.* Proc Soc Exp Biol Med 124: 1302-1307.
- Gribbon, P.; Sewing, A. (2005) *High-throughput drug discovery: What can we expect from HTS?* Drug Discov Today 2005, 10, 17–22.
- Groskreutz D, Schenborn ET. (1997) *Reporter systems.* Methods Mol Biol. 1997;63:11-30.
- Grossberg, SE.; Sedmak, JJ. (1984) *Assays of interferons.* In: Billau, A. (Ed.), Interferon, General and Applied Aspects, vol. 1. Elsevier, Amsterdam, (1984) p. 189.
- Haller, O.; Frese, M.; Kochs, G. (1998) *Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses.* Rev Sci Tech 17(1) 220-230.
- Haller, O.; Kochs, G. (2002) *Interferon-Induced Mx Proteins: Dynamine-Like GTPases with Antiviral Activity.* Blackwell Munksgaard. Traffic 2002; 3:710-717.
- Haller, O.; Kochs, G.; Weber, F. (2007). *Interferon, Mx, and viral countermeasures.* Cytokine Growth F R 18 (2007) 425-433.

- Hammerling, U., Bongcam-Rudloff, E., Setterblad, N., Kroon, R., Rehnstrom, A.K., Viitanen, E., Andersson, G., Sjodin, L., (1998). *The b-Gal interferon assay: a new, precise, and sensitive method*. J Interferon Cytokine Res. 18, 451.
- Hasegawa, T. (1996) *History and evolution of culture maintainance and preservation techniques*. En: Maintaining cultures for biotechnology and industry. (Eds.: Hunter-Cevera, J.C., Belt, A.). Academic Press, Inc., San Diego, EE.UU., cap. 2, p. 15-27.
- Hauser, H. (1997) *Heterologous expression of genes in mammalian cells*. En: Mammalian cell biotechnology in protein production. (Eds.: Hauser, H., Wagner, R.). Walter de Gruyter & Co., Berlín, Alemania, cap. 1.1, p. 3-27.
- Hawley Nelson, P.; Ciccarone, V.; Gebevehu, G.; Jessee, J. (1993) *A new polycationic liposome reagent with enhanced activity for transfection*. FASEB J. 7: A167.
- Hawley, T.; Telford, W.; Ramezani, A.; Hawley, R. (2001) *Four-Color Flow Cytometric Detection of Retrovirally Expressed Red, Yellow, Green, and Cyan Fluorescent Proteins*. BioTechniques 30:1028-1034.
- Hay, R.J. (1986) *Preservation and characterisation*. En: Animal cell culture. A practical approach. (Ed.: Freshney, R.I.). IRL Press, Oxford, Inglaterra, cap. 4, p. 71-112.
- Hayflick, L. (1961) *The establishment of a line (WISH) of human amnion cells in continuous cultivation*. Exp Cell Res 23: 14-20.
- Horowski, R. (2002) *Multiple sclerosis and interferon beta-1b, past, present and future*. Clin eurol Neurosurg (2002) 104: 259-264
- Horton, H.; Hernandez, P.; Parker, Su.; Barnhart, K. (1999) *Antitumor effects of interferon- $\omega$ : in vivo therapy of human tumor xenografts in nude mice*. Cancer Res. 59: 4064-4068.
- Huang, X., Yuang, J., Goddard, A., Foulis, AK., James, RF., Lernmark, A., Pujol-Borrel, R., Ravinovich, A., Somoza, N., Stewart, TA. (1995) *Interferon expression in the pancreases of patients with type I diabetes*. Diabetes (1995) 44: 658-664.
- Isaacs, A.; Lindenmann, J. (1957) *Virus interference I. The interferon*. Proc R Soc London Ser. B 147: 258-267.
- Jakobs, S.; Subramaniam, V.; Schöle, A.; Jovin, T.; Hell, S. (2000) *EGFP and DsRed expressing cultures of Escherichia coli imaged by confocal, two-photon and fluorescence lifetime microscopy*. FEBS Letters 479 (2000) 131-135.

