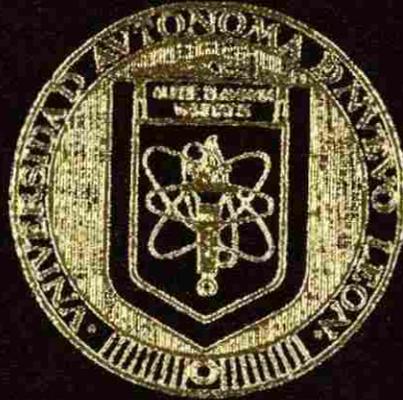


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



APLICACION DE UN PROMOTOR INDUCIBLE POR
CAMPOS ELECTROMAGNETICOS PARA MANIPULAR
LA EXPRESION DE LUCIFERASA COMO
GENE REPORTERO

POR:
ABRAHAM OCTAVIO RODRIGUEZ DE LA FUENTE

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN MICROBIOLOGIA

MARZO 2008

TD

Z5320

FCB

2008

.R62



1020160701



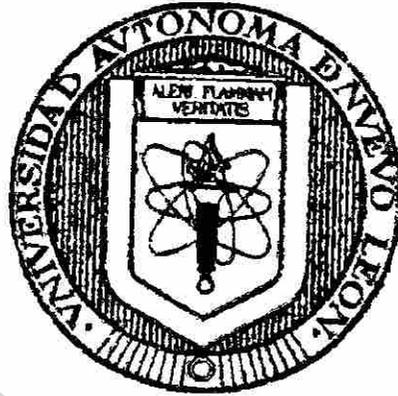
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



APLICACION DE UN PROMOTOR INDUCIBLE POR
CAMPOS ELECTROMAGNETICOS PARA MANIPULAR
LA EXPRESION DE LUCIFERASA COMO
GENE REPORTERO

UANL

POR:

ABRAHAM OCTAVIO RODRIGUEZ DE LA FUENTE

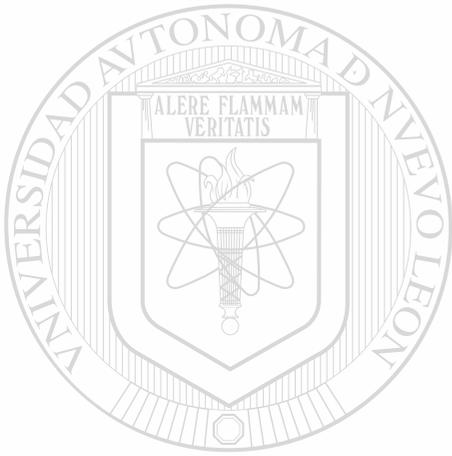
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN MICROBIOLOGIA

MAR 3 2008

1466608

TD
Z5320
FCB
2008
.R62



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4- Septiembre - 08
Acreditación de la UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**APLICACIÓN DE UN PROMOTOR INDUCIBLE POR CAMPOS
ELECTROMAGNÉTICOS PARA MANIPULAR LA
EXPRESIÓN DE LUCIFERASA COMO
GENE REPORTERO**

Por

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

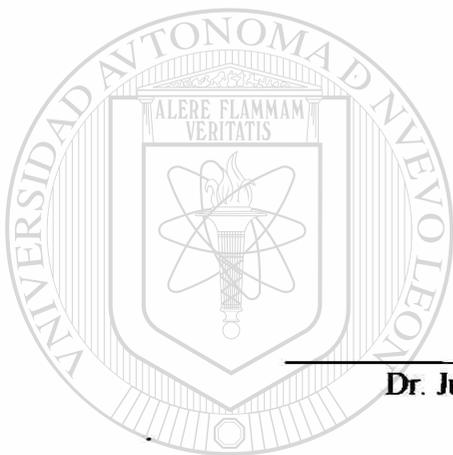
ABRAHAM OCTAVIO RODRÍGUEZ DE LA FUENTE

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad
en Microbiología**

Marzo, 2008

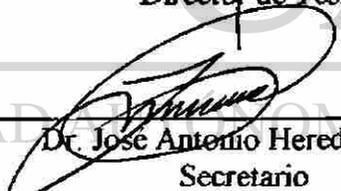
**APLICACIÓN DE UN PROMOTOR INDUCIBLE POR CAMPOS
ELECTROMAGNÉTICOS PARA MANIPULAR LA
EXPRESIÓN DE LUCIFERASA COMO
GENE REPORTERO**



Comité de Tesis



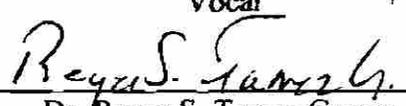
Dr. Juan Manuel Alcocer González
Director de Tesis



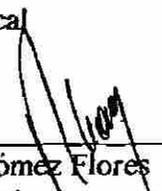
Dr. José Antonio Heredia Rojas
Secretario



Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Vocal



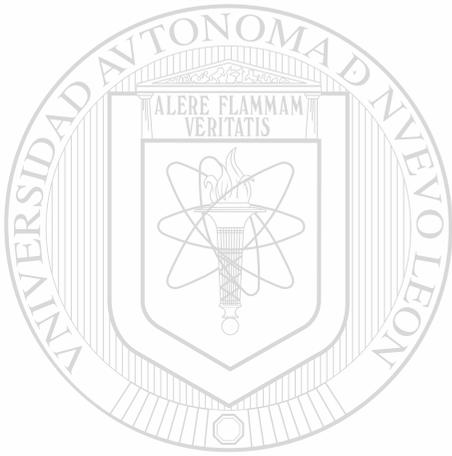
Dr. Reyes S. Tamez Guerra
Vocal



Dr. Ricardo Gómez Flores
Vocal

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

**QUIERO AGRADECER ESPECIALMENTE EL APOYO BRINDADO
POR EL CONACYT PARA CURSAR EL DOCTORADO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA Y PARA LA
ELABORACIÓN DE ESTA TESIS.
(No. DE REGISTRO CONACYT 119148)**



UANL

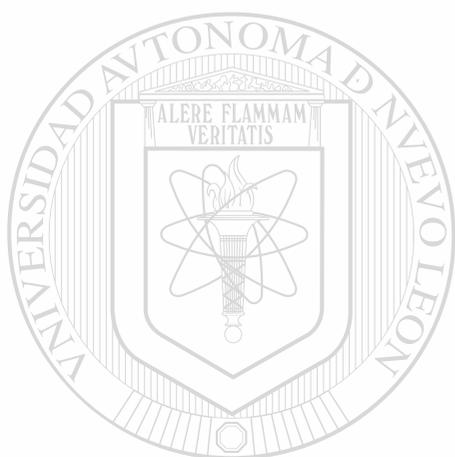
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DEDICATORIA

A mi familia y amigos que durante los buenos y malos tiempos, de diversas formas me han apoyado para concluir con este trabajo.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. RESUMEN Y ABSTRACT.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. HIPÓTESIS.....	5
4. OBJETIVOS.....	6
5. ANTECEDENTES.....	7
5.1 Campos electromagnéticos.....	7
5.1.1 Inducción electromagnética....	12
5.1.2 Ondas Electromagnéticas	13
5.1.3 Radiación electromagnética y espectro electromagnético	14
5.1.4 Campo magnético de la tierra.....	17
5.2 Efectos biológicos de los campos electromagnéticos	18
5.3 Efecto de los CEM en microorganismos	24
5.4 Campos electromagnéticos y cáncer	26
5.5 Efectos de los CEM sobre la expresión génica.....	27
6. MÉTODOS	38
6.1 Construcción de un vector que tenga elementos de respuesta para CEM	38
6.1.1 Clonación del promotor en el vector pNFkB-luc....	38
6.1.2 Preparación de células competentes.....	40
6.1.3 Transformación de <i>Escherichia coli</i> con el vector pNFkB-luc.....	40
6.1.4 Purificación de plásmidos mediante el miniprep	41
6.1.5 Purificación de plásmidos mediante acetato de potasio.....	42
6.1.6 Maxiprep con acetato de amonio.....	43
6.1.7 Digestión parcial de pNFkB-luc para despojarlo de su promotor original mediante las enzimas NheI y HindIII	44
6.1.8 Purificación de pNFkB-luc sin su promotor original.....	44
6.1.9 Aislamiento de ADN a partir de sangre venosa periférica...	45
6.1.10 PCR para obtención de amplicon de promotor de hsp70..	46
6.1.11 Purificación de promotor de hsp70.....	47

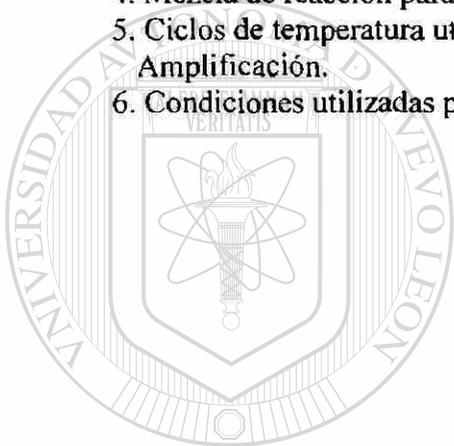
6.1.12	Ligación de secuencia promotora de HSP70 a vector pGEMT-easy....	48
6.1.13	Transformación de <i>E. coli</i> con el producto de ligación.	49
6.1.14	Obtención de plásmidos por miniprep múltiple	50
6.1.15	Purificación de plásmidos con acetato de potasio	50
6.1.16	Clonación del promotor de hsp70 en pNFkB-luc..	51
6.1.17	Digestión parcial de pCEM	52
6.1.18	Detección de hsp70 mediante PCR	52
6.2	Evaluación de la respuesta a CEM <i>in vitro</i> en líneas celulares	54
6.2.1	Sistema de exposición de CEM	55
6.2.2	Exposición de líneas celulares a choque térmico	56
6.2.3	Exposición al efecto combinado de choque térmico y CEM.	56
6.2.4	Detección de la expresión de la luciferasa por luminometria.	56
6.2.5	Detección de la expresión de luciferasa en líneas celulares mediante Western- Blot.	57
6.3	Activación del promotor por CEM <i>in vivo</i>	59
6.3.1	Maxiprep con acetato de amonio para obtener pCEM.	60
6.3.2	Inyección de pCEM en <i>Mus musculus</i> .	61
6.3.3	Sistema de exposición <i>in vivo</i> .	62
6.3.4	Homogenizado de tejido y medición de unidades relativas de luciferasa.	63
6.3.5	Detección de la expresión de luciferasa en <i>Mus musculus in vivo</i> mediante Western Blot	64
6.4	Diseño experimental.....	66
6.5	Procesamiento Estadístico.....	68
7.	RESULTADOS.....	70
7.1	Construcción de pCEM	70
7.2	Determinación de la expresión de luciferasa en líneas celulares	74
7.3	Determinación de la expresión de luciferasa en <i>Mus musculus</i> .	84
7.4	Western Blot para detección de luciferasa	86
5.	DISCUSIÓN.....	90
6.	CONCLUSIONES.....	97
7.	LITERATURA CITADA.....	98
	APÉNDICES.....	107
	ANEXO 1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS...	107
	ANEXO 2 RESUMEN CURRICULAR.....	112
	ANEXO 3 ARTÍCULOS PUBLICADOS.....	113

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pagina
1. Mapa del vector pNFkB-luc mostrando los sitios de restricción	38
2. Secuencia de nucleótidos del vector pNFkB-luc.	39
3. Mapa con sitios de restricción del vector pGEMT-easy	49
4. Mapa con sitios de restricción del vector pCEM	52
5. Sistema de exposición a CEM para producir intensidades de 8-80 mT	56
6. Fotografía que ilustra una vista superior del solenoide	63
7. pNFkB-luc digerido para obtenerlo libre de su promotor original	70
8. Producto de PCR obteniendo el promotor completo de hsp70	71
9. Gel de Miniprep de colonias que detecta pGEM-T unido al promotor hsp70 humano.	72
10. Caracterización de el pGEM-T unido al promotor de hsp70	72
11. Miniprep para obtención de colonias múltiples para detectar la clona conteniendo el vector pNFkB-luc	73
12. PCR para amplificar el promotor de hsp70	74
13. Transfección con lipofectamina de células HeLa con el plasmido pCEM. para evaluar el efecto del choque térmico	75
14. Transfección con lipofectamina de células HeLa con el Plasmido pCEM Efecto de 8 μ T	76
15. Efecto de 24 μ T de intensidad de CEM en la activación del promotor del gene de la Hsp70 en células HeLa	77
16. Efecto de 48 μ T de Intensidad de CEM sobre la activación del promotor de hsp70 en células HeLa	78
17. Efecto de 80 μ T de 60 Hz sobre la activación del promotor de hsp70 en células HeLa	79
18. Efecto sinérgico entre el choque térmico y 8 μ T en células HeLa	80
19. Efecto de los CEM y el choque térmico sobre la línea BMK16	81
20. Efecto sinérgico Entre el Choque térmico y 80 μ T en BMK16	82
21. Efecto del CEM y CT en células RMA E7	83
22. Efecto de los CEM de 8 a 80 μ T y el CT en células INER-37	84
23. Efecto de los CEM de 80 μ T de 60 Hz sobre la expresión de luciferasa en <i>Mus musculus</i>	85
24. Efecto de los CEM de 80 μ T sobre la expresión de luciferasa en <i>Mus musculus</i>	86
25. Análisis de Western-Blot sobre la línea celular HeLa	87
26. Análisis de Western-Blot sobre las líneas celulares BMK16 e INER-37 expuestas con pCEM.	88
27. Análisis de Western-Blot en <i>Mus musculus</i> expuesto a CEM <i>in vivo</i> , sobre la expresión de luciferasa	89

LISTA DE TABLAS

Figura	Página
1. Mezcla de reacción utilizada para amplificar el promotor de hsp70.	46
2. Ciclos de temperatura utilizados para obtener el producto de Amplificación.	47
3. Mezcla de ligación para obtener pGEM-T unido al promotor de hsp70	48
4. Mezcla de reacción para detección de hsp70 en pCEM.	53
5. Ciclos de temperatura utilizados para obtener el producto de Amplificación.	53
6. Condiciones utilizadas para la generación de pulsos eléctricos.	61



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

NOMENCLATURA

Abs	Absorbancia
AC	Antes de Cristo
ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	ADN complementario
CEM	Campos electromagnéticos
G	Gauss
g	Gramos
hGH	Hormona del crecimiento humano
Hz	Hertz
Kb	Kilobases
Km/s	Kilómetros/segundo
KV/m	Kilovolt/metro
l	Litros
LB	Medio Luria-Broth
M	Concentración molar
m	Metro
mseg	Milésimas de segundo

min	Minutos
ml	Mililitro
mT	Militesla
N	Concentración normal
P	Probabilidad
pb	Pares de bases
PG	Polietilenglicol
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RPM	Revoluciones por minuto
SDS	Lauril sulfato de sodio
T	Tesla unidad de intensidad magnética
T.A.	Temperatura ambiente (°C)
uv	Ultravioleta
V	Voltios

V/cm **Volt/ centímetro**

°C **Grados Celsius**

µg/ml **Microgramo/mililitro**

µl **Microlitro**

µT **Microtesla**

1. RESUMEN

Se ha informado sobre los efectos de los campos electromagnéticos (CEM) en los sistemas biológicos y se ha encontrado que éstos pueden afectar actividades metabólicas celulares tales como la síntesis de ADN, ARN y proteínas. Por otra parte, existen diversas investigaciones que indican que los CEM pueden afectar la regulación de la expresión de genes. Dado lo anterior, el presente estudio tuvo por objeto elaborar un promotor sintético con elementos de respuesta a campos magnéticos con la perspectiva de que en un futuro este promotor pudiera usarse para expresar genes de importancia médica y biotecnológica. Actualmente existen múltiples estrategias para regular la expresión génica, sin embargo pueden presentar efectos colaterales indeseables. El presente trabajo se enfocó en la construcción de un vector que contiene el promotor de hsp70 además de contener como reportero el gen de luciferasa que fue denominado pCEM, para luego transfectar el vector en la línea celular Hela y evaluar el efecto de los CEM a 8, 24, 48 y 80 μ T. Además se evaluó el efecto de los CEM sobre las líneas celulares INER37, BMK16 y RMA-E7 a las intensidades de 8 y 80 μ T con 60 Hz de frecuencia de onda sinusoidal. Las células transfectadas con pCEM fueron expuestas a los siguientes tratamientos: a) Choque térmico (CT) a 43°C por 30 minutos como control positivo, b) CEM de 8 μ T 30 minutos y c) Sin CT ni exposición a CEM por 30 minutos como control negativo, para después mantener por 30 minutos a 37°C. Se observó que la expresión de la luciferasa estaba incrementada tanto en el grupo expuesto a choque térmico como el expuesto a CEM comparado con el grupo no expuesto en las líneas celulares INER37, BMK16 y HeLa ($P < 0.05$). Se determinó también el efecto combinado del CEM y el choque térmico. Tratando un grupo inicialmente con CT y después con CEM, y un segundo grupo inicialmente con CEM y después con CT; en este caso se compararon con grupos sin transfectar con pCEM y transfectados con pCEM sin exponer a CEM. En las líneas celulares HeLa y BMK16 se observó un aumento significativo en los niveles de expresión de luciferasa, al exponer a los tratamientos con CT y CEM con respecto a los demás grupos ($P < 0.05$). Adicionalmente se llevaron a cabo experimentos *in vivo* en ratones *Mus musculus* línea Balb/c inyectados con el vector pCEM expuestos a CEM, comparando con pNF κ B-luc (vector comercial que contiene el gen de luciferasa) y pCEM sin exponer a CEM. Se encontró que se podía afectar la expresión de luciferasa con respecto a los grupos no expuestos a CEM. Se concluye que el vector pCEM al responder significativamente a la aplicación de un campo electromagnético, evaluado por las modificaciones mostradas en su expresión génica, puede ser utilizado en el futuro para expresar genes de importancia terapéutica mediante su regulación con CEM de 60 Hz de frecuencia a las intensidades aquí probadas.

ABSTRACT

There are many reports about the effects of the electromagnetic fields (EMF) in the biological systems and it has been found that these fields can modify cellular and metabolic activities such as the synthesis of DNA, RNA and proteins. On the other hand, several investigations indicate that the EMF can affect the regulation of the genetic expression. According to this, the present study was undertaken to make a synthetic promoter with response elements to magnetic fields, with the perspective that in the future, this promoter could be used to express genes of medical and biotechnological importance. At the moment, there are multiple strategies to regulate the genetic expression, nevertheless, they can present undesirable side effects. The present work was focused in the construction of a vector that contains the promoter of hsp70 besides to contain a reporter like the gene of luciferase that was denominated pCEM, and later was transfected in cellular lines INER37, BMK16 and RMA-E7 and thus to evaluate its response to EMF. The intensities used were of 8 and 80 mT at 60 Hertz of frequency of sinusoidal wave; also it was evaluated the effect of the EMF to 8, 24, 48 and 80mT in HeLa cell line. The cells transfected with pCEM were exposed to the following treatments: a) Thermal shock (TC) to 43°C by 30 minutes as a positive control, b) EMF of 8mT 30 minutes and c) Without TC nor exposition to EMF by 30 minutes as a negative control, later they were kept by 30 minutes to 37 C. It was observed that the expression of luciferase was increased in the exposed group to thermal shock as the exposed one to EMF compared with the non exposed group in cellular lines INER37, BMK16 cells and HeLa(P<0.05). Also was determined the combined effect of the EMF and the thermal shock. Treating a group at the first time with TC and later with EMF, and a second group initially with EMF and later with TC; in this case they were compared with non transfected groups and transfected with pCEM without exposing to EMF. In HeLa and BMK16 a significant increase in the expression of luciferase levels was observed, when they were exposed to the treatments with TC and EMF in reference to the other groups (P<0.05). Additionally experiments were carried out in mice from the *Mus musculus* line Balb/c injected with the vector pCEM exposed to EMF, comparing with pNFkB-luc (commercial vector that contains the gene of luciferase) and pCEM without exposing to EMF. It was found that the expression of the enzyme luciferase with respect to the groups non exposed to EMF was increased. In conclusion; our data suggested that the constructed pCEM can be modulated by application of a magnetic field, evaluated by the modifications shown in its genetic expression. Furthermore this vector could be used to express genes of therapeutic importance by means of its regulation with EMF at 60 Hertz of frequency to the intensities tested here.