- Jorgensen, J.; Johansen, A.; Hegseth, M.; Zou, J.; Robertsen, B.; Collet, B.; Secombes, C. (2007) *A recombinant CHSE-214 cell line expressing an Mx1 promoter-reporter system responds to both interferon type I and type II from salmonids and represents a versatile tool to study the IFN-system in teleost fish*. Fish Selfish Immun 23 (2007) 1294-1303.
- Kataoka, T.; Oh-hashii, F.; Sakurai, Y.; Ida, N. (1982) *Characteristics of in vitro Antiproliferative Activity of Human Interferon- $\beta$* . Cancer Chemoth Pharm (1982) 9:75-80.
- Kottenko, SV.; Gallagher, G.; Baurin, VV.; Lewis-Antes, A.; Shen, M.; Shah, NK.; Langer, JA.; Sheikh, F.; Dickensheets, H.; Donnelly, RP. (2003) *IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex*. Nat Immunol 4(1):69-77.
- Kugel, D.; Pulverer, J.; Köster, M.; Hauser, H., Staeheli, P. (2010) *Novel nonviral Bioassays for Mouse Type I and Type III Interferon*. J Interferon Cytokine Res. 2011 Apr;31(4):345-9. doi: 10.1089/jir.2010.0079. Epub 2010 Dec 7.
- Kunzi, M.; Pitha, P. (2003) *Interferon targeted genes in host defense*. Autoimmunity 36 (8): 457 461.
- LaFleur, D.W., Nardelli, B., Tsareva, T., Mather, D., Feng, T., Semenuk, M., Taylor, K., Buergin, M., Chinchilla, D., Roschke, V., Chen, G., Ruben, S.M., Coleman, T.A., Moore, P.A., (2001). *Interferon-kappa, a novel type I interferon expressed in human keratinocytes*. J Biol Chem 276, 39765.
- Lefevre, F.; Guillomot, M.; D'Andrea, S.; Battegay, S.; La Bonnardiere, C. (1998) *Interferon-delta: the first member of a novel type I interferon family*. Biochimie 80: 779-788.
- Leibo, S.P.; Mazur, P. (1971) *The role of cooling rates in low-temperature preservation*. Cryobiology 8 (5): 447-452.
- Lengyel, P. (1982). *Biochemistry of interferons and their actions*. Annu Rev Biochem 52,251.
- Lewis, JA. Biological assays of interferon. In: Clemens, MJ., Morris, AG., Gearing, AJH. (Eds.), (1987) *Lymphokines and interferons: a practical approach*. IRL Press, Oxford, (1987) p. 73
- Lewis, J.A., (1995). *A sensitive biological assay for interferons*. J Immunol Methods 185, 9.
- Leonart, R., Naïf, D., Browning, H., Weissman, C., (1990). *A novel, quantitative bioassay for type I interferon using a recombinant indicator cell*. Biotechnology 8, 1263.

- Lopez, C.B y Hermesh, T, (2011) *Systemic responses during local viral infections: type I IFNs sound the alarm*. *Curr Opin Immunol* 23(4): 498-499.
- Lovelock, J.E.; Bishop, M.W.H. (1959) *Prevention of freezing damage to living cells with dimethyl sulphoxide*. *Nature* 183: 1394-1395.
- Lowry, R. (2008) *One Way ANOVA – Independent Samples*. Vassar.edu. Retrieved on December 4th, 2008.
- Lu, J.; Chuntharapai, A.; Beck, J.; Bass, S.; Ow, A.; De Vos, A.M.; Gibbs, V.; Jin Kim, K. (1998) *Structure-function study of the extracellular domain of the human IFN- $\alpha$  receptor (hIFNAR1) using blocking monoclonal antibodies: the role of domains 1 and 2*. *J Immunol*. 160: 1782-1788.
- Madin, S.H.; Darby, N.B.Jr. (1958) *Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin*. *Proc Soc Exp Biol Med* 98: 574-576.
- Malo, N.; Hanley, J.; Cerquozzi, S.; Pelletier, J.; Nadon, R. (2006) *Statistical practise in high-throughput screening data analysis*. *Nat Biotechnol*. 2006 Feb;24(2):167-75
- Mandel, M.; Higa, A. (1970) *Calcium-dependent bacteriophage DNA infection*. *J Mol Biol* 53 (1): 159-162.
- Martal, J.L.; Chêne, N.M.; Huynh, L.P.; L'Haridon, R.M.; Reinaud, P.B.; Guillomot, M.W.; Charlier, M.A.; Charpigny, S.Y. (1998) *IFN-tau: a novel subtype I IFN1. Structural characteristics, non ubiquitous expression, structure-function relationships, a pregnancy hormonal embryonic signal and cross species therapeutic potentialities*. *Biochimie* 80: 755-777.
- Martis, E.A.; Radhakrishnan, R.; Badve, R.R. (2011) *High-throughput screening: The hits and leads of drug discovery—An overview*. *J Appl Pharm Sci* 2011, 1, 2-10.
- Mather, J.P. (1991) *Optimizing cell and culture environment for production of recombinant proteins*. En: *Methods in Enzymology*, Vol. 185: Gene expression technology. (Ed.: Goeddel, D.). Academic Press, Inc., San Diego, EE.UU., p. 567-577.
- Meager, A. (1987) *Quantitation of interferons by antiviral assays and their standardization*. In: Clemens, MJ., Morris, AG., Gearing, AJH. (Eds.), *Lymphokines and interferons: a practical approach*. IRL Press, Oxford, (1987) p. 129.
- Meager, A. (2002) *Biological assays for interferons*. *J Immunol Methods* 261: 21-36.

- Mire-Sluis, A.R. (1995a) *Immunoassays for detecting cytokines: What are they really measuring?* J Immunol Methods 186: 157-160.
- Mire-Sluis, A.R.; Page, L.; Thorpe, R. (1995b) *Quantitative cell line based bioassays for human cytokines.* J Immunol Methods 187: 191-199.
- Mire-Sluis, A.R.; Page, L.A.; Meager, A.; Igaki, J.; Lee, J.; Lyons, S.; Thorpe, R. (1996) *An anti cytokine bioactivity assay for interferons- $\alpha$ , - $\beta$  y - $\omega$ .* J Immunol Methods 195: 55-61.
- Mirazo S., Oggero M., Frank R., Kratje R., Müller W., Bollati-Fogolín M. (2007) *Evaluación del efecto de compuestos naturales sobre la actividad de los Interferones de tipo I.* Poster Presentation in XII Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias, Sierras de Minas, Uruguay, September 28 - 30.
- Mishra, K.P.; Ganju, L.; Sairman, M.; Banerjee, P.K.; Sawhney, R.C. (2008) *A review of high throughput technology for the screening of natural products.* Biomed Pharmacother 62 (2008) 94-98.
- Moore, A.E.; Sabachewsky, L.; Toolan, H.W. (1955) *Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells.* Cancer Res. 15: 598-602, 1955.
- Nakade, K.; Handa, H.; Nagata, K. (1997). *Promoter structure of the MxA gene that confers resistance to influenza virus.* FEBS Letters 418 (1997) 315-318.
- Nederman, T.; Karlström, E.; Sjödin, L. (1990) *An in vitro bioassay for quantitation of human interferons by measurements of antiproliferative activity on a continuous human lymphoma cell line.* Biologicals 18 (1): 29-34.
- Nestle, F.O., Conrad, C., Tun-Kyi, A., Homey, B., Gombert, M., Boyman, O., Burg, G., Liu, Y.J., Gilliet, M. (2005) *Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon- production.* J Exp Med (2005) 202: 135 - 143.
- Nolan, G.P. (2007) *What's wrong with drug screening today.* Nat Chem Biol. 3, 187.
- Nunez, R. (2001) *DNA Measurement and Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry.* Curr Issues Mol Biol (2001) 3(3):67-70
- O'Hara, D.; Xu, Y.; Liang, Z.; Reddy, M.; Wu, D.; Litwin, V. (2011) *Recomendations for the validation of flow cytometric testing during drug development: II assay.* J Immunol Methods 363 (2011) 120-134.
- Oliveira, E.; Lima, B.; dos Santos, B.; Moura, W.; Nogueira, A. (2012) *Potency determination of recombinant IFN-alpha base don phosphorylated STAT1 using flow cytometry.* J Immunol Methods 375 (2012) 271-275.