2. INTRODUCCIÓN

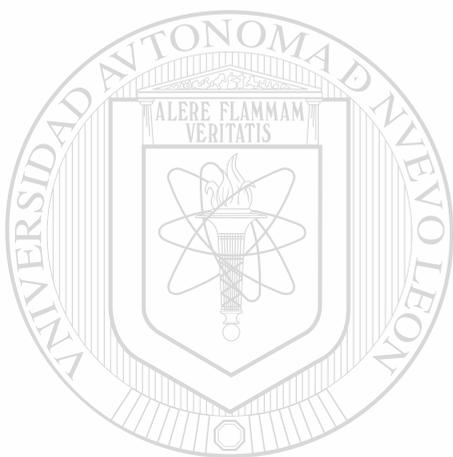
En la actualidad existen numerosos informes relacionados con los efectos benéficos de los campos electromagnéticos sobre los organismos, y se ha encontrado que estos campos pueden ser usados entre otras áreas, en la conservación de alimentos mediante inactivación microbiana así como la regeneración ósea, tratamiento de cefaleas, diagnóstico de enfermedades etc.

Además, existen numerosos artículos que mencionan que los campos electromagnéticos pueden ocasionar diversos efectos a nivel celular como son estimulación de la transcripción celular y traducción. Estos efectos son similares a los ocasionados por factores de estrés celular, específicamente por el choque térmico.

Por otra parte, actualmente se buscan nuevas alternativas para tratar algunos tipos de enfermedades que afectan la salud del ser humano. Por esto, en el presente trabajo se llevó a cabo la construcción de un vector que contiene elementos de respuesta a campos magnéticos. Mediante esta alternativa se pretende controlar el tiempo y localización de la expresión de los genes que sean regulados por dicho promotor. El campo magnético que se utilizó en este estudio fue de una frecuencia de 60 Hz.

En este momento existen múltiples estrategias para regular la expresión génica como son: hipertermia, radiación ionizante, drogas etc. Sin embargo pueden presentar efectos colaterales indeseables. Por su parte, los CEM pueden afectar la regulación de la expresión de genes tanto *in vivo* como *in vitro*, por lo cual el presente estudio tiene por objeto elaborar un promotor sintético

con elementos de respuesta a campos magnéticos con el fin de modular la expresión de genes de importancia médica. En este trabajo se seleccionó el promotor hsp70 que contiene secuencias sensibles a CEM de 60 Hz y se insertaron en el vehículo pNFkB-luc para obtener pCEM, a este vehículo después se determinó la capacidad para expresar genes terapéuticos tanto *in vitro* como *in vivo*.



UANL

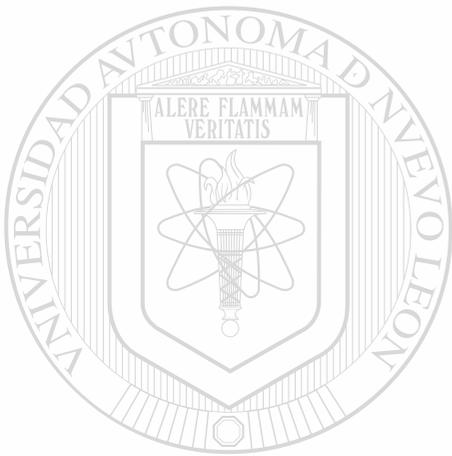
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3. HIPÓTESIS

Un vector que contenga un promotor constituido de elementos de respuesta a campos electromagnéticos de 60 Hz puede ser usado para manipular la expresión génica.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Construir un vector que contenga elementos de respuesta a campos electromagnéticos de extremadamente baja frecuencia (60 Hz) para evaluar su expresión génica en gen reportero de luciferasa.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Obtener las secuencias de *hsp70* sensibles a CEM de 60 Hz a partir de linfocitos de sangre venosa periférica humana.

2.- Realizar la inserción de secuencias altamente sensibles a CEM en el vector comercial

pNFkB-luc eliminando previamente su promotor original.

3.- Determinar el grado de expresión de luciferasa en las líneas celulares HeLa, Iner-37,

BMK16, RMA-E7 expuestas a CEM de 8, 24, 48 y 80 μ T de 60 Hz mediante

luminometría.

4.- Determinar la expresión de las líneas celulares HeLa, Iner-37, BMK16 expuestas a CEM de 60 Hz mediante análisis de Western Blot.

5.- Evaluar el grado de expresión mediante luminometría en tejido muscular de ratones *Mus musculus* inyectado con pCEM expuestos a CEM de 60 Hz.

6.- Detectar la expresión mediante Western Blot en tejido muscular de *Mus musculus* inyectado con pCEM expuestos a CEM de 60 Hz.

5. ANTECEDENTES

5.1. Física De Los Campos Electromagnéticos (CEM)

Si bien nuestro conocimiento de los fenómenos eléctricos es relativamente reciente, el hombre ha tenido noticia de los fenómenos magnéticos desde tiempos muy remotos.

Así, Tales de Mileto (640-546 AC) hablaba de las atracciones magnéticas y los Chinos emplearon desde hace más de 2000 años la brújula magnética para la navegación y viajes en los desiertos de Mongolia. Este aparato se fundamenta en adoptar una orientación, la cual es ejercida por un campo magnético circundante (Wood, 1991).

El campo magnético es la región en el espacio en la cual un objeto magnetizado puede a su vez magnetizar a otros cuerpos de naturaleza ferromagnética o

paramagnética. Recientemente se descubrió que la configuración del campo magnético puede obtenerse con el auxilio de una brújula o con limaduras de hierro. Por otro lado si

se rompe un imán en un intento de separar los polos, se encuentran otros nuevos formados en los extremos rotos; si uno de esos pedazos se rompe, otra vez aparecen de nuevo dos polos de clase opuesta. Tantas veces como se repita este proceso se tiene el mismo resultado y por lo tanto no es posible obtener un polo magnético aislado (Stewart, 1979; Alonso y Rojo, 1981).

En 1820 el Físico Danés Hans Oersted observó que una corriente eléctrica puede cambiar la orientación de la aguja de una brújula en forma semejante a como lo hace un

imán. Este descubrimiento puso de manifiesto que en un conductor con corriente alterna existe también un campo magnético y que el movimiento de cargas eléctricas está íntimamente relacionada con el origen de los campos magnéticos (Galar-Castelan, 1988). Posteriormente Faraday, Henry y Ampere corroboraron los resultados de Oersted (De la Rosa, 1995).

Por otra parte, se dice que existe un campo eléctrico en un punto, si actúa una fuerza de origen eléctrica sobre un cuerpo estacionario cargado situado en dicho punto. Cualquier otra carga eléctrica colocada en un punto de ese campo eléctrico, experimenta una fuerza producida por su interacción con la primera carga. La intensidad del campo eléctrico en un punto es igual a la fuerza que el campo ejerce sobre una unidad de carga eléctrica colocada en dicho punto (Lin, 1994). La intensidad de dicho campo está dado en volts por metro (V/m) y la exposición a él, produce la movilización de cargas en la dirección del campo eléctrico produciendo una corriente eléctrica medida en amperes

(A), la distribución de esta corriente y la dirección de su flujo es cuantificado en amperes por metro cuadrado (A/m^2) y se conoce como densidad de corriente (Walleczec, 1992).

Cuando los campos magnéticos y eléctricos varían con el tiempo en una determinada región, se dice que ambos campos están estrechamente relacionados. Es decir, todo campo eléctrico que varía con el tiempo va siempre acompañado de un campo magnético, también variable y a la inversa, por lo cual si se produce un campo magnético, este va acompañado de otro campo eléctrico asimismo variable. Esta interrelación entre los campos eléctricos y

magnéticos hace que se hable más bien de un campo electromagnético (CEM) como una sola entidad física (Parker, 1993).

La dirección del campo magnético en un lugar se determina por la orientación que adopta un pequeño imán o brújula colocado en el lugar, en el cual el polo norte del imán tiende a orientarlo en dirección del campo y el polo sur queda sometido a una fuerza que tiende a moverlo en la dirección opuesta. El resultado es que ambas fuerzas producen una resultante que hace girar al imán hasta que se orienta paralelamente a la dirección del campo, cuando las fuerzas sobre los polos son directamente opuestas y la resultante es cero. Los campos magnéticos se representan por líneas de fuerza que están dirigidas de los polos norte a los polos sur y que son tangentes a la dirección del campo en cada punto (Parker, 1993).

De lo anteriormente expuesto, se deduce que el magnetismo se encuentra muy relacionado con la electricidad. Una carga eléctrica está rodeada de un campo eléctrico, y también de un campo magnético si se está moviendo. Esto se debe a las distorsiones que sufre el campo eléctrico al moverse la partícula. Einstein explicó este fenómeno con la teoría especial de la relatividad. Dicho de otra forma, las cargas en movimiento tienen asociados tanto un campo eléctrico como un campo magnético. El movimiento de la carga eléctrica produce un campo magnético. Curiosamente, puesto que el movimiento es relativo, también lo es el campo magnético, ya que si uno se mueve a la par de la carga de modo que no está en movimiento con respecto a nosotros no se detectará campo magnético alguno. (Hewitt, 1998).

En función de la respuesta que los materiales presentan a un campo magnético se distinguen tres categorías: diamagnéticos, paramagnéticos y ferromagnéticos, lo que

será función del campo magnético que se genera en los átomos como consecuencia del movimiento de sus electrones. Las sustancias diamagnéticas al ser colocadas en un campo magnético se magnetizan en dirección contraria al campo; siendo esta magnetización unas mil veces menor que la de las sustancias paramagnéticas, aunque el efecto varía de una sustancia a otra. El diamagnetismo se debe a un efecto de distorsión de las órbitas electrónicas debido al campo magnético aplicado, lo que equivale a producir en cada átomo un momento magnético que tiene dirección opuesta a la del campo magnético, pero en una sustancia diamagnética sus átomos no poseen un dipolo magnético neto debido a que los momentos dipolares tanto los de orbitales como los de espín se cancelan. En consecuencia, una muestra macroscópica de estos materiales tampoco presenta un dipolo magnético; por lo que no es atraída por un imán. En cambio, un material paramagnético presenta la propiedad de ser atraído por un imán. Esto es consecuencia de que sus átomos o moléculas tienen momentos magnéticos permanentes que tienden a orientarse en la dirección de un campo magnético externo al

que se exponen, convirtiéndose así en imanes. Este magnetismo es suprimido al momento de eliminar el campo magnético externo. La orientación promedio de los dipolos magnéticos elementales depende de la intensidad del campo aplicado que tiende a alinearlos. Entre estos materiales se encuentran los radicales y compuestos de elementos de transición. Por otro lado, en los materiales ferromagnéticos, se presenta un efecto paramagnético muy fuerte en el que estos se encuentran magnetizados en ausencia de un campo magnético externo. Esta magnetización natural indica que los momentos magnéticos de sus átomos o moléculas tienden a orientarse paralelamente como consecuencia de las interacciones entre ellos. Un análisis cuidadoso del fenómeno ha indicado que los que tienden a alinearse son los espines de los electrones; el

fenómeno ferromagnético es puramente cuántico, por lo que no es explicable por la física clásica. El resultado de exponer este tipo de materiales ante otro campo magnético externo es la formación de un nuevo campo que se suma al externo. (Pothakamury *et al.*, 1993).

Las oscilaciones electromagnéticas en la región de bajas frecuencias y longitudes de onda muy largas, como aquellas de los circuitos domésticos de 60 Hz, irradian muy poca energía, ya que se sabe que la energía de una onda electromagnética es directamente proporcional a su frecuencia e inversamente proporcional a su longitud de onda. A medida que la frecuencia aumenta, se llega a longitudes de onda muy cortas y las radiaciones de esta clase llegan a depositar una cantidad de energía tan considerable que a tales emisiones se les denomina radiaciones ionizantes, como por ejemplo; los rayos X y Gamma. Por ello las radiaciones generadas por los CEM de frecuencia de 60 Hz son del tipo no ionizante, es decir, los efectos que se producen son por mecanismos diferentes a aquellos que involucran el desplazamiento de electrones en átomos y moléculas blanco (Strother, 1980, Rojo, 1981).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La frecuencia que se usa comúnmente en investigación es similar a la producida por la corriente eléctrica alterna de los cables de tendido eléctrico, ésta varía como una onda senoidal con frecuencia de 60 Hz. Los CEM generados por estas corrientes, tienen esa misma frecuencia y por tanto se encuentran en la región del espectro electromagnético denominado de frecuencia extremadamente baja, región comprendida entre los 3 y 3×10^3 Hz (Muñoz, 1994).

5.1.1 Inducción Electromagnética

Faraday y Henry descubrieron que se podía generar corriente eléctrica en un alambre con el simple movimiento de meter y sacar un imán de una bobina, y que la producción de voltaje dependía del movimiento relativo del conductor y el campo magnético. La magnitud del voltaje inducido depende del ritmo al que el alambre corta las líneas del campo magnético, o bien que tan rápido cambia el campo magnético. El fenómeno se resume en el enunciado de la ley de Faraday: El voltaje inducido en una bobina es proporcional al producto del número de espiras y la razón de cambio del campo magnético dentro de dichas espiras. Por otra parte, la magnitud de la corriente depende de la resistencia de la bobina y del circuito al que está conectada. El fenómeno es similar al mencionado anteriormente en los efectos del campo magnético sobre una corriente

eléctrica. Si la corriente fluye hacia la derecha, los electrones experimentan una fuerza perpendicular hacia arriba, como no hay trayectoria conductora por la que los electrones pueden fluir hacia arriba el alambre también experimenta una fuerza dirigida hacia arriba (efecto motor). Si desplazamos hacia abajo un alambre que inicialmente no transporta corriente, los electrones en su interior experimentan una fuerza deflectora perpendicular a su movimiento, aquí si hay trayectoria conductora en dicha dirección y los electrones la recorren, constituyéndose así una corriente, a esto último es a lo que se le ha llamado el “Efecto Generador” (Hewitt, 1998). Según el concepto moderno de la inducción electromagnética, lo que se induce son campos eléctricos y magnéticos que a su vez dan lugar a los voltajes que se han estado considerando. La inducción se efectúa

haya o no cables conductores o medios materiales. La ley de Faraday en un sentido más general establece que: Se induce un campo eléctrico en toda región del espacio en la que exista un campo magnético que varíe con el tiempo. La magnitud del campo eléctrico inducido es proporcional a la rapidez con la que cambia el campo magnético. La dirección del campo eléctrico inducido es perpendicular al campo magnético variable. El efecto secundario complementario es el propuesto por James Clerk Maxwell en 1860, es decir, se induce un campo magnético en toda región del espacio en la que exista un campo eléctrico que varíe con el tiempo (Galar-Castelán, 1988).

5.1.2 Ondas Electromagnéticas

Cuando se agita de un lado a otro en el espacio una barra cargada se producen ondas electromagnéticas. Esto se debe a que la carga al moverse constituye una corriente eléctrica, y una corriente eléctrica siempre está rodeada de un campo magnético, como la corriente es variable, el campo magnético también es variable, el cual de acuerdo a la ley

de Faraday produce un campo eléctrico variable, y el campo eléctrico variable de acuerdo a lo enunciado por Maxwell, induce a su vez un campo magnético variable. Una onda electromagnética se compone de campos eléctricos y magnéticos vibrantes que viajan juntos y no requieren medio alguno para ello. Los campos vibrantes emanan de la carga vibrante. En todo punto de la onda, el campo eléctrico es perpendicular al campo magnético y ambos son perpendiculares a la dirección de propagación de la onda. La magnitud de un campo inducido (el magnético y el eléctrico) depende de la razón de cambio de la vibración, pero también del movimiento del otro campo, es decir la rapidez con la que el otro campo emana la carga vibrante, si la rapidez fuese muy pequeña el campo inducido es débil por lo que la inducción mutua se atenuaría hasta anularse pero

en este caso se habría destruido la energía, siendo incompatible con la ley de la conservación de la energía. Si la rapidez de emanación fuera muy elevada los campos inducidos aumentarían de magnitud sin cesar, otro caso incompatible con la conservación de la energía. Sin embargo, a cierta rapidez crítica la inducción mutua continuaría indefinidamente, sin pérdidas ni aumentos de energía. Maxwell encontró que la rapidez crítica era de 300,000 km/s, pero ésta era la velocidad de la luz, por lo que entonces acababa de descubrir la naturaleza de la luz. La velocidad de propagación de las ondas electromagnéticas en el vacío es independiente de la frecuencia y de la longitud de onda (Hewitt, 1998).

5.1.3 Radiación Electromagnética y Espectro Electromagnético

En la naturaleza existen cargas oscilantes, de modo que hay muchas fuentes naturales de radiación electromagnética. La luz y la radiación térmica, por ejemplo son ondas electromagnéticas, que son el resultado de la oscilación de cargas eléctricas en los átomos del emisor. Desde el siglo antepasado se descubrió que la luz emitida por una flama de sodio sufría pequeñas variaciones cuando se le sometía al campo magnético de un imán. El físico H.A. Lorentz por su parte, demostró que las cargas eléctricas de los átomos de vapor de sodio, al estar sometidas a las fuerzas del campo magnético producían variaciones en la frecuencia de la luz emitida, las cuales eran explicadas por la teoría de Maxwell como oscilaciones de la carga del electrón. Estas fueron las primeras evidencias de la identidad entre la radiación electromagnética y la luz (Hewitt, 1998). Antes del siglo XIX las ondas electromagnéticas estudiadas eran las que caían dentro del espectro visible o luz, es decir aquellas cuya longitud de onda está comprendida entre

los 4×10^{-7} y 7.2×10^{-7} m, pero la teoría de Maxwell predice que pueden existir ondas electromagnéticas de cualquier longitud de onda o frecuencia. El espectro electromagnético, conocido y estudiado, va desde los miles de kilómetros para las ondas de los campos magnéticos hasta los 10^{-16} m para los rayos gamma y los cósmicos (Parker, 1993).

La propagación de los campos electromagnéticos como un proceso ondulatorio explica satisfactoriamente muchos fenómenos importantes, pero falla en la explicación del intercambio de energía cuando la radiación electromagnética interacciona con la materia, pues solamente puede intercambiar cantidades discretas o cuantos de energía, lo que sugiere una estructura corpuscular de la radiación que Einstein llamó fotón. Actualmente se acepta que la radiación electromagnética tiene un comportamiento dual (Galar-Castelán, 1988). Esto es concebible, si se considera la sugerencia del físico francés De Broglie quien sugirió que la materia y las partículas (ya fueran fotones, electrones, átomos, balas y hasta seres humanos) tienen una longitud de onda relacionada con su momentum. La longitud de onda de una partícula de gran masa y poca rapidez es demasiado pequeña como para poder detectarse por medios convencionales, pero una partícula pequeña como un electrón que se desplaza con gran rapidez posee una longitud de onda detectable que es miles de veces menor que el de la longitud de onda de la luz visible (Hewitt, 1998).

Las oscilaciones electromagnéticas en la región de bajas frecuencias y longitudes de onda muy largas (como aquellas de los circuitos domésticos de 50-60 Hz¹) irradian muy poca energía, ya que se sabe que la energía de una onda electromagnética es directamente proporcional a su frecuencia e inversamente proporcional a su longitud de

onda. A medida que la frecuencia aumenta, se llega a longitudes de onda muy cortas y las radiaciones de esta clase llegan a depositar una cantidad de energía tan considerable que a tales emisiones se les denomina radiaciones ionizantes, como por ejemplo, los rayos X y Gamma. Queda entonces claro que las radiaciones generadas por los CEM de frecuencia de 60 Hz son del tipo no ionizante, es decir, los efectos que produzcan deberán ser por mecanismos diferentes a aquellos que involucren el desplazamiento de electrones en átomos y moléculas (Strother, 1980, Rojo, 1981).

Como anteriormente se mencionó, las ondas electromagnéticas son el producto de campos eléctricos y magnéticos y la intensidad de la radiación electromagnética puede ser llamada densidad de poder y se mide en watts/m^2 . Los campos electromagnéticos existen en forma de ondas electromagnéticas solo en el campo lejano, es decir, alejados de la fuente. En el campo cercano, los campos eléctricos y magnéticos deben ser considerados como simples campos. El límite entre el campo lejano y el cercano es en la mayoría de los casos, su longitud de onda. En el caso de los campos de frecuencia

extremadamente baja, donde la longitud de onda es de miles de kilómetros, los campos magnéticos y eléctricos son siempre evaluados separadamente. En los casos de frecuencias mayores como en las microondas, donde su longitud de onda es tan corta que la exposición humana ocurre en el campo lejano, no es necesario considerar los campos eléctrico y magnético por separado

(Juutilainen y Lang, 1997).

Forma de la Onda: Describe el cambio, con el tiempo, de los campos magnéticos o eléctricos variables. La mayoría de las fuentes de los campos electromagnéticos de frecuencia extremadamente baja (FEB), los de frecuencia muy baja (FMB) y de ondas

de radio (RF) producen campos con formas de onda sinusoidales, pero algunas fuentes emiten campos electromagnéticos con otras formas, como triangulares o rectangulares. Hay formas de onda con alto rango de cambio (en unidades de la intensidad del campo por unidad de tiempo) que inducen corrientes fuertes en tejidos y son biológicamente más activas que formas de onda con bajo rango de cambio (Juutilainen y Lang, 1997).

Por otra parte las radiofrecuencias son comúnmente moduladas por otra señal de más baja frecuencia para hacerla que lleve la información. Las formas más comunes de modulación son la amplitud modulada y la frecuencia modulada. La amplitud modulada puede ser importante en el efecto biológico de la radiación de radiofrecuencias. Muchos estudios *in vitro* señalan que las radiofrecuencias débiles, de amplitud modulada a frecuencias bajas, podrían tener efectos específicos similares a los efectos reportados por campos electromagnéticos de frecuencia extremadamente baja (Postow y Swicord, 1996).

La frecuencia que se maneja en el presente estudio es similar a la producida por la corriente eléctrica de los cables de tendido eléctrico, ésta varía como una onda sinusoidal con una frecuencia de 60 Hz. Los CEM generados por estas corrientes tienen esa misma frecuencia, y por tanto se encuentran en la región del espectro electromagnético denominado de frecuencia extremadamente baja, región comprendida entre los 3 y los 3×10^3 Hz (Muñoz, 1994).

5.1.4 Campo Magnético de la Tierra

El planeta tierra se comporta como si fuera un imán gigantesco cuyo norte magnético se encuentra cercano al polo Sur geográfico y el Sur magnético cercano al polo Norte

geográfico, sin embargo para mantener la congruencia con la terminología usada en la literatura se prefiere llamar polo Norte magnético de la tierra al que se encuentra en las cercanías del polo Norte geográfico y polo Sur magnético al que se encuentra cercano al polo sur geográfico. El eje magnético de la tierra tiene una inclinación de aproximadamente 11.5° con respecto al eje de rotación de la tierra, y por lo tanto los polos magnéticos no coinciden con los polos geográficos. Además, existe evidencia de que el eje magnético ha sufrido inversiones completas en su dirección hasta nueve veces en los últimos 4 millones de años. En general se considera que el campo geomagnético es originado por el movimiento de cargas eléctricas en torno al eje de rotación de la tierra, constituyendo así una corriente eléctrica neta en trayectoria circular y que estas corrientes están vinculadas al movimiento de convección de partículas portadoras de carga eléctrica debido al gradiente térmico del fluido nuclear y al arrastre de las mismas por el movimiento de rotación del globo terráqueo. También existen influencias externas, principalmente el viento solar que consiste principalmente de partículas de alta

energía portadoras de carga eléctrica. El campo geomagnético se considera de tipo constante, es decir no varía con el tiempo y por lo tanto tendría una frecuencia cercana a cero (Galar-Castelan, 1988).

5.2 Efectos Biológicos de los CEM

Una variedad de organismos muestran una clara magnetosensibilidad a la orientación en el campo magnético de la tierra. Entre éstas se encuentran las magnetobacterias (*Aquaspirillum magnetotacticum*), los paramecios (*Paramecium sp*), las planarias (*Dugesia sp*), los caracoles, las abejas (*Apis mellifera*), las salamandras (*Eurycea lucifuga*), los tritones (*Notophthalmus viridescens*), los salmones (*Oncorhynchus nerka*) y

aun el hombre. De acuerdo con lo antes mencionado, la magnetosensibilidad esta ampliamente distribuida en el reino animal (Azanza y Del Moral, 1994, Goodman *et al.*, 1993).

Debido a su composición electrolítica los seres vivos son por lo general buenos conductores de la electricidad. A través de las membranas celulares y de los fluidos corporales intra y extracelulares existen corrientes iónicas, especialmente en las células nerviosas y musculares a las cuales debe estar asociado un campo magnético. Además, en los sistemas biológicos existen estructuras magnéticamente influenciadas como los radicales libres que presentan propiedades paramagnéticas y aquellas en las que intervienen sustancias ferromagnéticas. La respuesta de un sistema biológico a un campo magnético externo depende tanto de las propiedades magnéticas intrínsecas del sistema como de las características del campo externo y de las propiedades del medio en el cual tiene lugar el fenómeno. Experimentalmente se ha probado que en los cambios que sufren algunos parámetros de los sistemas biológicos por la acción de los campos magnéticos, influyen no solamente la intensidad, sino también las características espaciales y temporales de dicho campo. Dentro de este contexto, es diferente el efecto de un campo estático que solo produciría una rotación de los dipolos magnéticos, tendiendo a orientarlos en la dirección del campo y restringiendo su movilidad, ocasionando un efecto significativo si éstas participan en reacciones químicas, en contraste con uno que presenta variaciones periódicas con el tiempo y que pueden inducir movimientos oscilatorios sobrepuestos a la oscilación en los dipolos magnéticos moleculares, lo que de alguna manera podría afectar la velocidad de las reacciones químicas dependiendo de la amplitud, frecuencia y sentido de las variaciones del campo

magnético. En la literatura científica un gran número de trabajos prueban el efecto de los campos magnéticos sobre reacciones enzimáticas *in vitro*, dando efectos cualitativa y cuantitativamente diferentes dependiendo de la reacción que se trate y de las características del campo. Por otra parte, en los seres vivos al desplazarse en el seno de un campo magnético, como el terrestre o uno artificial, se induce una diferencia de potencial. Aunque el campo geomagnético es relativamente débil, estos efectos han sido observados en peces elasmobranquios. Se sabe que los tiburones y rayas poseen mecanismos basados en la inducción electromagnética para orientarse y localizar a sus presas y que la intensidad del campo magnético puede ser un factor limitante en la capacidad de respuesta del sujeto. También se ha propuesto que las aves migratorias poseen un mecanismo de orientación para la navegación basado en la generación de potenciales eléctricos inducidos electromagnéticamente. Igualmente, se ha encontrado que algunos microorganismos, particularmente bacterias, tienen la propiedad de orientar su movimiento en respuesta a un campo magnético externo (magnetotactismo), estas

bacterias contienen una o dos cadenas intracelulares ricas en partículas de hierro. Asimismo se han descrito propiedades de magnetosensibilidad para una gran diversidad de insectos migratorios y aún en el ser humano, aunque en éste último el hallazgo es controversial (Lin, 1994).

Por otro lado, las ondas de radio y algunos tipos de luz ultravioleta, son algunas radiaciones no ionizantes a las que el hombre está frecuentemente expuesto. Los efectos biológicos de las primeras están siendo determinados en la actualidad, mientras que el daño que produce la luz ultravioleta en el ADN se ha relacionado con la formación de dímeros de timina, que es la lesión más frecuentemente inducida por esta radiación, por

lo general estos daños son eliminados por las células a través de mecanismos de reparación por escisión. Si las células expuestas no son eficientes en este tipo de reparación, el daño al ADN permanecerá y la célula sufrirá alteraciones considerables como en el caso del *Xeroderma pigmentosum* y del cáncer en la piel (Brusik, 1987).

Las radiaciones no ionizantes de frecuencia extremadamente baja, como es el caso de los campos magnéticos de 60 Hz han mostrado tener efectos sobre los sistemas biológicos y se ha informado que éstos pueden afectar la velocidad de las reacciones y una gran cantidad de procesos bioquímicos (Galar-Castelan, 1988; Davis, 1992; Morales-Matamoros, 1997; Simko and Mattsson, 2004).

Desde el punto de vista físico, se ha demostrado que es el campo eléctrico inducido por el campo magnético variable el que determina la respuesta celular. Sin embargo, la influencia de un campo magnético estático añadida al campo variable, también ha quedado demostrada, por lo que el mecanismo de interacción es más complejo que la

sola influencia de campos eléctricos inducidos. Se supone que la interacción principal ocurre en la membrana celular y más específicamente en los canales iónicos, siendo los del calcio los que participan más activamente en las alteraciones biológicas (Lin, 1994).

Asimismo, se ha informado que los CEM de extremada baja frecuencia tienen efectos sobre procesos bioquímicos importantes en el humano, como en la síntesis de ADN, ARN y proteínas, cambios en la producción de hormonas, modificación de la respuesta inmune celular y cambios en el grado de crecimiento y diferenciación celular (Tenforde, 1991).

También se han obtenido evidencias experimentales que sugieren que los CEM afectan el crecimiento y la síntesis de ADN en varios tipos de células de origen procariotes y eucariotes (Cantini *et al.*, 1987; Goodman *et al.*, 1983; Liboff *et al.*, 1984; McLeod *et al.*, 1987; Rodan *et al.*, 1978; Takahashi *et al.*, 1987; Yen Patton *et al.*, 1988). Sin embargo, otras investigaciones realizadas acerca del efecto de campo eléctrico y magnético sobre la estructura del ADN en células de ovario de hámster chino (CHO) y en células humanas de la línea K562, señalan no haber detectado efectos medibles al aplicar campos de baja intensidad (Reese *et al.*, 1988; Fiorani *et al.*, 1992). No obstante, Mitnik *et al.*, (1995) reportan cambios a nivel fisicoquímico en la conformación del ADN al someterse a la acción de un campo eléctrico.

En la evaluación de los efectos de los campos electromagnéticos, otro modelo importante ha sido la síntesis y secreción de la hormona melatonina por la glándula pineal, expuestos a estos campos, para tratar de observar algún mecanismo promotor o inductor del cáncer, ya que se ha observado que al aumentar los niveles de esta hormona el nivel de estrógenos disminuye, reduciendo de esta manera el riesgo de desarrollar cáncer de mama, no obstante, el nivel y secreción de la hormona disminuye al estar bajo la influencia de un campo electromagnético (Kato *et al.*, 1993; 1994).

También, en otro estudio, Nordstrom *et al.*, (1983) encontraron un incremento en la frecuencia de malformaciones congénitas en niños de Suecia cuyos padres trabajaban en subestaciones eléctricas, lo cual podría indicar efecto genotóxico por los CEM.

Por otra parte Scarfi *et al.*, (1999), señalaron que en recientes estudios sobre la inducción de MN y proliferación celular en linfocitos humanos en cultivo, expuestos a un campo magnético sinusoidal de 50 Hz por 72 horas a intensidades de 0.05 a 1.0 mT,

no se encontró efecto genotóxico a las densidades de flujo magnético utilizadas, pero, el índice de proliferación celular se considera afectado significativamente en todas las intensidades utilizadas.

Se ha evaluado también el efecto de los campos eléctricos en embriones. En un estudio, se expusieron ratones C3H/He machos, a un campo eléctrico de 20 kV/m de 50 Hz de frecuencia por dos semanas. Después, cada ratón macho fue apareado con 2 hembras diferentes cada semana durante un período de 8 semanas para que las hembras fueran fecundadas por los ratones que habían sido expuestos al campo eléctrico y no se encontraron alteraciones en la sobrevivencia de los embriones (Kowalczyk *et al.*, 1990).

Por otra parte, es bien sabido que los CEM de baja frecuencia pueden producir una variedad de efectos benéficos en los sistemas biológicos. Los campos magnéticos pulsantes por ejemplo, son usados para la reparación de fracturas óseas, Andrew y Basset (1989), mostraron que el tejido óseo es sensible a campos magnéticos y eléctricos de baja frecuencia. Primero se sometió al tejido a un campo magnético variable de baja

frecuencia y se detectó que en el tejido se inducía una corriente, ya que la lectura del voltímetro se modificaba en presencia de dicho campo. De este modo se inició el estudio de la posible utilización de campos magnéticos para la terapia de fracturas persistentes y en algunos casos, de osteoporosis. En este sentido, se puede mencionar un estudio en donde expuso ratas hembras no osteoporóticas a CEM pulsantes por seis meses y encontró un incremento en el volumen y actividad en la formación de hueso en las patas traseras (Mishima, 1988).

5.3 Efecto de los CEM en microorganismos

Se han realizado recientemente estudios en los que encuentra que los microorganismos son sensibles a los CEM, por ejemplo, Ramón *et al.*, (1987) expusieron a CEM de 800-1,000 Hz con intensidades entre 0.8 y 2.5 mT a *Bacillus subtilis* mutante FJ7, para evaluar el efecto en el crecimiento, y encontraron un aumento en el número de células comparado con el grupo control de referencia, además de modificarse la morfología de dicho bacilo, por lo cual, concluyeron que el campo magnético puede alterar el crecimiento del microorganismo. Por otro lado, Tabrah *et al.*, (1994) expusieron a *Salmonella typhimurium* a un CEM sinusoidal de 0.2 mT en conjunto con el mutágeno azida de sodio por 48 horas y encontraron un incremento en la tasa de mutación del orden del 14% en comparación con un grupo testigo no expuesto al campo magnético.

Más recientemente, se ha investigado el efecto de los CEM sobre la inactivación del crecimiento sobre el género *Saccharomyces* que están presentes en yogurt y jugo de naranja. Al exponer el yogurt a una intensidad de 40 T (Tesla), se encontró una disminución apreciable en el número de microorganismos en dichos productos. (Pothakamury *et al.*, 1993).

En un trabajo posterior Alipov *et al.*, (1994) aplicaron CEM de 30 μ T con frecuencia de 7-12 Hz en *Escherichia coli* cepa K12AB1157 y demostraron que se afecta la conformación del genoma, división celular, síntesis de ADN y proteínas.

Por otro lado, existen estudios acerca de los efectos de los campos electromagnéticos sobre protozoarios. Ripamonti *et al.*, (1981) expusieron a *Spirotomum ambiguum* a un

campo magnético homogéneo estático de 12.5 T, para evaluar el efecto sobre la sobrevivencia del protozooario previamente expuesto al agente tóxico 2,2 dipiridil disulfuro. Ellos encontraron que en los protozoarios tratados con el campo magnético se disminuía significativamente su sobrevivencia, además de que se alargaba el ciclo celular, y ellos concluyen que el campo magnético con las características utilizadas, altera la regulación de los iones calcio a través de la membrana de este protozooario.

Dihel *et al.*, (1985) expusieron a *Paramecium* con un CEM pulsante de 72 Hz de frecuencia. Ellos observaron que dicho campo incrementa la división celular de *Paramecium* en un 8.5%, y sugieren que los campos electromagnéticos afectan el transporte de iones calcio a través de la membrana celular.

Más recientemente, Hemmersbach *et al.*, (1997), estudiaron el efecto de los CEM de 0.5-2.0 mT de 50 Hz sobre *Paramecium biaurelia*, *Loxodes striatus* y *Tetrahymena thermophila* y encontraron que se afectaba la velocidad de nado y una disminución en la dirección lineal en las células nativas. Sin embargo cuando se manejaba la mutante de *Paramecium tetraurelia* (se caracteriza por ser defectuosa en los canales de calcio), no se observaba cambio en movimiento del mismo. Estos resultados indican un efecto directo de los campos electromagnéticos de muy baja frecuencia sobre los mecanismos de transporte de iones en la membrana celular que controlan la actividad motil del ciliado.

5.4 Campos Electromagnéticos y Cáncer

En varios estudios epidemiológicos se ha correlacionado la exposición de los humanos a campos electromagnéticos con una alta incidencia de cáncer (Coleman *et al.*, 1983; McDowall, 1983; Milham, 1982, 1985; Pearce *et al.*, 1988; Tomenius *et al.*, 1982; Wertheimer y Leeper, 1979; Wright *et al.*, 1982; Blackman *et al.*, 1988; Liburdy, 1992). Desde finales de los años 70's se comenzó a presentar evidencia epidemiológica que indicaba un posible incremento en la frecuencia de varios tipos de cáncer, principalmente leucemia, cáncer de mama y tumores cerebrales debido a la exposición a CEM generados por vías de abastecimiento eléctrico (Schreiber *et al.*, 1993).

Por su parte, Perry (1994) encontró que cuando se expusieron cultivos de células cancerosas a campos magnéticos, se presentaba un aceleramiento significativo en el crecimiento celular, el cual continuaba a una tasa rápida aún después de la exposición al campo magnético. Asimismo en ratas en las que se indujo la formación de tumores

mamarios químicamente, se encontró que presentaban un grado mayor de crecimiento de tumor cuando se exponían a campos magnéticos de baja frecuencia.

Por otro lado, se ha sugerido que el riesgo de leucemia infantil puede estar relacionado con los efectos combinados de campos magnéticos estáticos y de campos magnéticos de frecuencia extremadamente baja. También se han realizado estudios epidemiológicos que han demostrado el incremento del riesgo a padecer leucemia en niños que viven cerca de líneas de distribución eléctrica (Bowman *et al.*, 1995; Blank, 1995; Fajardo-Gutiérrez *et al.*, 1993).

También Antonopoulos *et al.*, (1995) han sugerido que los CEM tienen relación con el cáncer, para esto, ellos incubaron cultivos de sangre periférica en presencia de un CEM de 5 mT y 50 Hz de frecuencia. Los resultados obtenidos indicaron que los efectos carcinogénicos originados por CEM no son de tipo iniciador, pero probablemente tengan efectos promotores.

5.5 Efectos de los CEM sobre la Expresión Génica

Libertin *et al.*, (1994) evaluaron el efecto de los rayos gama, luz ultravioleta, luz solar, microondas y CEM sobre la expresión génica mediada por un promotor de un virus de inmunodeficiencia. Ellos utilizaron células HeLa que fueron transfectadas con un vector que contenía el gen que expresa la enzima cloramfenicol acetil transferasa, el cual era regulado por el promotor HIV-LTR. Ellos encontraron que la luz ultravioleta y la radiación de microondas afectaban la activación del promotor HIV-LTR. Sin embargo la exposición a rayos gama, luz solar ó CEM no afectaba la expresión. Por lo cual concluyeron que no todos los tipos de radiaciones son capaces de afectar la expresión de este promotor.

Por otra parte, en 1995 Saffer y Thurston expusieron células Daudi y HL60 humanas a CEM con un rango desde 5.7 μ T hasta 10 mT de 60 Hz de frecuencia por 20 y 60 minutos, para evaluar la expresión del gen MYC. Ellos encontraron por medio de PCR, que los CEM de frecuencia extremadamente baja no inducen cambios significativos en la expresión del gen.

Otros resultados similares fueron obtenidos por Balcer-Kubiczek *et al.*, (1996). Ellos evaluaron el efecto de los CEM sobre la expresión de gen de la ornitina descarboxilasa.

Para lo cual expusieron por 24 horas células de embrión de hámster sirio y fibroblastos de ratón C3H/10T1/2 a CEM de 200 μT de 60 Hz. No encontraron efectos de los CEM sobre la expresión de esta enzima en estas células. Por otra parte se han obtenido resultados similares en otros estudios recientes (Shi *et al.*, 2003; Luceri *et al.*, 2005).

Por otra parte, en otro trabajo (Grimaldi *et al.*, 1997) expusieron a la línea celular humana Akata previamente infectada con el virus de Epstein-Barr (EBV) a un CEM de 50 Hz. Ellos encontraron un incremento en el número de células que presentaban de manera temprana antígenos de EBV. Por lo cual concluyeron que el CEM puede ser un modulador de la expresión génica.

Sin embargo Lin *et al.*, (1997) obtuvieron resultados distintos. Ellos determinaron el efecto de los CEM sobre la expresión de los genes de choque térmico en células humanas. Para esto expusieron células HL60 a CEM de 60 Hz bajo temperaturas de crecimiento normales. Se encontró incrementada la transcripción del gen hsp70, además de un aumento en la síntesis de la proteína HSP70, y por esto concluyeron que los CEM estimulan la producción de proteínas de estrés de manera similar a otros factores de estrés fisiológicos.

En otro trabajo realizado también por Lin *et al.*, (1998) se investigó la posible participación de elementos genéticos adicionales sobre la expresión de HSP70 inducida por campos magnéticos. Se evaluó la exposición a campos magnéticos y al choque térmico sobre la unión ADN—proteína de los factores de transcripción HSF, AP-1, AP2 y SP1 en cuatro líneas celulares. Los sitios de transcripción para estos factores están

localizados en el promotor HSP70. La actividad de AP-1 no se incrementó por el choque térmico, sin embargo sí se incrementó con el campo magnético. Se encontró además que el choque térmico solo inducía la unión de HSF. Ellos concluyen que los campos magnéticos inducen la transcripción de HSP70 y que hay un posible mecanismo de los campos magnéticos directamente con el ADN porque los campos magnéticos penetran a la célula y pueden interactuar con los electrones presentes en las bases nitrogenadas del ADN.

Por otra parte, Jahreis *et al.*, (1998) evaluaron el efecto de los CEM de 0.1 mT de 60 Hz sobre la expresión de los oncogenes c-fos, c-jun y c-myc. Para tal fin se expusieron células CEM-CM3 a CEM generados por bobinas de Helmholtz por períodos de tiempo de 15, 30, 60 y 120 minutos, para posteriormente extraer el núcleo y ARN citoplasmático. No encontraron diferencia en los niveles de transcripción de estos oncogenes entre el grupo expuesto al CEM y el grupo control.