- Papayannopoulou, T.; Nakamoto, B.; Yokochi, T., Chait, A.; Kannagi, R. (1983) *Human erythroleukemia cell line (HEL) undergoes a drastic macrophage-like shift with TPA*. Blood 62: 832-845, 1983.
- Pachner, AR., Dail, D., Pak, E., Narayan, K. (2005) *The importance of measuring IFN- $\beta$  bioactivity: Monitoring in MS patients and the effect of anti- IFN  $\beta$  antibodies*. J Neuroimmunol. (2005) 166: 180-188.
- Pestka, S.; Kelder, B.; Familletti, P.C.; Moschera, J.; Crowl, R. (1983) *Molecular weight of the functional unit of human leukocyte, fibroblast and immune interferons*. J Biol Chem 258 (16): 9706-9709.
- Plataniias, L.C., (2005). *Mechanisms of type-I- and type-II-interferon mediated signalling*. Nat Rev Immunol. 5, 375.
- Pulverer, JE.; Rand, U.; Lienenklaus, S.; Kugel, S.; Zietara, N.; Kochs, G.; Naumann, R.; Weiss, S; Staeheli, P.; Hauser, H.; Koster, M. (2010). *Temporal and spatial resolution of type I and III IFN responses in vivo*. J Virol 84(17):8626-8638.
- Prummer, O.; Streichan, U.; Heimpel, H.; Porzolt, F (1994) *Sensitive antiproliferative neutralization assay for the detection of neutralizing IFN-alpha and IFN-beta antibodies*. J Immunol Methods. 1994 May 2;171(1):45-53.
- Rachmawati, H.; Poelstra, K.; Beljaars, L. (2004) *The use of cytokines and modified cytokines as therapeutic agents: present state and future perspectives*. En: Recent research development in immunology, Vol. 6. Research Signpost, Kerala, India, cap. 2, p.191-214.
- Rabinovich PS (1993) *Practical considerations for DNA content and cell cycle analysis*. Ann Ny Acad Sci. Principles and Application. Baltimore: Williams and Wilkins, 117p.
- Richards, KH. and Macdonald, A. (2011) *Putting the brakes on the anti-viral response: negative regulators of type I interferon (IFN) production*. Microbes Infect 13(2011)291-302.
- Roisman, L.C.; Piehler, J.; Trosset, J.; Scheraga, H.A.; Schreiber, G. (2001) *Structure of the interferon-receptor complex determined by distance constraints from double mutant cycles and flexible docking*. PNAS 98 (23): 13231-13236.
- Ronni, T., Meleń, K., Malygin, A., Julkunen, J., (1993). *Control of IFN-inducible MxA gene expression in human cells*. J Immunol 141, 1715.
- Rosental, N (1987) *Identification of regulatory elements of cloned genes with functional assays*. Methods Enzymol 152, 704-720.