Otro trabajo interesante es el realizado por Campbell-Beachler *et al.*, en 1998 en células PC12 de ratón estimuladas con el factor de crecimiento nervioso (NGF), en donde evaluaron el efecto de los CEM de 60 Hz sobre la expresión de c-fos. Ellos expusieron estas células al NGF, a las concentraciones de 2,4,8 y 16 ng/ml, para luego exponerlas a CEM de 12.5, 25,50 y 100 μ T por 30 minutos. Posteriormente determinaron los niveles de transcripción de c-fos mediante el análisis de Northern blot usando sondas marcadas con P³². No encontraron cambios en la expresión de este gen. Sin embargo cuando expusieron las células a una combinación de agentes químicos (NGF, fosfocolina y acetato de tetradecanoforbol [TPA]) y posteriormente al CEM,

encontraron que se incrementaba al doble la expresión de c-fos comparado con el grupo control no expuesto al CEM y concluyen que la exposición de células previamente tratadas con los agentes NGF, fosfocolina y TPA juntos y expuestas posteriormente a CEM presentaron un incremento en la expresión de c-fos.

Por su parte, Cairo *et al.*, (1998), determinaron el efecto de los CEM de frecuencia extremadamente baja sobre la expresión de ARN mensajero de sigma 32 en *Escherichia coli*. Ellos expusieron esta bacteria a CEM de 1.1 mT de 60 Hz por un tiempo de 15 minutos, y encontraron que las intensidades utilizadas incrementaron los niveles intracelulares de ARN mensajero.

En otro trabajo, (Tsuchiya *et al.*, 1998), se determinó el efecto de los campos magnéticos sobre la actividad transcripcional de *E. coli*. Los investigadores expusieron a la bacteria a un campo magnético que variaba entre 5.2 y 6.2 Teslas y que era producido por medio de magnetos superconductores, y encontraron que el crecimiento se

incrementó 3 veces en la fase estacionaria comparado con el grupo control. Después se expuso al campo magnético una cepa de *E. coli* defectuosa en el gen *rpoS*, el cual codifica para el factor sigma y observaron la sobrevivencia en la fase estacionaria disminuida. Posteriormente se utilizó una cepa de *E. coli* que contenía una fusión *rpoS-lacZ*, para después exponer al campo magnético, observándose un incremento en la actividad de la β -galactosidasa. Con base a estos resultados concluyen que el campo magnético utilizado incrementa la actividad transcripcional en la fase estacionaria, así como un aumento de sobrevivencia celular.

Por otro lado, Tuinstra *et al.*, (1998) examinaron el efecto de los CEM de 1.5 mT de 60 Hz y el ester de forbol sobre la proteína quinasa C. Ellos probaron el efecto de estos factores solos y de manera combinada, y realizaron 2 experimentos. En el primero expusieron cultivos celulares a CEM y forbol 12-miristrato, 13 acetato (PMA) a una concentración de 2 μ M y a la combinación de estos factores por 1 hora y no encontraron incremento en la actividad de la proteína quinasa C. En el segundo experimento, las células fueron previamente expuestas a una dosis menor a la óptima de PMA (50 nM) por 45 minutos, para posteriormente exponer tanto al CEM como al PMA por 15 minutos. Los datos indicaron una disminución en la actividad de la quinasa C a nivel citoplásmico y un aumento de actividad a nivel de membrana celular. Ellos sugieren que los CEM actúan de manera sinérgica sobre una vía que está siendo activada.

En otro trabajo realizado por Lagroye y Poncy (1998) se determinó el efecto combinado de los CEM de 50 Hz y la radiación ionizante sobre la expresión de c-fos y c-jun. En este trabajo se expusieron células de epitelio traqueal y otras 2 líneas celulares inmortalizadas, a los siguientes tratamientos: a) CEM de 0.1 mT de 50 Hz combinado con radiación gamma producida por ^{60}Co b) solo CEM de 0.1 mT y c) exposición únicamente de radiación gamma. Los resultados que obtuvieron fueron un incremento en la expresión de c-fos cuando se trataba únicamente con CEM o radiación ionizante. Sin embargo no se encontró efecto sinérgico al utilizar ambos factores. Se concluye que el CEM puede ser considerado como un agente capaz de afectar la expresión génica a nivel celular.

Por su parte, Han *et al.*, (1998) expusieron células humanas de mama normal (HTB124) a campos magnéticos de 60 Hz y examinaron los niveles de la proteína hsp70 después de la exposición, en este trabajo utilizaron 3 tratamientos: a) exposición continua a CEM por 3 horas, b) exposición por 20 minutos y c) exposiciones repetidas a CEM con duración de 20 minutos con diferente dirección del campo magnético. Los resultados obtenidos indicaron que en el tratamiento de 3 horas continuas a los 20 minutos iniciales, se presentaban niveles de hsp70 hasta de un 46%, sin embargo conforme pasaba el tiempo disminuían los niveles. Cuando se exponía solo por 20 minutos los valores se mantenían altos por más de 3 horas. Cuando las células se expusieron repetidamente a intensidades de 20 minutos los niveles de hsp70 fueron continuamente más elevados que el grupo control.

En otro trabajo elaborado por Lin *et al.*, (1999) se determinó cual era el sitio de respuesta del promotor HSP70 a campos magnéticos. Ellos encontraron que la expresión del gen HSP70 por campos magnéticos es afectada a nivel de la transcripción y es mediada por la unión de la proteína c-myc a dos secuencias nCTCTn localizadas entre -230 y -160. Por otra parte ellos informan otro sitio de unión de c-myc (entre -158 y -162) el cual es un importante regulador de la expresión de HSP70 inducida por campo magnético. Además, encontraron que el elemento de choque térmico, localizado entre -180 y -203 es requerido para la inducción de la expresión génica de HSP70 por campos magnéticos.

Por otra parte, Miller *et al.*, (1999) evaluaron el efecto de los CEM de 0.08, 0.1, 1.0 y 1.3 mT de 60 Hz sobre la expresión de los genes NF-kappaB y AP-1 en una línea de

células promonocíticas de leucemia humana. Ellos encontraron que las intensidades magnéticas utilizadas no tienen efecto sobre la expresión de los genes NF-kappaB y AP.

En un estudio realizado en 1999 (Loberg *et al.*) se determinó si existía relación entre los campos magnéticos y la expresión génica de genes humanos relacionados con cáncer de epitelio de mama, éstos son C-erb, B-2, p53, p21, GADD45, bax, bcl-x, mcl y c-fos . Para esto evaluaron el efecto de campos magnéticos de 60 Hz de frecuencia a las intensidades de 0.01, 0.1 y 1.0 mT en células HBL-100 por períodos de 20 minutos hasta por 24 horas, dichos grupos iban emparejados con un grupo control que estuvo expuesto solamente a campos magnéticos ambientales (<0.0001 mT). Los resultados obtenidos no mostraron una alteración de la expresión génica provocada por campos magnéticos por lo cual concluyen que estos campos no tienen relación con la influencia de inducción de cáncer de mama mediante el mecanismo de expresión de estos genes.

Hallazgos similares a los anteriores fueron obtenidos por Morehouse y Owen (2000a). Su objetivo era determinar si existe una relación entre campos electromagnéticos y el cáncer: Ellos evaluaron el efecto de los campos magnéticos de 60 Hz de 6.3 a 8.0 μ T sobre la línea celular HL60, los resultados obtenidos fueron comparados con un control positivo de choque térmico de 42 a 44°C, y no encontraron efecto de los campos magnéticos sobre la expresión de HSP70.

En un estudio reciente (Pipkin *et al.*, 1999) se determinó el efecto de los campos magnéticos sobre la expresión de proteínas de estrés. Para esto, un cultivo de células HL60 fue expuesto por 2 horas a un campo magnético sinusoidal de 0.1 a 1 mT de 60 Hz de frecuencia para su posterior marcaje mediante isótopos radiactivos. Los marcadores

radiactivos fueron incorporados en las proteínas celulares por síntesis o fosforilación. Las proteínas fueron obtenidas electrostáticamente y las proteínas de choque térmico fueron analizadas por síntesis y fosforilación en gel bidimensional de poliacrilamida. Los resultados obtenidos no indicaron diferencia estadística entre el grupo expuesto al campo magnético de 0.1 mT y el grupo control; sin embargo si se encontró un incremento significativo en las proteínas de choque térmico en el grupo expuesto a campos magnéticos de 1.0 mT y el grupo control. Por esto los autores concluyen que el campo magnético de 1.0 mT interactúa en el nivel celular para inducir proteínas de estrés.

Por otra parte Miki *et al.*, (1999) investigaron los efectos de los campos magnéticos sobre la síntesis de ARN en un sistema libre de células. Se utilizó una mezcla de transcripción la cual contenía el ADN del promotor intermedio de CMV además de extractos nucleares de células HeLa. La mezcla de reacción se expuso a campos magnéticos a las intensidades de 10, 50 y 100 μ T. Cada grupo expuesto fue emparejado con un grupo control no expuesto a dicho factor. Los resultados obtenidos no mostraron diferencia en la síntesis de ARN entre los grupos expuestos a campos magnéticos y el grupo control.

Otro trabajo similar fue el obtenido por un grupo de investigadores que determinaron el efecto de un campo magnético de 8 μ T de 50 Hz de frecuencia por 20 minutos sobre la expresión génica de HSP70a, en larvas de *Drosophila sp* utilizando slot blot. Los resultados indicaron que los campos magnéticos de muy baja frecuencia provocan disminución en los niveles de transcripción. Por lo cual los investigadores sugieren que

estas respuestas experimentales pueden ser influenciadas por una exposición previa o carecer de exposición previa (Tipping *et al.*, 1999).

En un estudio (Morehouse y Owen, 2000b) determinaron el efecto de los campos magnéticos sobre la expresión del gen MYC en células Daudi. Para lo cual dichas células fueron expuestas a campos magnéticos de 60 Hz de intensidades de 12.5, 50, 100 y 500 μT por 20, 40 y 60 minutos, todos los tratamientos iban emparejados de un grupo control no expuesto a dicho factor físico. La expresión de MYC fue determinada mediante la técnica de hibridación de northern blot. Los resultados obtenidos indicaron que los campos magnéticos no alteran de manera significativa la expresión de MYC en células Daudi.

Por otro lado, Ventura *et al.*, (2000) evaluaron el efecto de los campos magnéticos de frecuencia extremada baja sobre la expresión de genes de opioides. Ellos expusieron miocitos de rata a campos magnéticos y determinaron la expresión del gen de la prodinorfina. Los resultados obtenidos indican que los campos magnéticos son capaces de incrementar la síntesis y secreción de prodinorfina en una célula intacta, por lo cual concluyen que el gen opioide de células de células de miocito es activado por la exposición a campos magnéticos.

En este mismo año, Romano *et al.*, (2000) determinaron el efecto de los CEM de 50 Hz sobre la expresión del oncogen *ets1*. Para lo cual analizaron dicha expresión en células hematopoyéticas y testiculares. Se encontró sobreexpresión del ARNm de *ets1* a la intensidad de 45.7 μT en células Jurkat linfoblastoide y en células TM3 Leydig. Por lo que concluyen que los CEM son capaces de inducir la expresión génica.

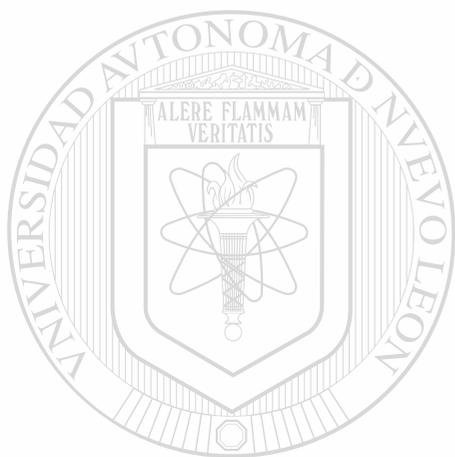
Más recientemente (Di Carlo *et al.*, 2002) expusieron embriones de pollo con CEM de muy baja frecuencia, para determinar si se afectaba la protección contra hipoxia además de los niveles de Hsp70, utilizando como base experimentos previos. Expusieron embriones de pollo a CEM de 8 μ T por 4 días de forma continua o de manera repetida en períodos de 20, 30 o 60 minutos 1 o 2 veces al día. Encontraron que cuando se expone de manera continua, los embriones disminuían los niveles de Hsp70 en comparación con un grupo control, además se observó una disminución en la protección contra el estrés hipóxico. Por esto concluyen que la exposición a CEM durante periodos prolongados provoca una disminución en los niveles de Hsp70 y afecta también la citoprotección.

Además, en un estudio reciente (Tokalov y Gutzeit, 2004) se pretendió demostrar si los genes de choque térmico en las células humanas podían responder a CEM solos y en la combinación con estrés térmico. Después de exponer células HL-60 por 30 minutos

con CEM de 10 hasta 140 μ T, ellos cuantificaron la expresión de los genes HSP27, HSP60, HSP70 (A, B, y C), HSC70, HSP75, HSP78, y HSP90 por RT-PCR. Los resultados mostraron que los genes de choque térmico, en particular los tres genes de HSP70 (A, B, y C), son inducidos por CEM, estos resultados fueron reforzados por exposición tanto a CEM como choque térmico. La respuesta a CEM mostró un máximo a una densidad de flujo magnético de 60-80 μ T.

Por otro lado, aparte de la identificación de elementos de respuesta a CEM en el gen hsp70, recientemente un grupo asiático clonó e identificó genes de respuesta a CEM en células Daudi (Wu *et al.*, 2000). Ellos utilizaron el ARN total aislado de células

expuestas a 0.8 mT de 50 Hz de frecuencia además de células no expuestas a dicho factor; y encontraron diferencias en la regulación de transcritos entre las células expuestas a CEM y el grupo control utilizando la tecnología de visión diferencial, además el patrón de transcritos se verificó mediante el análisis de Northern-blot y Northern-blot en reversa. El análisis de secuencia de ADN demostró que el fragmento de cDNA es un nuevo gen en células humanas que puede ser inducido por CEM.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

6. MÉTODOS

6.1 Construcción de un vector que tenga elementos de respuesta para CEM

6.1.1 Clonación del promotor en el vector pNFkB-luc (Clontech, # Cat 631904)

La secuencia del promotor de hsp70 fue introducida en el plásmido pNFkB-LUC (Figuras 1 y 2), el cual contiene: una señal de poliadenilación del virus de simio 40 (SV40), un gen de resistencia a penicilina, el gen *luc* que expresa la luciferasa. El promotor será insertado dentro de este vehículo de manera completa, la cual contiene los elementos de respuesta a CEM. El vehículo resultante será entonces llamado pCEM.

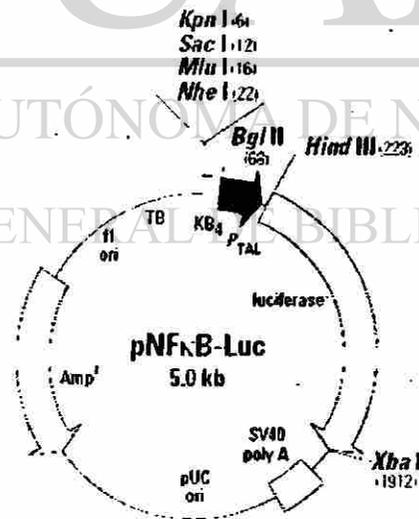
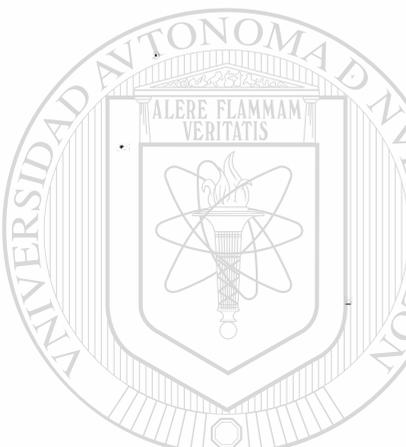


Figura 1. Mapa del vector pNFkB-luc de 5.0 Kb mostrando los sitios de restricción.

GGTACCGAGC TCTTACGGGT GCTACGGGGA ATTTCCGGGA ATTTCGGGGA ATTTCGGGGA
ATTTCAGAT CTGCCZCCCC GACTGCATCT GGGTGTTCGA ATTCCGCAMT GACAGAGGCG
TGGCGGGGAT TTGTGTCACT ATAGAACTAA AGACATGCCA ATATATTTCCT TCCGGGGGAC
CGCCGAGCAA AGCGGAGCAA CGCGCCAGG GATGAGGCA GAACCTTGGC ATTCGGCTAC
TGTTCGTAAA GGCACCATGG ANGAGCCCAA AAACATPAAG AAAGCCCGCC GCGCATCTTA
TCCGCTGAAA GATGGAAACG CTGAGAGCCA ACTGCATAGG GCTATGAAA GATAGCGGCT
GGTCTTCGAA ACAATTGCCT TTACAGATGC ACATATGAG GTGCAGATCA CTTAGCCTGA
GTACTTCGAA ATGTCCGTTT CGTTCGZAGA AGCTATGAAA CGATATGGC TGAATACAAA
TCCAGAGATC GTGGTATGCA GTGAAACTC TCTTCGATTC TTATAGCCGG TGTTCGGGCG
GTATATTATC GGAGTTCGAG TTCCGCGGG GAAAGAGATT TATATGAGC GTGATTTCTT
CAGACATATG GGCATTTCCG AGCTTACGCT GGTGTCTGTT TCCAAANCG GZTTCGAAAA
AAITTTTCAC GTGCAAAAAA AGCTCCGZAT CATCCAAAAT ATATTATCA TGGATYCTAA
AAKGGATTAC CAGGGATTTC AGTCCAGTA CAGGTTCTTC ACATCTCATC TACCTCCGGG
TTTTATGAA TACGATTTTG TGCCGAGTC CTTCGATGG GACAGAGCAA TTGCACTGAT
CATGAATCC TCTGGATCTA CTGGTCTGCG TAAAGGTGTC GCTCTGCCC ATAGAACTGC
CTGGTGTAGA TTCTCGCATG CCGAGGATCC TATTTTGGC AATCAATCA TCCGGGATAC
YGGGATTTTA AGTCTGTTTC CATTCGATCA CAGTTTGGG ATGTCTACTA CACTCGGATA
TTTGAATGCT GGAFTTCGAG TGCTCTTAAT GTATAGATTC GAAGAGAGAC TGTTCCTGAG
GAGCGTTGAG GATTAACAAGA TTCAAAGTGC GCTGCTGGTG CCAACCCATY TCTCTTCTT
CGCCAAAAGC ACTCTGATTT ACAAAATAGG TTTATTAAT TTACAGGAAA TTGCTTCTGG
TGGCGCTGCC CTCTCTANGG AAGTCCGGGA AGCGTTTCC AAGAGGTTCC ATCTCGCCGG
TATCGGCAA GGAATGGGC TCACCTGAGC TACCTCAGCT ATCTGZATTA CAGCCGAGGG
GGATGATAA GGGGGCCGGZ GCGTTPANGT TGTTCARIT TTGAAAGGA AGATTGTGGN
TCTGATATC GGGGAAACAG TGGGCTTAA TCAAGAGGC GACTCTGTG TGAAGATCT
TATGATATG TCCGCTATG TAAAGATTC GAAAGGACC AACCCCTTC TTGACAAAGG
TGGATGGCTA CATCTGGAG ACATAGCTTA CTGGGAGAA GAGGAGACT TCTCTATCTG
TGAAGCGCTG AAGTCTGCA TTAAGTAAA AGGCTATCAG GTGGCTGGZ CTGAATTGGA
ATCCATCTTG CTCACACCC CCAACATCT CSACCCAGGT GTGCGAGTC TTCCCGAATA
TGAAGCGGCT GAATCTCCCG CCGCTGTGT TGTTCGGG CAGCGAAGA GATGAOZGA
AAACAGATC GTGAFTAGG TCCCACTCA ASTRACACCC GCGAAATGT TGGGGGAGG
AGTCTGTTTT GTGACGAGG TACCGAAGG TCTTACDGA AACTCAGCC CAAGAAAAT
CAGAGATC CTCTAAMGG CCAAGAGGG CCGAAGATC GCGCTGATL TCTAGACTCG
GGCGCGCGC CCGCTCCGAG CAGACATGAT AAGATACTT GATGATTTG GACAAACAC
AACTAGAATC CAGTGAAMAA AATCGTTTTT TTGCAAAAT TGTGATGCTA TTGCTTATIT
TGTAACTAT AAGCTGCA AATAACAGT TAACAACAC AATTCGATCT ATTTATGTT
TCAAGCTCAG GGGGAGGTGT GGGAGTFTT TTAAGCAAG TAAACCTCT NCAAAATGG
TAAATTCGAT AAGGATCCGT CGAGCATGC CCTTCAGCG CTTCACCCA GTCACTCTT
TCCGTTGAG CCGGGZCNTG ACTATCGTG CCGCACTAT GACTGTCTC TTATCAAGC
AACTGTAAG ACACTTCGCG CAGCACTCT TCCCTCTCC CTCTACTGA CTCCCTCC
TCCGCTCTT GCTCTCGCC AGGCTATCA GCTCTCTCA AAGGCTAAT ACGCTATCC
ACGAATCAC GGGATACCG AAGAAAGCA ATGTGAGCA AAGGCAZCA AAGGCCAGG
AAAGTAAA AAGCGCGGTT GCTGGGTTTT TCCATAGCC TCCGCGCCG TGAAGAGAT
CAAAAAATC GAGCTCAGG TCGAGGTTG OGAACCCGA CAGGACTATA AAGTACCGA
GGTTTCCCC CTGGAAGCTC CCTCGTCCG TCTCTGTTC CGAGCCTGCC GCTTACCGGA
TAACTGTCCG CCTTCTCCG TTGGGAAGC GTGGCGCTT CTGATAGCT ACGCTGAGG
TATCTCAGT CGGTGTAGGT CGTTCGCTC AAGTGGGCT GTGTGCAOZ ACCCCCGTT
CAGCGGAGCC GCTGGGCTT ATCCGATAC TATCTCTTG AGTCLAACCC GGTANGAC
GATTAATCG CACTGGCAG AGCCACTGCT AACAGATTA GCGAGGGAG GTATGAGCC
GGTCTAGCG AFTCTTGAA TGTGTGGCT TACTAGGCT AACTAGAGG AACTAGAGG
GGTACTGCG CTCTCTGAA GCGAGTTACC TTGGAAAAA GAGTTGATG CTCTTAGCC
GGCAACAAZ CCAACCGCTG TAGCGGTGT TTTTTGTTT GCAAGCAZCA GATTAGCCG
AGAAAAAAG GACTCANGA AATCTCTTG AXTTTTTCTA CGGGTCTGA GCTCCGTTG
AAAGAAACT CAGCTTACG CATTTGCTC ATAGGATTTT CAABAAZAT CTCTCCCTAG
ATCTTTTAA ATTAAMAGG AAGTTTAAA TCAATPFAA GTATATGZ CTAACTCTG
TCTCAGCTT ACAAATGCT AATCAGTGC GCACTATCT CAGGATCTG TCTATTTCT
TCTACATAG TTGCTGACT CCGCTCTGZ TAGATANTA GATAGCGGA GCGTAAZCA
TCTGCGCCA GTGTCZAAZ GATACCGGA GACCCAGZC CAGCGCTCC AGATTATCA
GZATAAAC AGCCACCCCG AAAGCGGAG CCGCAAGTC GTCCGCAAC TTATCCCGCC
TCACTCAGT CTATTAATG TTGCGGGAA GZTAGAZAA GTAGTTCGC AGTAAATAGT
TTGCGCAAGZ TGTGTGCAT TGTAGAGCC AGCTGTGCT CAGCTGCTC GTTGGTATG
GCTTCAITCA GCTCGGCTC CCAAGATCA AAGCGGATTA CATGATCCG CAGTTCTGC
AAAAAAGCG TTAGCTCTT CCGTCTCCG ATGZTTCTA GAAGTAACT GCGCGAGTG
TTATCACTCA TGTATAGCC AGCACTCAT AATCTCTTA CTGTCAZGC ATCCGTAGA
TGTCTTCTG TGACTGGTGA GTACTGANC AAGTCAITCT GAGAAZATG TATGGGGGA
CGAGTTGCT CTGCGCGGC GTCAATAGG GATTAATCC GCGCACTAG CAGAACTTA
AAAGTCTCA TCAITGGAAA AXTTCTTCC GGGCAAAAC TCTCAAGGT CTIACCCTG
TTAGATGCA GTTGGATGA AGCCACTCT GCGCCAGAT GATCTTACG ATCTTTACT
TTACACAGC TTCTCTGGT AAGAAAZCA GZAGGZAAA ATGCGGAAA AAGGGATTA
AGCGCACZC GGAATGTTG AATCTGATA CTCTCTTCT TTGATATTA TTGAGCATT
TATCAGGTT ATGTCTCAT GAGGAGTAC ATATTTGAAZ GTATTGAAA AAATAANCA
ATAGGGGTC CCGGCAAT TCCCGAAA GTCCGCTG ACGCGCCGZ TAGCGGZCA
TTAAGCGZG CCGGTGTGTT GGTAGCGCC AGCGTACCC CTACACTGC CAGCGCCTA
GGCGCGCTC CTTCGCTT CTTCCGCA TTCTCGCA CTTTCGCGG GTTTCGCGT
CAGCTCTAA ATCGGGGCT CQCTTAGGG TTGGAATTA GTGTTTACC GCACTCGAC
CGCAAAAAC TTGAATAGG TGAZGCTCA CTAAGTGC CATCGCCGZ ATAGAGGCT
TTGCGCCTT TGACGTTGA CTAAGGTC GTCATTTCT TTAATAGZ GACTCTGTT CCAAACTGA
ACAACACTA ACCCTATCT GCTTATTC TFGATTTAT AAGGATTT CCGGATTTGZ
GCTATTGZ TAAAAATGA GCTGATTA CAAAAATTA ACGGATTT TANCAAAAT
TTAACGTTA CAATTTGCA TTCCGATTC AAGCTGCGZ ACTTTCGGA AAGGAGATG
GTGCGGACT CTTCGATTT AGCCGAGC AAGCTGAT GATACTAGZ TAAATTAAG
GTAGCGAGC TACTTCGAGC GCGCGATA AAATATCTT ATTTCTATA CATCTGZG
TGGTTTTT GTTGAATCG ATAGACTAA CATACTCT CCAZCAAAZ AAAGCAAG
AAACAACT ACAAATAG GCTGTCCCA CCGAGTGC AGTTCGAGA ACATTTCTCT
ATGATA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

Figura 2. Secuencia de nucleótidos del vector pNFKB-luc.

6.1.2 Preparación de células competentes

- 1.- De un cultivo de *Escherichia coli* DH5 α se tomó una asada y se inoculó un tubo cónico conteniendo 15 ml de medio LB sin antibiótico. Se incubó durante 24 horas a 37°C.
- 2.- Al siguiente día se toma 1 ml de la suspensión bacteriana y se agregó en 30 ml de medio LB también sin antibiótico y se mantuvo el crecimiento hasta la fase log a 37°C a 280 rpm por 2-3 horas. Luego se distribuyó a tubos cónicos estériles de 15 ml.
- 3.- Posteriormente se centrifuga a 7000 rpm por 10 minutos.
- 4.- Se eliminó el sobrenadante y se agregó al paquete celular 6 ml de CaCl₂ 0.1 M y se resuspendió y se mantuvo en baño de hielo por 30 minutos.
- 5.- Después se centrifugó a 7000 rpm por 10 minutos y se elimina el sobrenadante.
- 6.- El paquete celular obtenido se resuspendió con 1 ml de CaCl₂ 0.1 M y se mantienen las células a 4°C por toda la noche.

6.1.3 Transformación de *Escherichia coli* con el vector pNFKB-luc

- 1.- De la suspensión de células competentes obtenida se tomaron 100 μ L y se mezclaron[®] con 1 μ L del plásmido pNFKB-luc y posteriormente se mantuvo en hielo por 30 minutos.
- 2.- Después se expuso la suspensión a un choque térmico de 42 °C por exactamente 1 minuto.
- 3.- Luego se volvió a colocar el vial con la suspensión en hielo por 1 minuto.
- 4.- Después se agregaron 500 μ L de medio LB sin antibiótico y se incubaron a 37°C por 1 hora. En agitación (500 rpm en el Thermomixer 5436).

5.- Luego se extrajeron 200 μL de la suspensión celular conteniendo el plásmido y se agregaron en 5 ml de agar o caldo LB adicionado con penicilina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

6.- Se incuban a 37°C por 24 horas.

6.1.4 Obtención de plásmidos de colonias múltiples por miniprep

1.- En tubos conteniendo 5 ml de caldo LB adicionado con ampicilina se inocularon con *Escherichia coli* DH5 α conteniendo el vector pNFkB-luc; posteriormente se incubaron a 37°C por toda la noche.

2.- Al siguiente día, se tomaron 2 ml de la suspensión bacteriana y se vierten en un tubo eppendorf estéril, para luego centrifugar a 13000 rpm durante 1 minuto.

3.- Transcurrido dicho tiempo se eliminó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió con 70 μL de colorante Dye.

4.- Posteriormente se agregaron 40 μL de fenol saturado y se mezcló vigorosamente en el vortex por aproximadamente 1 minuto.

5.- Después se centrifugó a 13000 rpm por 3 minutos y se eliminó el precipitado, al sobrenadante se le agregaron 12 μL y se coloca en un carril de un gel de agarosa al 0.8%.

6.- Se corrió la muestra a 100 V hasta $\frac{3}{4}$ partes, para finalmente revelar el gel sumergiéndolo en bromuro de etidio.

6.1.5 Purificación de plásmidos mediante miniprep de acetato de potasio

1.- Se inocularon 20 μ L de *Escherichia coli* que contenían el vector pNFKB-luc en un tubo cónico con 15 ml de medio LB adicionado con ampicilina a una concentración de 50 μ g/ml y se incubó por 24 horas bajo agitación a 37 °C.

2.- Transcurrido dicho período, las células se centrifugan a 2500 rpm por 20 minutos.

3.- Posteriormente se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió con 1ml de solución I (Apéndice 1), se mezcla en el vortex y se dejó reposar en hielo por 5 minutos.

4.- Después se agregaron 2 ml de solución II y se mezcló muy suavemente y se mantiene en hielo por 5 minutos.

5.- Luego se agregaron 1.5 ml de solución III, se mezcló vigorosamente y se dejó reposar en hielo 5 minutos.

6.- La mezcla obtenida se distribuyeron 1.5 ml en tubos eppendorf y se centrifugaron a 13000 rpm por 1 minuto.

7.- El sobrenadante obtenido fue transferido a un tubo eppendorf estéril y se agregan 350 μ L de PG 8000 y se incubó en hielo por 30 minutos.

8.- Posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm por 10 minutos.

9.- Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 70 %.

10.- Se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos.

11.- El botón final conteniendo el plásmido fue secado a 60 °C por 10 minutos y se resuspendió con 20 μ L de agua para PCR.

6.1.6 Maxiprep con acetato de amonio

1. Se tomaron 2 ml de la suspensión bacteriana de *Escherichia coli* conteniendo el vector pNFKB-luc y se vertieron en un matraz conteniendo 250 ml de caldo LB adicionado con 250 μ L de ampicilina a una concentración de 50 μ g/ml, y se incubó a 37°C por 24 horas.
2. Transcurrido el tiempo las células se centrifugaron a 3100 rpm por 20 minutos.
3. Se resuspendió el paquete celular con 6 ml de la solución 1 fresca y se incubó en hielo por 20 minutos (Apéndice 1).
4. Posteriormente se agregaron 12 ml de la solución II y se mezcla por inversión y se incuba en hielo por 10 minutos.
5. Luego se agregaron 9 ml de acetato de amonio 7.5 M a pH 7.6, se mezcló vigorosamente utilizando el vortex por 5-10 segundos y se incubó en hielo por 10 minutos.
6. Transcurrido este lapso se centrifugó a 8000 rpm por 15 minutos.
7. Después el sobrenadante se vertió a un tubo fresco estéril y se le agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol (16 ml) y se incubó a temperatura ambiente para luego centrifugar a 8000 rpm por 15 minutos. Después de la centrifugación la pastilla fue resuspendida en 4ml de acetato de amonio 2.0 M a pH 7.4 se mezcló generosamente y se incubó en hielo 10 minutos.
8. Se volvió a centrifugar a 8000 rpm por 15 minutos y el sobrenadante resultante fue puesto en un tubo fresco y se agregaron 4 ml de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos.
9. Se vuelve a centrifugar a 8000 rpm por 15 minutos y el precipitado resultante se resuspende en 1 ml de agua bidestilada estéril y se agregan 10 μ L de RNAsa a una concentración de 5 mg/ml y se incuba a 37°C por 20 minutos.
10. Después se agrega 1 ml de acetato de amonio 7.5 M a pH 7.6 y se mezcla por inversión. Se incuba a temperatura ambiente por 5 minutos para después centrifugar a 8000 rpm por 15 minutos.
11. El sobrenadante se pasa a un nuevo tubo y se le agregan 3 ml de isopropanol, se mezcla y se incuba a temperatura ambiente por 10 minutos.

12. Se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos y el precipitado resultante fue lavado con 1 ml de etanol al 70%, se centrifuga a 8000 rpm por 15 minutos.
13. Se eliminó el sobrenadante se seca 10 minutos a 60°C y se resuspende con 50 µl de agua para PCR.

6.1.7 Digestión parcial de pNFKB-luc para despojarlo de su promotor original mediante las enzimas NheI y HindIII

1. En un tubo eppendorf estéril se agregó 1 µL del plásmido pNFKB-luc.
2. Posteriormente se adicionan 15.8 µL de agua para PCR, 2 µL de amortiguador D, 0.2 µL de BSA y 1 µL de la enzima 1 µL de NheI.
3. Después se incubó a 37°C por 1.5 horas bajo agitación continua en el mezclador – incubador (Thermomixer 5436 Eppendorf, Instrumental Brinkmann # de serie 11510).
4. Finalizado el tiempo anterior se agregó 1 µL de Hind III y se incubó con las condiciones antes mencionadas por 5 minutos.

5. Concluido el lapso de tiempo se procedió al análisis de la digestión mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %.

6.1.8 Purificación de pNFKB-luc sin su promotor original a partir de gel de agarosa mediante kit geneclean turbo (Marca de Qbiogene)

1. Se cortaron las bandas de gel y se colocaron en un tubo de 1.5 ml de microcentrífuga.
- 2.- Luego se agregaron 100 µl de solución de sal de turbo geneclean por cada 0.1 g de gel de agarosa y se mezclaron.
3. Después se incubó a 55 °C por 5 minutos para disolver el gel, invirtiendo el tubo para mezclar.
- 4.- Se transfirió un volumen menor a 600 µl de la mezcla obtenida en un turbo cartucho puesto en el interior de un tubo eppendorf.

- 5.- Se centrifugó por 5 minutos hasta que todo el líquido pasó a través del filtro. Después fue vaciada.
- 6.- Se agregaron 500 μ l de solución de lavado.
- 7.- Se volvió a centrifugar por 5 segundos y se vació el tubo.
8. Se centrifugó el turbo cartucho por cuatro minutos mas para remover la solución de lavado.
9. Se removió el turbo cartucho del tubo y se puso en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml.
10. Se agregaron 30 μ l de solución de elusión de turbo geneclean directamente sobre la resina embebida en la membrana y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos.
11. Se centrifugó por 1 minuto para transferir el ADN eluido para el tubo receptor. Se descartó el turbo cartucho y se cerro el tubo receptor de elusión.

6.1.9 Aislamiento de ADN a partir de sangre venosa periférica por medio del método TSNT

1. Se tomaron 300 μ l de sangre recién obtenida y se colocaban en un tubo eppendorf de 1.5 ml
2. Se agregaron 200 μ l de amortiguador de lisis.
3. Después se agregaron 500 μ l de fenol, mezclando suavemente por 1 minuto.
4. Se vertieron 100 μ l de amortiguador SEVAG (Cloroformo: Alcohol isoamilico 1:1).
5. Se mezcló vigorosamente por vortex por 5 minutos.
6. Después se agregaron 200 μ l de amortiguador TE 1X y se volvió a mezclar.
7. Se centrifugó a 15 rpm durante 15 minutos.
8. Posteriormente el sobrenadante es puesto en un nuevo vial.
9. Se precipitó ADN con 2 volúmenes de etanol al 100 % .
10. Se volvió a centrifugar 5 minutos a 15 rpm y se descartó sobrenadante.

11. El precipitado se lavó después con 1 ml de etanol al 70%.
12. La pastilla fue secada por 20 minutos a 60°C y se resuspende con TE 1X.
13. Se observó el ADN en gel de agarosa al 0.85%.

6.1.10 PCR para obtención de amplicon de promotor de hsp70 a partir de sangre venosa periférica

El ADN obtenido mediante purificación por TSNT fue expuesto a la mezcla de reacción que se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Mezcla de reacción utilizada para amplificar el promotor de hsp70.

Reactivo	Volumen (µl)
H ₂ O PCR	72.6
Amortiguador	10.0
Mgcl ₂	3
dNTPs	1
Oligo 1	2
Oligo 2	2
ADN	4
TOTAL	100

Las secuencias de los oligos para amplificar la región promotora de hsp70 de 273 nucleótidos fueron:

Oligo 1 (5'-3')

ctg gcc tct gat tgg tcc cga tcg

Oligo 2 (5'-3')

gct agc cgc cat gga gac caa cac cc

Después de haber hecho la mezcla, los tubos de reacción fueron puestos en el termociclador con el programa que se indica en la tabla 2.

Tabla 2. Ciclos de temperatura utilizados para obtener el producto de amplificación.

Temperatura (°C)	Tiempo (Min)	Numero de ciclos
94	1	1
94	1	10
52	1	
72	2	
72	5	1

Terminados los ciclos de incubación, se determinó la presencia del producto de PCR mediante la aplicación de muestra en gel de agarosa al 1.0 %, y se cortaron las bandas que contenían el amplicon para purificar posteriormente.

6.1.11 Purificación de promotor de hsp70 a partir de gel de agarosa mediante kit geneclean turbo (Qbiogene)

1. Se cortaron las bandas conteniendo el promotor de hsp70 de gel y fueron colocadas en un tubo de 1.5 ml de microcentrifuga.
- 2.- Luego se agregaron 100 μ l de solución de sal de turbo geneclean por cada 0.1 g de gel de agarosa y se mezclan.
3. Después se incubó a 55 °C por 5 minutos para disolver el gel, invirtiendo el tubo para mezclar.
- 4.- Se transfirió un volumen menor a 600 μ l de la mezcla obtenida en un turbo cartucho que fue puesto en el interior de un tubo eppendorf.
- 5.- Se centrifugó por 5 minutos hasta que todo el líquido pasa a través del filtro. Después se vació.
- 6.- Se agregaron 500 μ l de solución de lavado.

- 7.- Se centrifugó por 5 segundos y se vació el tubo.
8. Se centrifugó el turbo cartucho por cuatro minutos mas para remover la solución de lavado.
9. Se removió el turbo cartucho del tubo y se puso en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml.
10. Se agregaron 30 μ l de solución de elusión de turbo geneclan directamente sobre la resina embebida en la membrana y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos.
11. Se centrifugó por 1 minuto para transferir el ADN fluido para el tubo receptor. Se descartó el turbo cartucho y se cerro el tubo receptor de elusión.

6.1.12 Ligación de secuencia promotora de HSP70 a vector pGEMT-easy

Se realizó la ligación de pGEMT-easy vector (Figura 3), distribuido por Promega con el producto de PCR (Tabla 1). Para lo cual se calculó la concentración de inserto a ligar de la siguiente manera:

$$\text{ng de inserto} = ((\text{ng Vector})(\text{Kb inserto}))/\text{Kb Vector}$$

$$\text{ng de inserto de promotor de hsp70} = ((50 \text{ ng})(0.28 \text{ Kb hsp70}))/3.0 \text{ Kb Vector}$$

$$\text{ng de inserto de promotor de hsp70} = 4.66$$

Para una proporción 3:1 serían 14 ng de producto de PCR (promotor hsp70)

Tabla 3. Mezcla de ligación para obtener pGEM-T unido al promotor de hsp70

Reactivo	Reactivo
pGEM T	1
Mezcla de PCR	4
Ligasa	1

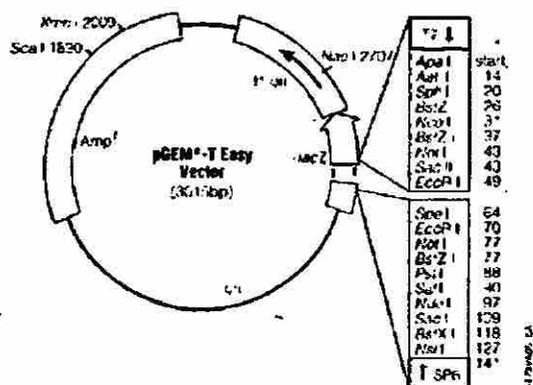


Figura 3. Mapa con sitios de restricción del vector pGEMT-easy (No Cat A1360)

6.1.13 Transformación de *E. coli* con el producto de ligación

- 1.- De la suspensión de células competentes obtenida se tomaron 100 μ l y se mezclaron con 1 μ l del producto de ligación conteniendo pCEM, posteriormente se mantuvo en hielo por 30 minutos.
- 2.- Después se expone la suspensión a un choque térmico de 42 $^{\circ}$ C por exactamente 1 minuto.
- 3.- Luego se vuelve a colocar el vial con la suspensión en hielo por 1 minuto.
- 4.- Después se agregan 500 μ L de medio LB sin antibiótico y se incuba a 37 $^{\circ}$ C por 1 hora en agitación (500 rpm en el Thermomixer 5436).
- 5.- Luego se extraen 200 μ L de la suspensión celular conteniendo el plásmido y se agregan en 5 ml de agar o caldo LB adicionado con penicilina (50 μ g/ml).
- 6.- Se incuban a 37 $^{\circ}$ C por 24 horas para posteriormente determinar presencia de plásmidos en transformantes mediante miniprep múltiple.