- Rubinstein, S.; Familletti, P.C.; Pestka, S. (1981) *Convenient assay for interferons*. J Virol 37 (2): 755-758.
- Runkel, L.; Pfeffer, L.; Lewerenz, M.; Monneron, D.; Yang, C.H.; Murti, A.; Pellegrini, S.; Goelz, S.; Uzé, G.; Mogensen, K. (1998a) *Differences in activity between  $\alpha$  and  $\beta$  type I interferons explored by mutational analysis*. J Biol Chem 273 (14): 8003-8008.
- Russell-Harde D, Wagner TC, Perez HD, Croze E. (1999). *Formation of a uniquely stable type I interferon receptor complex by interferon  $\beta$  is dependent upon particular interactions between interferon  $\beta$  and its receptor and independent of tyrosine phosphorylation*. Biochem Bioph Res Co 255: 539-544.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989a) *Bacterial media, antibiotics and bacterial strains*. En: Molecular Cloning. A laboratory Manual. (Ed.: Nolan, C.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU., apéndice A.5.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989b) *Plasmid vectors*. En: Molecular Cloning. A laboratory Manual. (Ed.: Nolan, C.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU., cap. 1, p. 1.1-1.110.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989c) *Spectrophotometric determination of the amount of DNA or RNA*. En: Molecular Cloning. A laboratory Manual. (Ed.: Nolan, C.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU., apéndice E.5.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989d) *Gel electrophoresis of DNA*. En: *Molecular Cloning*. A laboratory Manual. (Ed.: Nolan, C.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU., cap. 6, p. 6.1-6.62.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989e) *Analysis and cloning of eukaryotic genomic DNA*. En: Molecular Cloning. A laboratory Manual. (Ed.: Nolan, C.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU., cap. 9, p. 9.1-9.62.
- Samuel, C.E., (1987). *Interferon induction of the antiviral state proteins induced by interferons and their possible roles in the antiviral mechanisms of action*. En: Pfeffer, L.M. (Ed.), Interferon Actions. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 110.
- Samuel, C. E., (2001). *Antiviral Actions of Interferons*. Clin Microbiol Rev, Oct. 2001. P. 778-809.
- Scherer, WF.; Syverton, JT.; Gey, GO. (1953) *Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix*. J Exp Med. 1953 May; 97(5):695-710.

- Sekar, V., Atmar, V.J., Joshi, A.R., Krim, M., Kuehn, G., (1983). *Inhibition of ornithine decarboxylase in human fibroblast cells by type I and II interferons*. Biochem Biophys Res Commun 114, 950.
- Selmi C, Lleo A, Zuin M, Podda M, Rossaro L, Gershwin ME. (2006) *Interferon alpha and its contribution to autoimmunity*. Curr Opin Investig Drugs. (2006); 7(5):451-6.
- Sen, G.C.; Lengyel, P. (1992) *The interferon system. A bird's eye view of its biochemistry*. J Biol Chem 267: 5017-5020.
- Seo, Y.J., Kim, G.H., Kwak, H.J., Nam, J.S., Lee, H.J., Suh, S.K., Baek, K.M., Sohn, Y. W., Hong, S.H., (2009). *Validation of a HeLa Mx2/Luc reporter cell line for the quantification of human type I interferons*. Pharmacology 84 (3)135.
- Sheppard, P.; Kindsvogel, W.; Xu, W.; Henderson, K.; Schlutsmeyer, S.; Whitmore, TE. (2003) *IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R*. Nat Immunol 2003;4:63-8.
- Simon, A.; J. Fäh; O. Haller and P. Staeheli. (1991) *Interferon-regulated Mx genes are not responsive to interleukin-1, tumor necrosis factor, and other cytokines*. J Virol 65:968-971.
- Smilovick, V.; Caserman, S.; Fonda, I.; Gabert-Porekar, V.; Menart, V. (2008). *A novel reporter gene assay for interferons based on CHO-K1 cells*. J Immunol Methods 333 (2008) 192-196.
- Sommereyns, C.; Paul, S.; Staeheli, P.; Michiels, T. (2008) *IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo*. PLOS Pathog 4(3):e1000017.
- Song, XR., Torphy, TJ., Griswold, DE., Shealy, D. (2002) *Coming of age: anti-cytokine therapies*. Mol Interv (2002) 2(1): 36-46.
- Sotoca Momblona, JM. (1999) *Cuarenta años de interferones*. Farm Hosp (1999) 23(4): 205-213.
- Soule, HD; Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. (1973). *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma*. J Natl Cancer I 51(5): 1409–1416.
- Staeheli, P., (1990). *Interferon-induced genes and the antiviral state*. Adv Virus Res. 38, 147.
- Stockwin, LH., Holmes, S. (2003) *The role of therapeutic antibodies in drug discovery*. Drug Discov. Today (2003) 31(2): 433-436.