6.1.14 Obtención de plásmidos de colonias múltiples por miniprep

- 1.- En tubos conteniendo 5 ml de caldo LB adicionado con ampicilina se inocularon con *Escherichia coli* DH5 α conteniendo el vector pCEM; posteriormente se incubaron a 37°C por toda la noche.
- 2.- Al siguiente día, se toman 2 ml de la suspensión bacteriana y se vierten en un tubo eppendorf estéril, para luego centrifugar a 13000 rpm durante 1 minuto.
- 3.- Transcurrido dicho tiempo se elimina el sobrenadante y el paquete celular se resuspende con 70 μ l de colorante Dye.
- 4.- Posteriormente se agregan 40 μ l de fenol saturado y se mezcla vigorosamente en el vortex por aproximadamente 1 minuto.
- 5.- Después se centrifuga a 13000 rpm por 3 minutos y se elimina el precipitado, al sobrenadante se le agregan 12 μ l y se coloca en un carril de un gel de agarosa al 0.8%.
- 6.- Se corre la muestra a 100 V hasta $\frac{3}{4}$ partes, para finalmente revelar el gel sumergiéndolo en bromuro de etidio.

6.1.15 Purificación de plásmidos mediante el miniprep con Acetato de Potasio

- 1.- Se inoculan 20 μ L de *Escherichia coli* conteniendo el vector pCEM en un tubo cónico con 15 ml de medio LB adicionado con ampicilina a una concentración de 50 μ g/ml y se incuba por 24 horas bajo agitación a 37 °C.
- 2.- Transcurrido dicho periodo, las células se centrifugaron a 2500 rpm por 20 minutos.
- 3.- Posteriormente se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió con 1ml de solución I, se mezcló en el vortex y se dejó reposar en hielo por 5 minutos.
- 4.- Después se agregaron 2 ml de solución II y se mezcló muy suavemente y se mantuvo en hielo por 5 minutos.

- 5.- Luego se agregaron 1.5 ml de solución III, se mezcló vigorosamente y se dejó reposar en hielo 5 minutos.
- 6.- La mezcla obtenida se distribuyó 1.5 ml en tubos eppendorf y se centrifugó a 13000 rpm por 1 minuto.
- 7.- El sobrenadante obtenido fue transferido a un tubo eppendorf estéril y se agregaron 350 μ l de PG 8000 y se incubó en hielo por 30 minutos.
- 8.- Posteriormente se centrifuga a 13000 rpm por 10 minutos.
- 9.- Se elimina sobrenadante y el precipitado se lava con 1 ml de etanol al 70 %.
- 10.- Se centrifuga a 13000 rpm por 5 minutos.
- 11.- El botón final con el plásmido fue secado a 60 °C por 10 minutos y se resuspendió con 20 μ L de agua para PCR, para posteriormente llevar la inserción de hsp70 en pNFkB-luc sin su promotor y obtener pCEM.

6.1.16 Clonación del promotor de hsp70 en pNFkB-luc

La secuencia del promotor de hsp70 fue introducida en el plásmido pNFkB-LUC, el cual contiene: una señal de poliadenilación del virus de simio 40 (SV40), un gen de resistencia a penicilina, el gen *luc* que expresa la luciferina. El promotor fue insertado dentro de este vehículo de manera completa, que contiene los elementos de respuesta a CEM. El vehículo resultante será entonces llamado pCEM (Figura 4).

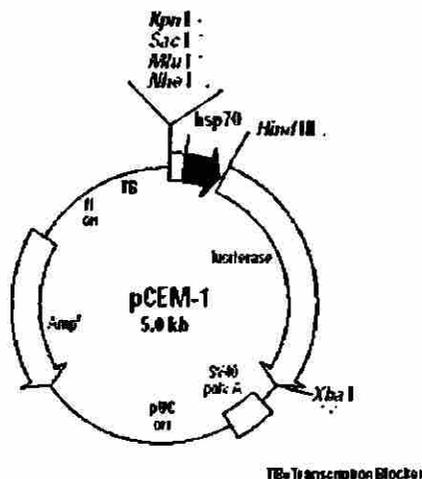


Figura 4 Mapa con sitios de restricción del vector pCEM

6.1.17 Digestión parcial de pCEM mediante las enzimas NheI y HindIII

1. En un tubo eppendorf estéril se agrega 1 μ l del plásmido pCEM.
2. Posteriormente se adicionan 15.8 μ l de agua para PCR, 2 μ l de amortiguador D, 0.2 μ l de BSA y 1 μ l de la enzima 1 μ l de NheI.
3. Finalizado el tiempo anterior se agregó 1 μ l de Hind III y se incubó con las condiciones antes mencionadas por 5 minutos.
4. Después se incubó a 37°C por 1.5 horas bajo agitación continua en el mezclador [®] –incubador (Thermomixer 5436 Eppendorf, Instrumental Brinkmann # de serie 11510).
5. Concluido este lapso de tiempo se procedió al análisis de la digestión mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %.

6.1.18 PCR para detección del promotor de hsp70

Para detectar el promotor de hsp70 ligado al vector se elaboró la mezcla de reacción que se presenta en la tabla 4.

Tabla 4. Mezcla de reacción para detección de hsp70 en pCEM.

Reactivo	Volumen (µl)
H ₂ O PCR	72.6
Amortiguador	10.0
Mgcl ₂	3
dNTPs	1
Oligo 1	2
Oligo 2	2
ADN de vector	4
TOTAL	100

Después de haber hecho la mezcla los tubos de reacción fueron puestos en el

termociclador con el programa que se presenta en la tabla 5.

Tabla 5. Ciclos de temperatura utilizados para obtener el producto de amplificación.

Temperatura (°C)	Tiempo (Min)	Numero de ciclos
94	1	1
94	1	10
52	1	
72	2	1
72	5	

Terminados los ciclos de incubación, se determinó la presencia de producto de PCR mediante la aplicación de muestra en gel de agarosa al 1.0 %, para posteriormente llevar la purificación de pCEM a gran escala usando acetato de amonio para su transfección en líneas celulares.

6.2 Evaluación de la respuesta a CEM *in vitro* mediante la transfección del vector pCEM en líneas celulares tumorales HeLa, Iner-37, RMA-E7 Y BMK16

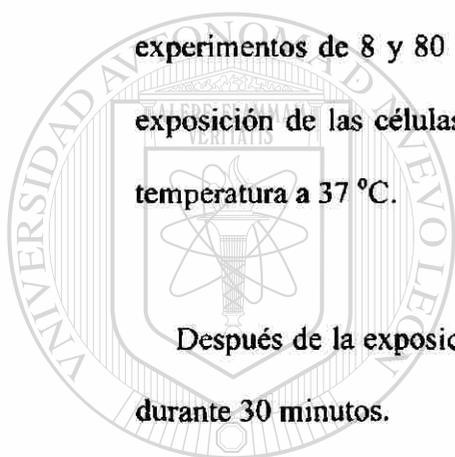
Antes de la transfección, se agregaron 6×10^4 células por ml en placas para transfección de 6 pozos de 35 mm, y se incubaron las células a 37 °C en una atmósfera de CO₂ hasta obtener una confluencia celular de un 70-80%. Después se agregaron 0.4 µg de ADN en 100 µl de medio D-MEM libre de suero con 0.1 mM NEAA. La mezcla obtenida se incubó

a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente se diluyeron 10 µl de Lipofectin en 100 µl un medio libre de suero en un segundo tubo. La mezcla obtenida se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Después mientras se formaron los complejos, se sustituyó el medio de las células con 200 µl de medio libre de suero. Realizado esto se obtuvo el complejo ADN-mezcla de lípidos contenido en medio fresco y se incubó a 37 °C al 5% de CO₂ por 3 horas. Transcurrido este tiempo fueron agregados 1 ml de medio con 10% de FBS (Suero fetal bovino). Posteriormente a las 24 horas después de la transfección se cosecharon las células.

6.2.1 Sistema de exposición a CEM

Las células HeLa transfectadas después de 48 hrs se sometieron a la acción de CEM , se colocaron en el interior de un solenoide de 250 vueltas de alambre laqueado (Figura 5). El cual está conectado a tres transformadores reductores (12 Volts de salida y 3 Amps) los cuales a su vez estaban conectados a un transformador variable VARIAC (V de salida 0-120 V). La intensidad producida por el solenoide varió durante los experimentos de 8 y 80 μ T durante un periodo de 20 minutos. El solenoide durante la exposición de las células se localizó en el interior de una incubadora que mantenía la temperatura a 37 °C.

Después de la exposición las células se mantuvieron en reposo a 37 °C al 5% de CO₂ durante 30 minutos.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Figura 5. Sistema de exposición a CEM para producir intensidades de 8 y 80 μT

6.2.2 Exposición de líneas celulares a choque térmico

Las líneas celulares después de 48 h de haber sido transfectadas se incubaron a 43°C por 20 min. Posteriormente se dejaron reposar las células por 30 minutos a 37°C con 5% de CO₂.

6.2.3 Exposición del efecto combinado de choque térmico y CEM

En otro experimento, la línea celular HeLa después de transfectada se expuso a la acción combinada de CEM y choque térmico, comparado con un grupo control solamente transfectado con pCEM, y un grupo sin transfectar. En un grupo se llevó a cabo la exposición por 20 minutos a CEM de 60 Hz para posteriormente exponer a choque térmico; por otra parte, en un segundo grupo, se expuso inicialmente a choque térmico y posteriormente a CEM de 60 Hz de frecuencia.

6.2.4 Detección de la expresión de la luciferasa por luminometría

Las células después de haber sido expuestas, se lavaron con 2ml de amortiguador PBS. Posteriormente se agregaron 200 μ l de amortiguador de lisis y se mantuvieron en reposo durante 15 minutos, para luego centrifugar a 12000 rpm durante 10 segundos.

Para determinar la actividad enzimática de la luciferasa, se utilizó un luminómetro Turner modelo 20e (Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA) después de haber agregado 100 μ l de D-luciferina 0.4 mM según la técnica propuesta por Day y Day (1994).

6.2.5 Detección de la expresión de luciferasa en líneas celulares mediante Western-Blot

Para determinar si los homogenizados celulares presentaban anticuerpos contra luciferasa, se llevó a cabo una inmunodetección por Western Blot. Esta técnica permite transferir las proteínas separadas en un gel de poliacrilamida a un filtro de nitrocelulosa, donde son reconocidas mediante reacciones específicas con antígenos mediante quimioluminiscencia.

Con las muestras utilizadas en los ensayos de determinación de luciferasa mediante luminometría, se preparó un gel de poliacrilamida al 12%, de la siguiente manera:

Preparación de las muestras de líneas celulares

- Centrifugar las muestras a 12000 revoluciones por 5 min.
- descartar el sobrenadante
- añadir 100 μ l de amortiguador de lisis SDS gel 2X
- mezclar en el vortex
- calentar en agua a punto de ebullición por 10 min.
- pasar a hielo (congelar si las muestras no se van a utilizar inmediatamente a -20°C).

Preparación del Gel

Poliacrilamida 12 % (5 ml)

H2O destilada	1.7	ml.
Acrilamida Mix 30 %	2.0	ml.
Tris 1.5M (pH 8.8)	1.3	ml.
SDS 10%	50.0	µl.
APS 10%	50.0	µl.
TEMED	4.0	µl.

Después correr el gel en una fuente de poder a 100 volts, por aproximadamente 2 ½ horas, o hasta que las muestras lleguen al final del gel.

Una vez corrido, se realizó la transferencia a una membrana de nylon, esto se llevó acabo en una cámara de transferencia, con un amortiguador adecuado. La transferencia se realizó por 2 horas, a 300 miliampers constantes.

Después de concluido el tiempo, se cerciorará si hubo transferencia colocando la membrana en un recipiente y se le agregaran algunas gotas de rojo Ponceau y agua destilada, por unos segundos, observando la membrana para ver la aparición de las bandas de las proteínas, después decolorar la membrana con agua destilada, hasta que quede nuevamente blanca; Una vez logrado esto, se realizarán los siguientes pasos:

- 1.- hacer dos lavados a la membrana con Tween 20/ PBS al 0.05 % por 5 min. cada uno.
- 2.- bloquear la membrana con Tween 20/PBS al 2 % mas leche de vaca en polvo al 1 %, por 60 min.
- 3.- lavar la membrana con PBS IX, hasta eliminar el Tween.

4.- adicionar el primer anticuerpo, preparándolo a la dilución deseada, los sueros utilizados a una dilución de 1:1000. Estas diluciones son preparadas con PBS 1X.

El primer anticuerpo contra luciferasa se deja 3 horas con agitación suave.

5.- Después se eliminó el anticuerpo.

6.- Luego se realizaron dos lavados con Tween/PBS al 0.05 % por 5 min. agitando suavemente.

7.- Eliminar el Tween, con PBS.

8.- Después se añadió el segundo anticuerpo, preparando una dilución 1:3000, de IgG anticabra conjugada con peroxidasa, y se dejó en agitación por 4 horas.

9.- Luego se lavó con TBS-Tween, tres veces.

10.- Después se agregó la mezcla de sustratos Ay B.

Posteriormente se realizó la exposición de la película a la membrana bajo oscuridad por 1 minuto aproximadamente. Después se realizó el revelado de la siguiente

manera:

1. Se expuso a solución reveladora por 1 minuto.

2. Se enjuagó con agua 5 segundos.

3. Se sumergió la película en solución fijadora.

4. Se enjuagó para finalmente observar la presencia de bandas.

6.3 Activación del promotor por CEM *in vivo*

Para esta etapa inicialmente se obtuvo a gran escala por Maxiprep con acetato de amonio el vector pCEM. Para posteriormente inyectarlo en ratones *Mus musculus* línea

Balb/c, machos de 7 semanas proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. y evaluar el efecto de CEM *in vivo*.

6.3.1 Maxiprep con acetato de amonio para obtener pCEM

1. Se toman 2 ml de la suspensión bacteriana de *Escherichia coli* conteniendo el vector pCEM y se vierten en un matraz conteniendo 250 ml de caldo LB adicionado con 250 μL de ampicilina a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$, y se incubó a 37°C por 24 horas.
2. Transcurrido el tiempo las células se centrifugaron a 3100 rpm por 20 minutos.
3. Se resuspendió el paquete celular con 6 ml de la solución I fresca y se incubó en hielo por 20 minutos.
4. Posteriormente se agregaron 12 ml de la solución II y se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 10 minutos.
5. Luego se agregaron 9 ml de acetato de amonio 7.5 M a pH 7.6, se mezcló vigorosamente utilizando el vortex por 5-10 segundos y se incubó en hielo por 10 minutos.
6. Transcurrido este lapso se centrifugó a 8000 rpm por 15 minutos.
7. Después el sobrenadante se vertió a un tubo fresco estéril y se le agregan 0.6 volúmenes de isopropanol (16 ml) y se incubó temperatura ambiente para luego centrifugar a 8000 rpm por 15 minutos. Después de la centrifugación la pastilla fue resuspendida en 4ml de acetato de amonio 2.0 M a pH 7.4 se mezcló generosamente y se incubó en hielo 10 minutos.
8. Se volvió a centrifugar a 8000 rpm por 15 minutos y el sobrenadante resultante es puesto en un tubo fresco y se agregaron 4 ml de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos.
9. Se volvió a centrifugar a 8000 rpm por 15 minutos y el precipitado resultante fue resuspendido en 1 ml de agua bidestilada estéril y se agregaron 10 μl de RNAsa a una concentración de 5 mg/ml y se incubó a 37°C por 20 minutos.
10. Después se agregaron 1 ml de acetato de amonio 7.5 M a pH 7.6 y se mezcló por inversión. Se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos para después centrifugar a 8000 rpm por 15 minutos.

11. El sobrenadante se pasó a un nuevo tubo y se le agregaron 3 ml de isopropanol, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos.
12. Se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos y el precipitado resultante fue lavado con 1 ml de etanol al 70%, se centrifugó a 8000 rpm por 15 minutos.
13. Se eliminó el sobrenadante se secó 10 minutos a 60°C y se resuspendió con 50 μ L de agua para PCR.

6.3.2 Inyección de pCEM en *Mus musculus*

Los ratones utilizados en este trabajo, fueron inyectados en el músculo de la pierna de la tibia anterior con 50 μ g de vector diluido en NaCl al 0.85%, después de 30 segundos de haber inyectado se sometió el ratón a descarga de pulsos eléctricos.

(Tabla 6)

Tabla 6. Condiciones utilizadas para la generación de pulsos eléctricos.

Fuerza de Voltaje	250 V/cm
# de pulsos	6
Duración de cada pulso	20 mseg
Tipo de onda	Cuadrada

Los ratones después de haber sido inyectados se expusieron a CEM de 80 μ T de 60 Hz por 120 minutos diariamente durante 3 días para posteriormente al quinto día llevar a cabo el sacrificio de los animales. También se determinó el tiempo en el que se daba mayor nivel de expresión de luciferasa al exponer al día 1, 3, 5 y 7 a CEM de 80 μ T.

6.3.3 Sistema de exposición *in vivo*

Con este modelo se llevó a cabo la exposición de ratones *in vivo* para la determinación del efecto de los CEM sobre la expresión de luciferasa. Los ratones utilizados en los experimentos fueron colocados en el interior de un solenoide, el cual constaba de 552 vueltas de alambre de cobre laqueado, de calibre 14, enrollado en una matriz de plástico de 27 cm de diámetro y 71 cm de alto. Este fue alimentado por una corriente eléctrica que provenía de una fuente de corriente alterna de 60 Hz que a su vez se conectó a un transformador variable CONTROVAC-AC modelo A8CP. Con una entrada de 120 volts y 12 amperes. Se incluyó además un transformador reductor que permitió manejar el amperaje requerido para producir la intensidad magnética de $80\mu\text{T}$. Para el grupo no expuesto, los componentes de este sistema fueron similares a los del grupo expuesto solo que estos no se les aplicaban corriente.

Con objeto de establecer la geometría de la exposición, se construyeron separadores plásticos de PVC y acrílico que permitieron exponer tres ratones simultáneamente en posiciones predeterminadas donde el pico máximo de medición indicó el valor de densidad de flujo magnético deseada. Asimismo se colocaron alimentadores acrílicos y botellas con agua para el suministro durante el tiempo que duró el experimento (Figura 6).

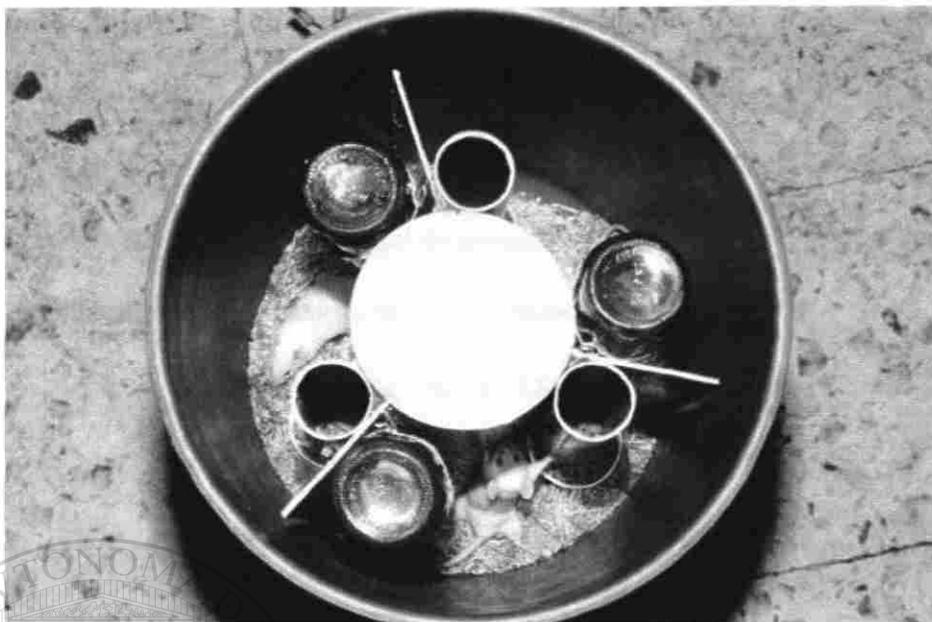


Figura 6. Fotografía que ilustra una vista superior del solenoide utilizado para exposición *in vivo* a CEM de 60 Hz. Se aprecian los tres compartimentos equidistantes donde se colocan los animales para ser sometidos al tratamiento magnético.

6.3.4 Homogenizado de tejido y medición de unidades relativas de luciferasa

Concluido el tiempo de la exposición al CEM, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Posteriormente se extrajo mediante la utilización de un equipo de disección el músculo y se introdujo en 1 tubo de 80X100 estéril, después en baño de hielo se agregó 1 ml de amortiguador de lisis 1X y se homogenizó completamente utilizando homogenizador (Biospec Products, Tearor Tissue, Model 985-370). Después se centrifugo a 14×10^3 rpm durante dos minutos; para luego pasar el sobrenadante a otro tubo y se mantuvo en baño de hielo. Posteriormente se tomaron 50 μ l de sobrenadante y se mezclaron con 100 μ l de D-luciferina para después de 15 segundos leer un luminómetro Turner modelo 20e (Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA).

6.3.6 Detección de la expresión de luciferasa en *Mus musculus in vivo* mediante Western Blot

Con las muestras utilizadas en el ensayo de determinación de luciferasa mediante luminometría, se preparó un gel de poliacrilamida al 12%, de la siguiente manera:

Preparación de las muestras de homogenizados.

- Centrifugar las muestras a 12×10^3 revoluciones por 5 min.
- Descartar el sobrenadante
- Añadir 100 μ l de amortiguador de lisis SDS gel 2X
- Mezclar en el vortex
- Calentar en agua a punto de ebullición por 10 min.
- Pasar a hielo (congelar si las muestras no se van a utilizar inmediatamente).

Preparación del Gel

Poliacrilamida 12 % (5 ml)

H2O destilada	1.7	ml.
Acrilamida Mix 30 %	2.0	ml.
Tris 1.5M (pH 8.8)	1.3	ml.
SDS 10%	50.0	μ l.
APS 10%	50.0	μ l.
TEMED	4.0	μ l.

Después correr el gel en una fuente de poder a 100 volts, por aproximadamente 2 ½ horas, o hasta que las muestras lleguen al final del gel.

Una vez corrido, se llevó una transferencia a una membrana de nylon, esto se llevará a cabo en una cámara de transferencia, con un amortiguador adecuado. La transferencia se llevó por 2 horas, a 300 miliampers constantes.

Después de concluído este tiempo, se determinó si hubo transferencia colocando la membrana en un recipiente y se le agregaron algunas gotas de rojo Ponceau y agua destilada, por unos segundos, observando la membrana para ver la aparición de las bandas de las proteínas, después se decoloró la membrana con agua destilada, hasta que quedó nuevamente blanca; posteriormente se realizaron los siguientes pasos:

1.- Hacer dos lavados a la membrana con Tween 20/ PBS al 0.05 % por 5 min. cada uno.

2.- Bloquear la membrana con Tween 20/PBS al 2 % mas leche al 1 %, por 60 min.

3.- Lavar la membrana con PBS IX, hasta eliminar el Tween.

4.- Adicionar el primer anticuerpo, preparándolo a la dilución deseada, los sueros utilizados a una dilución de 1:1000. Estas diluciones fueron preparadas con PBS

IX, el primer anticuerpo contra luciferasa se dejó 3 horas con agitación suave.

5.- Después se eliminó el anticuerpo.

6.- Luego se realizaron dos lavados con Tween/PBS al 0.05 % por 5 min. agitando suavemente.

7.- Eliminar el Tween, con PBS.

8.- Después se añadió el segundo anticuerpo, preparando una dilución 1:3000, de IgG anticabra conjugada con peroxidasa, y se dejó en agitación por 4 horas.

9.- Luego se lavó con TBS-Tween, tres veces.

10.- Después se agregó la mezcla de sustratos A y B, para llevar la reacción con la peroxidasa por 5 minutos a temperatura ambiente (Pierce, SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, # Cat 34077).

Posteriormente se realizó la exposición de la película de rayos-X a la membrana bajo oscuridad por 1 minuto aproximadamente. Después se realizó el revelado de la siguiente manera:

1. Se expuso a solución reveladora por 1 minuto.
2. Se enjuagó con agua 5 segundos.
3. Se sumergió la película en solución fijadora.
4. Se enjuagó para finalmente observar la presencia de bandas.

6.4 Diseño experimental

Para evaluar el efecto de los CEM sobre las líneas celulares Hela, BMK16, RMA-E7 e Iner 37, estas líneas celulares fueron analizadas mediante el siguiente agrupamiento[®] utilizando el diseño de Análisis de Varianza Completamente Aleatorizado:

Grupo 1= Control negativo sin transfectar.

Grupo 2= Control positivo transfectado con pCEM

Grupo 3= Expuesto a choque térmico a 43°C durante 20 minutos.

Grupo 4= Expuesto a CEM durante 20 minutos.

Cada grupo constó de 3 repeticiones.

También se determinó el efecto combinado de los CEM con el choque térmico sobre células BMK16 y Hela utilizando el diseño de Análisis de Varianza Completamente Aleatorizado.

Grupo 1= Control negativo sin transfectar.

Grupo 2= Control positivo transfectado con pCEM

Grupo 3= Expuesto a choque térmico a 43°C durante 20 minutos para posteriormente exponer a CEM.

Grupo 4= Expuesto a CEM durante 20 minutos, para posteriormente exponer a choque térmico durante 20 minutos.

Cada grupo constó de 3 repeticiones.

Por otra parte el efecto de los CEM sobre la expresión de luciferasa in vivo, se utilizaron ratones línea Balb/c distribuidos en los siguientes grupos utilizando el diseño de Análisis de Varianza Completamente Aleatorizado.

Grupo 1= Ratones inyectados con el vector pNFkB-luc utilizado como control positivo.

Grupo 2= Ratones inyectados con el vector pCEM sin exponer a CEM.

Grupo 3= Ratones inyectados con el vector pCEM expuestos a CEM de 80 μ T.

Se utilizaron 3 ratones por cada grupo.

6.5 Procesamiento Estadístico

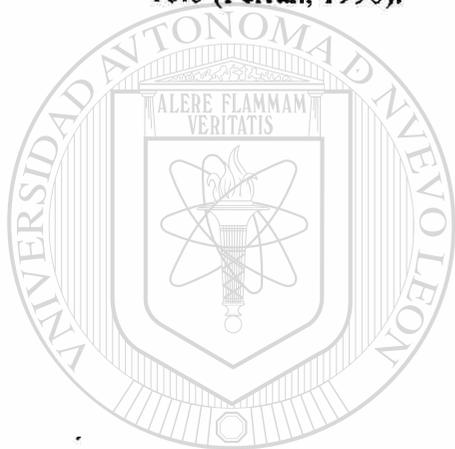
Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en la evaluación del efecto de los CEM sobre la determinación de la actividad de la luciferasa en líneas celulares Hela, BMK16, RMA-E7 e Iner37 transfectadas con el vector pCEM, se determinó la distribución, si esta era normal, se determinó si había diferencia entre los grupos mediante la prueba de ANOVA completamente aleatorizado de un factor y si existía diferencia estadísticamente significativa se realizó comparación de medias por la prueba de Tukey. En caso de que los datos no presentaran una distribución normal se determinó si había diferencia estadística mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y para encontrar la diferencia entre grupos se someterá a la prueba de Tukey no paramétrico.

Por otra parte, para la evaluación del efecto combinado de los CEM y el choque térmico en las líneas celulares Hela, BMK16, RMA-E7 transfectadas con el vector pCEM, se determinó si la distribución era normal, en el caso de que fueran normales se investigó si había diferencia entre los grupos mediante la prueba de ANOVA completamente al azar y si existía diferencia estadísticamente significativa se realizó comparación de medias por la prueba de Tukey. En caso de que los datos no presentaran una distribución normal se determinó si había diferencia estadística mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, si se presentaba diferencia entre grupos se sometía a la prueba de Tukey no paramétrico.

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en la evaluación del efecto de los CEM sobre la determinación de la actividad de la luciferasa en ratones inyectados con el vector pCEM, se determinó si la distribución es normal, en el caso de que fueran

normales se investigó si había diferencia entre los grupos mediante la prueba de ANOVA completamente al azar y si existía diferencia estadísticamente significativa se realizó comparación de medias por la prueba de Tukey. En caso de que los datos no presentaran una distribución normal se determinó si había diferencia estadística mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, si se presentaba diferencia entre grupos se sometía a la prueba de Tukey no paramétrico.

Todos los análisis se realizaron mediante la utilización del programa SPSS de la versión 10.0 (Ferran, 1996).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

7. RESULTADOS

7.1 Construcción de pCEM

Las células de *Escherichia coli* fueron transformadas con el vector pNFKB-luc y se detectó la presencia de colonias resultantes mediante miniprep múltiple como se puede ver en la figura 7, posteriormente estas clonas fueron cultivadas nuevamente en caldo LB, y se purificaron mediante miniprep y se encontraron algunas clonas que contenían el vector con un tamaño de 5.0 Kb que era el esperado. Después de esto, se procedió a caracterizar el vector mediante la digestión enzimática con HindIII y NheI obteniendo la liberación de fragmentos de 200 pb que corresponde a el promotor original y un segundo fragmento de 4800 pb que correspondió al vector pNFKB-luc sin su promotor. El vector libre del promotor fue purificado por gen clean para más adelante ligarlo con el promotor de hsp70 de humano.

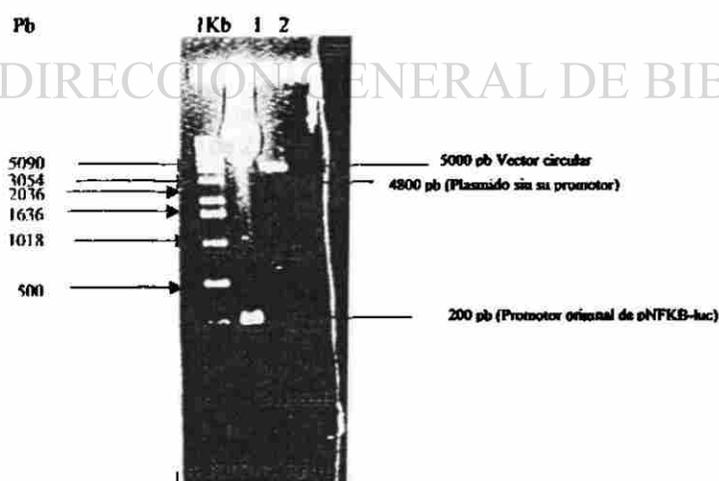


Figura 7. Gel de agarosa al 1.5 % que contiene pNFKB-luc digerido para obtenerlo libre de su promotor original de 200 pb, mediante las enzimas de restricción NheI y HindIII.

Por otra parte, el ADN geonómico obtenido a partir de sangre venosa periférica de humano, fue posteriormente utilizado para aislar el promotor completo de hsp70. Para esto se sometió el ADN geonómico a PCR como se muestra en la figura 8, el amplicón de 273 pb obtenido, fue ligado posteriormente en el vector pGEMT-easy.

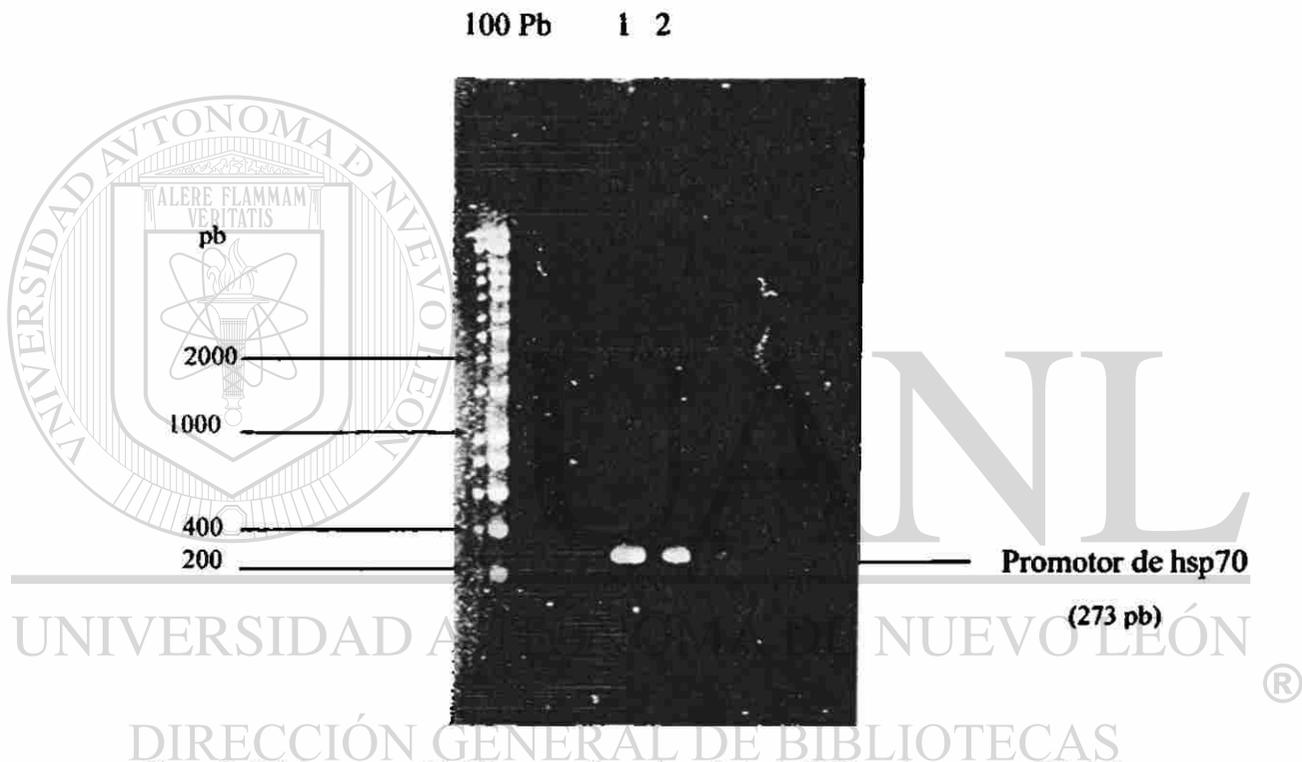
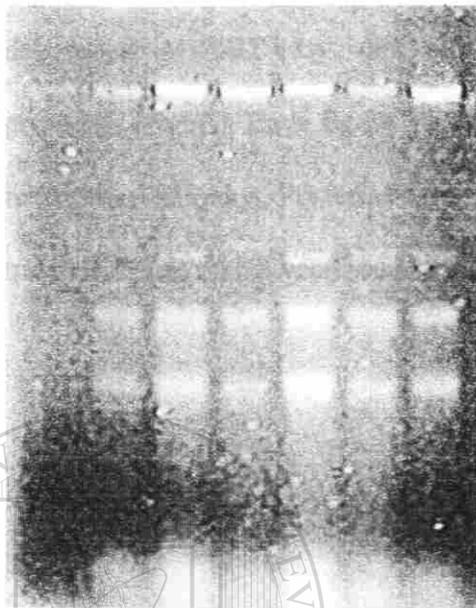


Figura 8. Gel de agarosa al 1.5 % que contiene el producto de PCR en el que se amplificó el promotor completo de hsp70 de 273 pb a partir de ADN geonómico humano obtenido de sangre venosa periférica.

Por otro lado, en la figura 9 se muestra el gel de agarosa que contiene muestras de miniprep con las clonas de pGEMT-easy ligadas con el promotor de hsp70 las cuales tenían un tamaño de aproximadamente 3.3 Kb; además se caracterizó inicialmente mediante digestión con las enzimas NheI y HindIII logrando liberar el promotor del vector como se muestra en la figura 10.

1 2 3 4 5 6 7



← pGEMT-hsp70 (3291 pb)
 ← pGEMT (3018 pb)

Figura 9. Gel de agarosa al 0.8% que contiene miniprep de colonias múltiples en las que se detectan las clonas 2 y 4 transformadas que contienen pGEM-T unido al promotor hsp70 humano respecto a pGEM-T sin ligado.

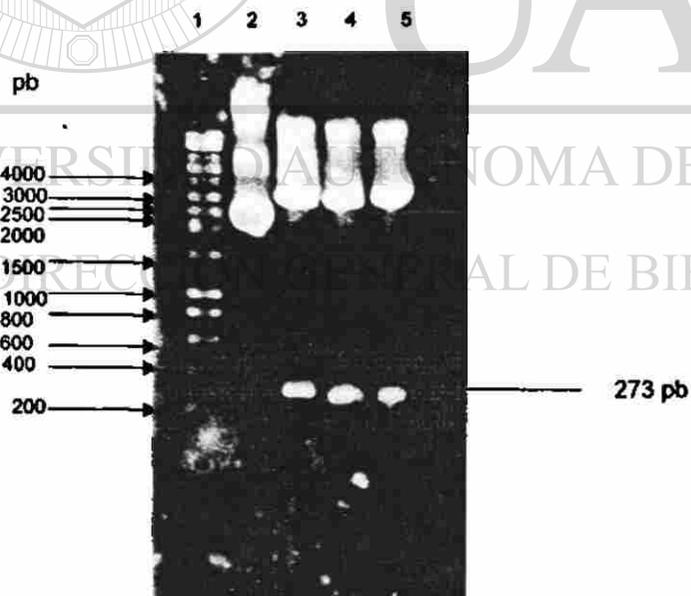


Figura 10. Gel de agarosa al 1.5 % utilizado para la caracterización de el pGEM-T unido al promotor de hsp70 de 273 nucleótidos, utilizando las enzimas EcoRI (Carril 3) y las enzimas NheI y HindIII (Carril 4 y 5). En el carril 1 se localiza el marcador de pares de bases (1 Kb) y en carril 2 esta pGEM-T sin digerir.

El siguiente paso consistió en la ligación del promotor de hsp70 que se extrajo del vector pGEMT-easy, con el vector pNFKB-luc previamente despojado de su promotor original. En la figura 11 se muestran clonas detectadas mediante miniprep para múltiples plásmidos. Posteriormente se llevó a cabo la detección del promotor de hsp70 mediante PCR en los vectores pNFKB-luc y pCEM (Figura 12).

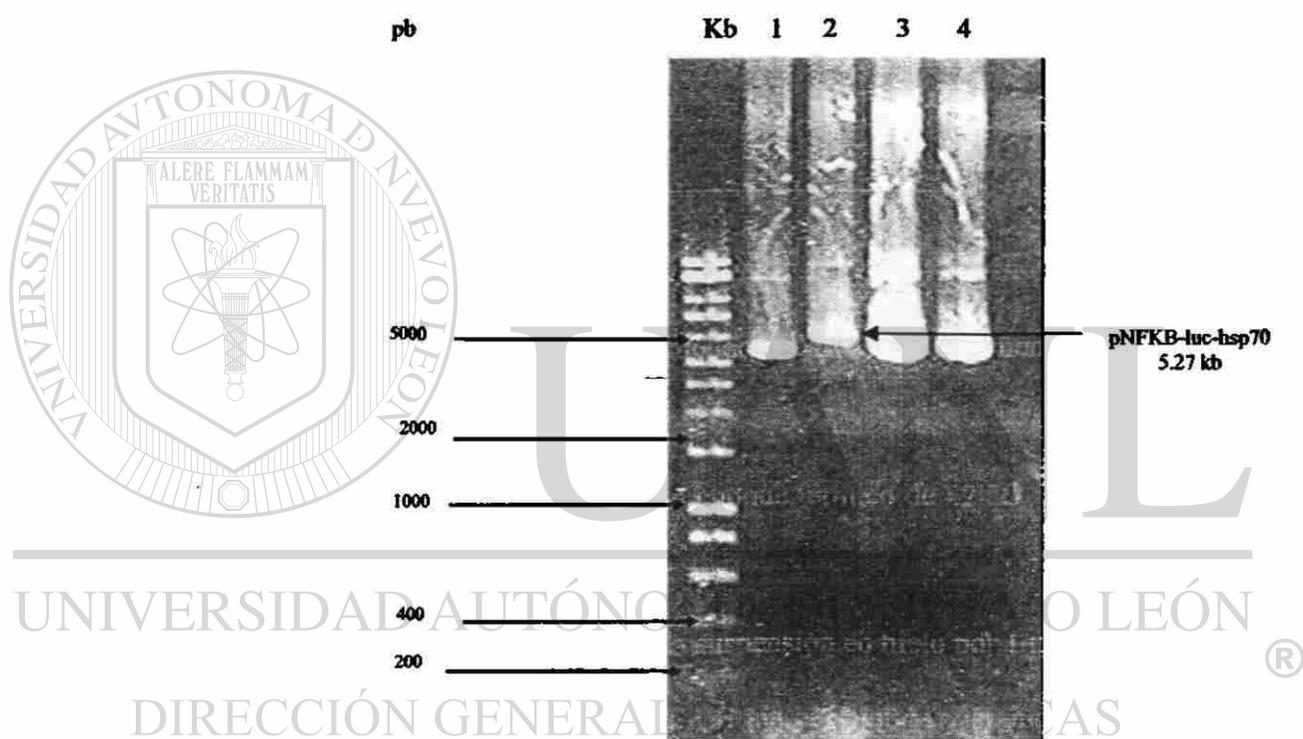


Figura 11. Gel de agarosa al 0.8 % con muestras de miniprep para obtención de colonias múltiples para detectar la clona transformante de pNFKB-luc que contenía la región promotora de hsp70 de 273 pb, se detectó a la clona 2 como pNFKB-luc ligado a hsp70.