- Szymasni, P.; Markowicz, M.; Mikiciuk-Olasik, E. (2012) *Adaptation of High Throughput Screening in Drug Discovery—Toxicological Screening Tests*. *Int J Mol Sci*. 2012; 13(1): 427–452.
- Tanaka, N.; Sato, M.; Lamphier, MS.; Nosawa, H.; Oda, E.; Noguchi, S. (1998) *Type I interferons are essential mediators of apoptotic death in virally infected cells*. *Genes cells* 1998; 329-37.
- Uddin, S. and Plataniias L. (2004). *Mechanisms of Type-I Interferon Signal Transduction*. *J Biochem Mol Biol*, Vol. 37, No 6, pp. 635-641.
- Vancott, J.; McNeal, M.; Choi, A.; Ward, R. (2003). *The role of Interferons in Rotavirus Infections and Protection*. *J Interf Cytok Res*. March 2003, 23(3): 163-170.
- Vilcek, J.; (2006) *Fifty Years of Interferon Research: Aiming at a Moving Target*. *Immunity* 25, 343-348.
- Wang, E.; Pfeffer, L.M.; Tamm, I, (1981). *Interferon  $\alpha$  induces a protein kinase C- $\epsilon$  (PKC- $\epsilon$ ) gene expression and a 4.7 Kb PKC- $\epsilon$  related transcript*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 78,6281.
- Wang, Y., Youngster, S., Bausch, J., Zhang, R., McNemar, C., Wyss, D.F. (2000). *Identification of the major positional isomer of pegylated interferon alpha-2b*. *Biochemistry* 39, 10634-10640.
- Wang, Y., Youngster, S., Grace, M., Bausch, J., Bordens, R., Wyss, D.F. (2002) *Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications*. *Adv. Drug Deliv Rev* 54, 547-570.
- Warr WA. (1997) *Combinatorial chemistry and molecular diversity. An overview*. *J Chem Inf Comp Sci* 37:134-40
- Witlock, c., Muller-Sieburg, C. (1990). *Long-Term B lymphoid cultures from murine bone marrow. Establishment and cloning by using stromal cell line AC 6.21*. En: *Methods in Molecular Biology. Animal Cell Culture*. (J. Pollard, J. Walker, eds.) The Human Press Inc. Clifton, EE.UU., pp. 303.322.
- Xing, Z., Wang, J. (2000) *Consideration of cytokines as therapeutic agents or targets*. *Curr Pharm Des* 6, 599-611.
- Zhang, G.; Gurtu, V.; Kain, S. (1996). *An Enhanced Green Fluorescent Protein Allows Sensitive Detection of Gene Transfer in Mammalian Cells*. *Biochem Bioph Res Co* 227, 707-711
- Zhang, J.; Chung, T.; Oldenburg, K.; (1999). *A simple statistical parameter for use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays*. *J Biomol Screen* 4(2) 67-73.

- Zhou, A., Hassel, B.A., Silverman, R.H., (1993). *Expression cloning of 2-5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action*. Cell 72, 753



---

Dra. Mariela Bollati Fogolín



---

Dr. Ricardo Kratje



---

Lic. María de los Milagros Bürgi