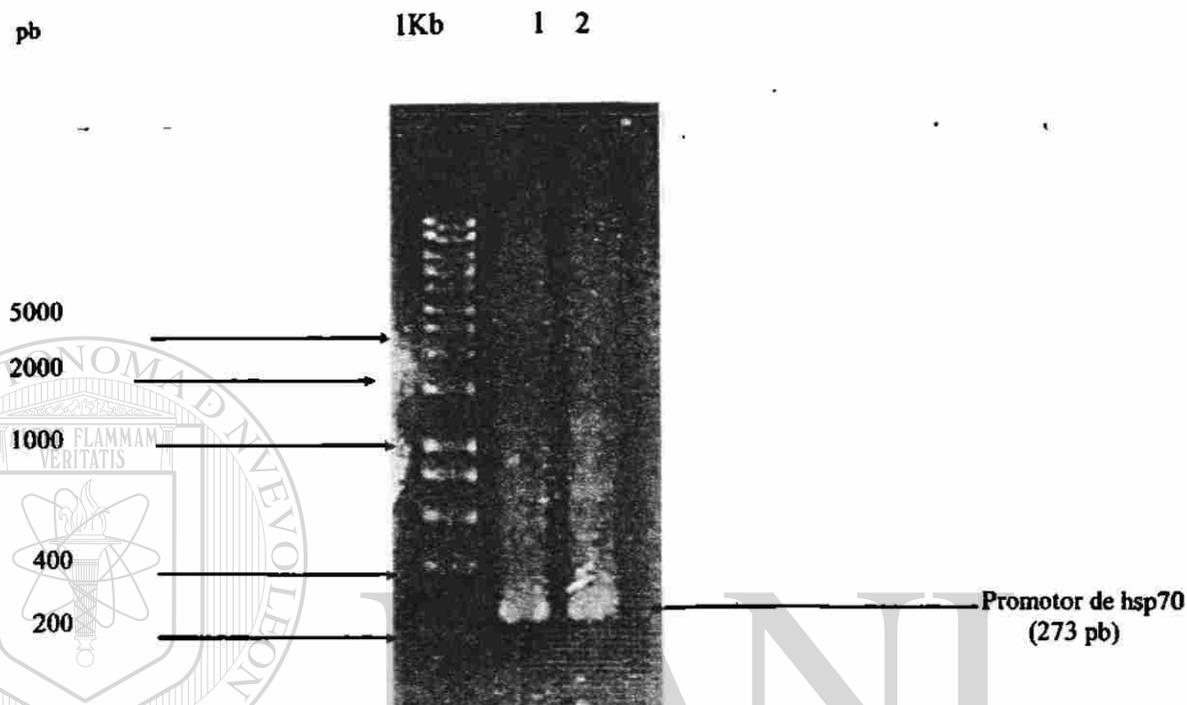


Figura 12. Gel de agarosa al 2 % que contiene el producto de amplificación de PCR del promotor de hsp70 de 273 nucleótidos para detectar la presencia del mismo en las 1)pGEMT-hsp70 y 2)pNFkB-luc-hsp70. Para la detección del inserto se utilizó una mezcla de reacción para PCR.

7.2 Determinación de la expresión de luciferasa en líneas celulares

Se evaluó la expresión en las líneas celulares HeLa, BMK16, Iner37 y RMA-E7.

Para la línea celular HeLa se llevó a cabo inicialmente la evaluación del efecto del choque térmico sobre la activación del promotor de hsp70 en pCEM, comparado con un grupo transfectado con pCEM sin exponer a choque térmico y con un grupo que no fue ni transfectado ni expuesto. Esto se hizo en dos experimentos independientes que muestran el valor promedio en la figura 13; se encontró que la expresión de luciferasa presentaron sus niveles mas altos de unidades relativas de luciferasa por mg de proteína (URL/ mg de proteína) en células transfectadas expuestas a choque térmico

(17631±6273), mientras que los valores fueron menores en células transfectadas únicamente (11899±269), mientras que el valor más bajo resultó en la línea celular que no fue ni transfectada ni expuesta a choque térmico(34±16). Las diferencias entre los grupos fueron estadísticamente significativas al analizarse por ANOVA y la comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$). Con esto se pudo comprobar que el promotor que contenía el vector respondía a choque térmico como control positivo.

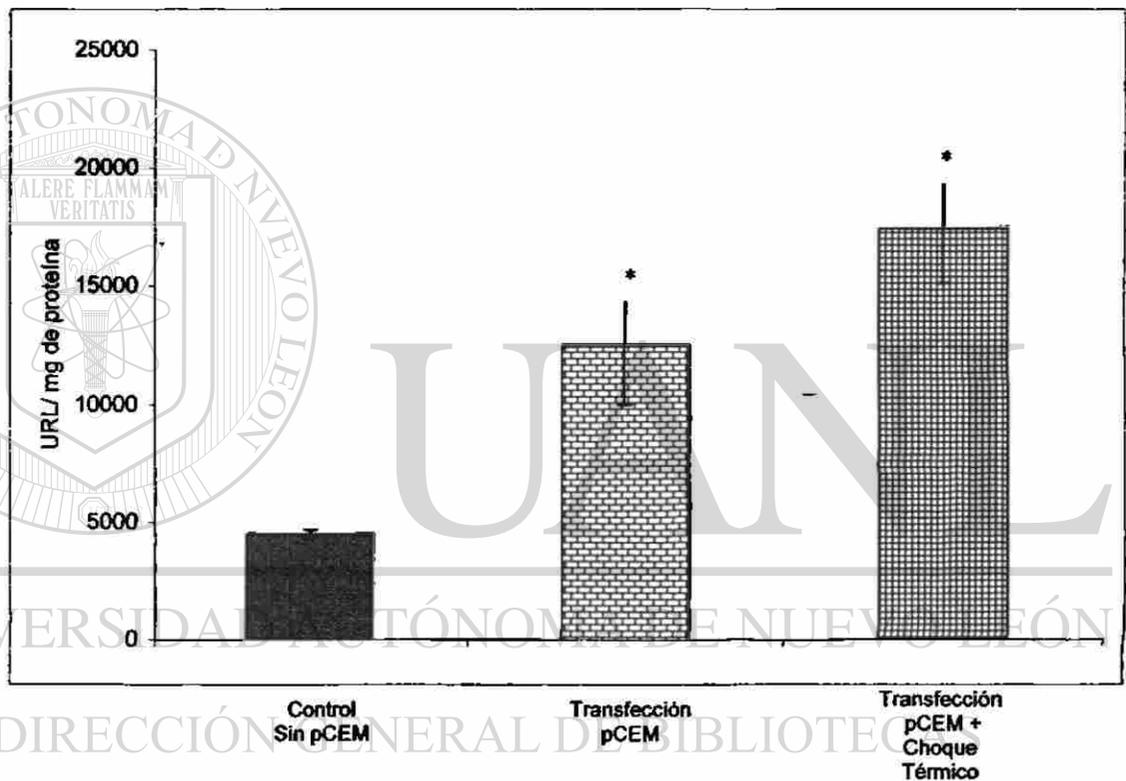


Figura 13 Transfección con lipofectamina de células HeLa con el plásmido pCEM. Para evaluar el efecto del choque térmico en la activación del promotor del gen de la Hsp70. Las células fueron expuestas a la acción de CT durante 20 minutos. Los datos representan la media ± la desviación estándar de tres repeticiones por tratamiento. *, $p < 0.05$ al compararse con el control sin transfectar.

El siguiente paso consistió en determinar el efecto de los CEM de 8, 24, 48 y 80 μT sobre la expresión de luciferasa en las células HeLa. Para esto se utilizaron para cada dosis cuatro grupos: a) No transfectado con pCEM ni expuesto a ningún factor físico, b) Transfectado con pCEM y no expuesto a ningún factor físico, c) Transfectado con pCEM y expuesto a choque térmico y d) Transfectado con pCEM y expuesto a CEM. Los resultados al exponer las células a 8 μT arrojaron el valor de URL/mg de proteína más alto en el grupo expuesto a CEM (12325 ± 4724) comparado con el grupo expuesto únicamente a choque térmico (10334 ± 2592) y los controles sin pCEM y con pCEM (3922 ± 2247 y 8151 ± 2055 respectivamente). Los datos se analizaron mediante ANOVA y se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), entre todos los tratamientos probados al analizarse con la prueba de Tukey (Figura 14).

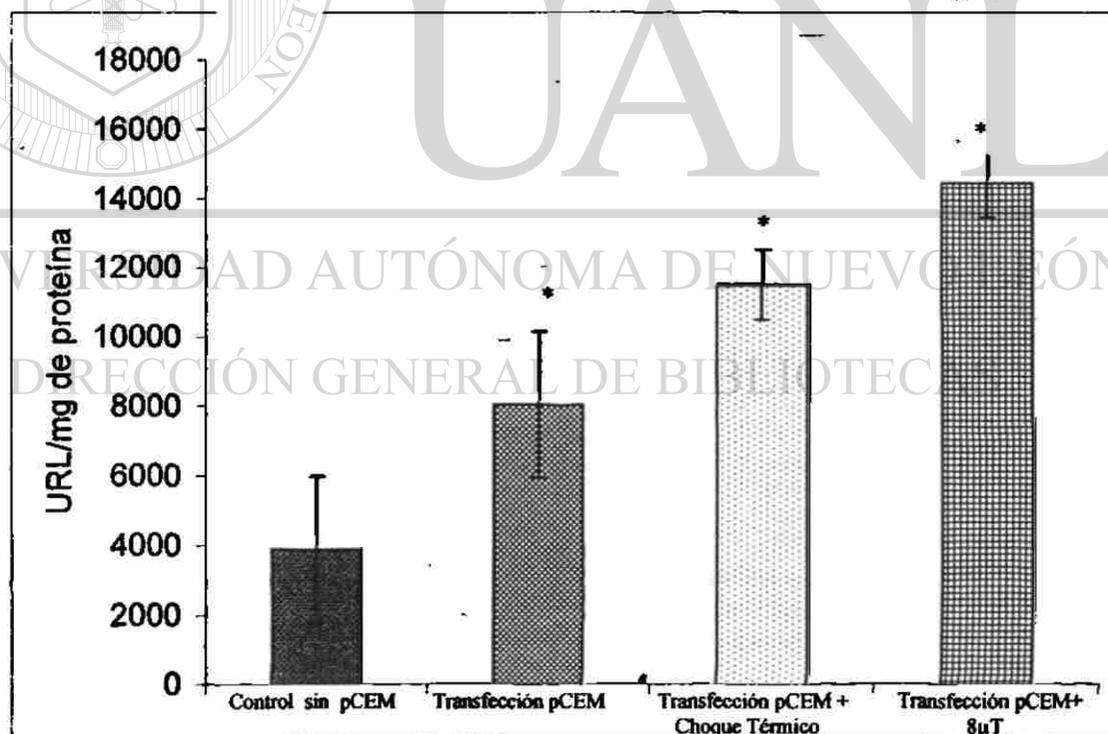


Figura 14 Transfección con lipofectamina de células HeLa con el plásmido pCEM para evaluar el efecto de 8 μT de intensidad de CEM en la activación del promotor de Hsp70. Las células fueron expuestas a la acción de CEM o CT durante 20 minutos. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de tres repeticiones por tratamiento. *, $p < 0.05$ al compararse con el control sin transfectar.

Por otra parte, se determinó el efecto de los CEM de 24 μ T, con respecto a un grupo de células HeLa sin pCEM, con pCEM sin exponer a ningún factor físico y con pCEM expuesto a choque térmico. Se encontró que el grupo expuesto a CEM presentó mayor nivel de expresión génica (3318 ± 39) con respecto al grupo expuesto a choque térmico (1903 ± 39) y los controles respectivamente; se encontró que el efecto por CEM fue estadísticamente significativo ($P < 0.05$), con respecto al los otros grupos al probarse con la prueba de Tukey (Figura 15).

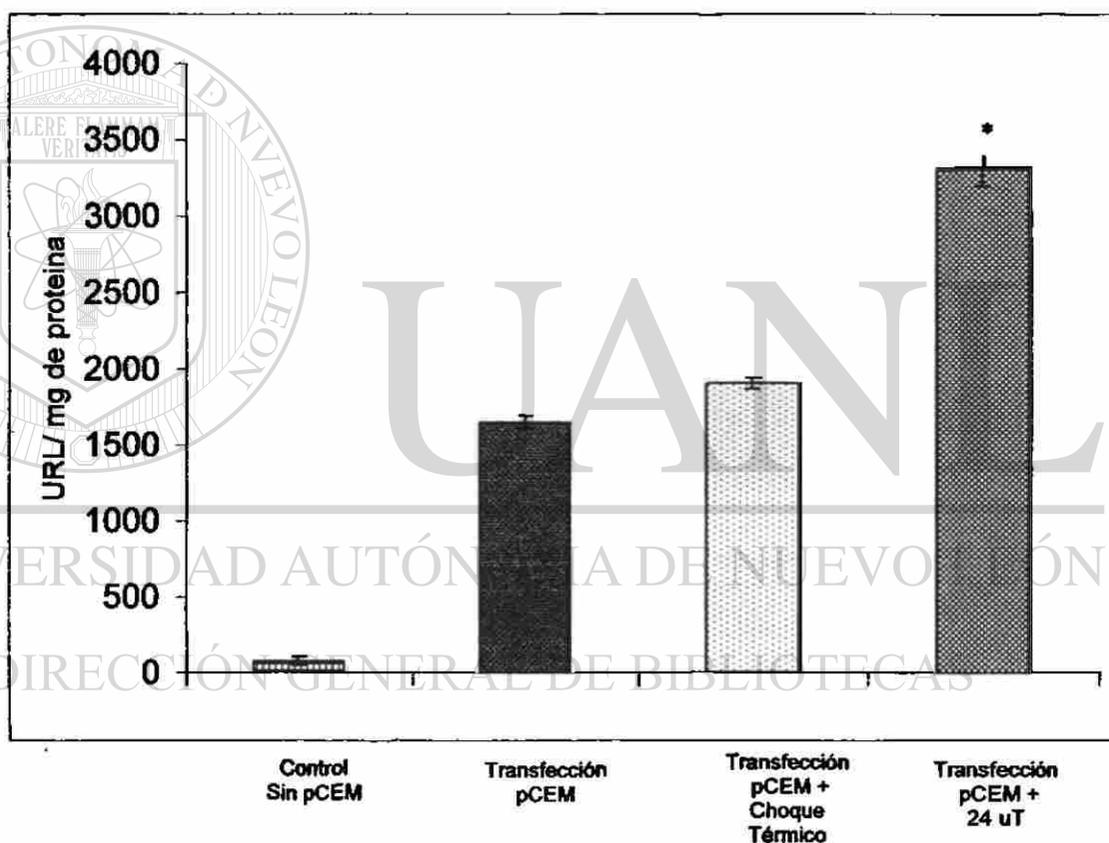


Figura 15. Efecto de 24 μ T de CEM sobre la activación del promotor del gen de la Hsp70 en células HeLa transfectadas con el plásmido pCEM. Las células fueron expuestas a la acción de CEM o CT durante 20 minutos. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de tres repeticiones por tratamiento. *, $p < 0.05$ al compararse con el control sin transfectar.

En cuanto a la evaluación de los efectos de el CEM a 48 μ T con respecto al grupo expuesto a choque térmico y los controles correspondientes (Figura 16), se

encontró también que el tratamiento magnético (16803 ± 2049) presentó el mayor nivel de expresión comparado con el grupo expuesto a choque térmico (12087 ± 152); la prueba paramétrica de Tukey indicó que los grupos control con presencia y ausencia de vector presentaron valores inferiores al expuesto a choque térmico (12087 ± 152) la diferencia fue estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

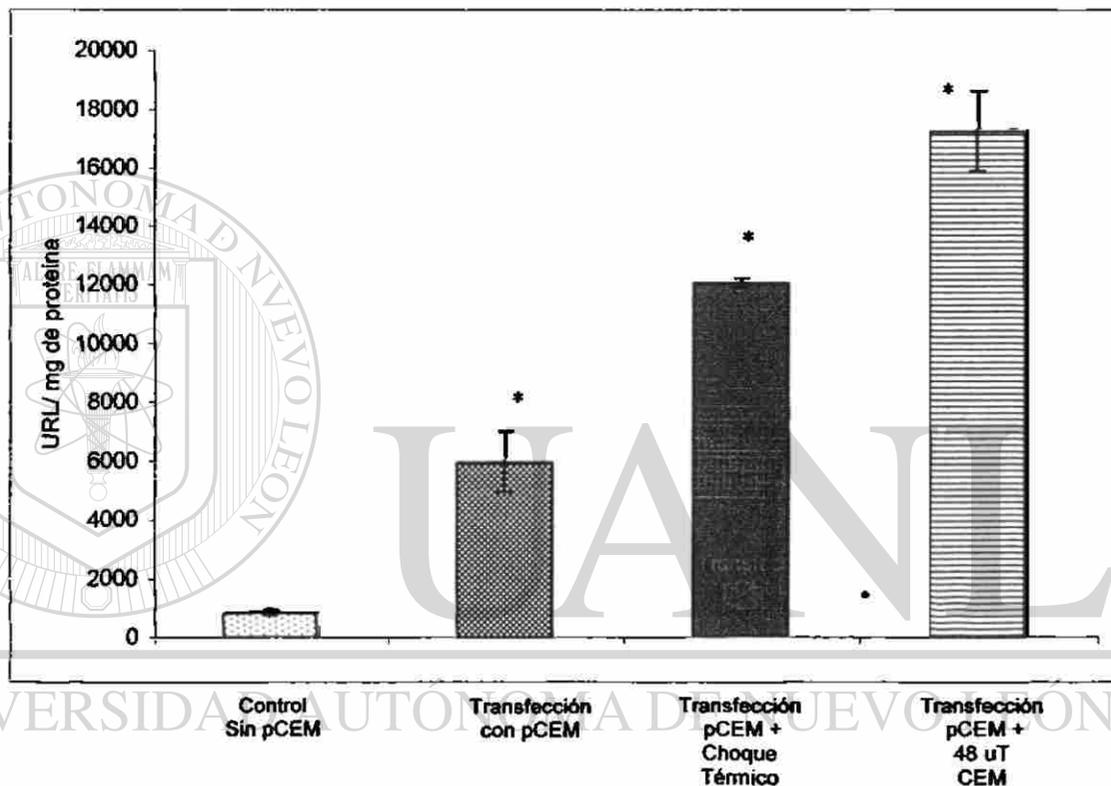


Figura 16. Efecto de $48 \mu\text{T}$ de CEM sobre la activación del promotor de hsp70 en células HeLa transfectadas con pCEM. Las células fueron expuestas a la acción de CEM o CT durante 20 minutos. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de tres repeticiones por tratamiento. *, $p < 0.05$ al compararse con el control sin transfectar.

Posteriormente se realizó un experimento en el que se evaluó el efecto a $80 \mu\text{T}$ comparado con el grupo expuesto a choque térmico y controles antes mencionados. Se encontró mediante la prueba de comparación de medias de Tukey que a $80 \mu\text{T}$, se presentó el mayor nivel de expresión (21708 ± 507) comparado con el grupo expuesto a

choque térmico (11385 ± 1357); los controles con presencia y ausencia de vector presentaron valores más bajos con respecto al grupo expuesto a choque térmico y a CEM como se demuestra en la figura 17 ($P < 0.05$).

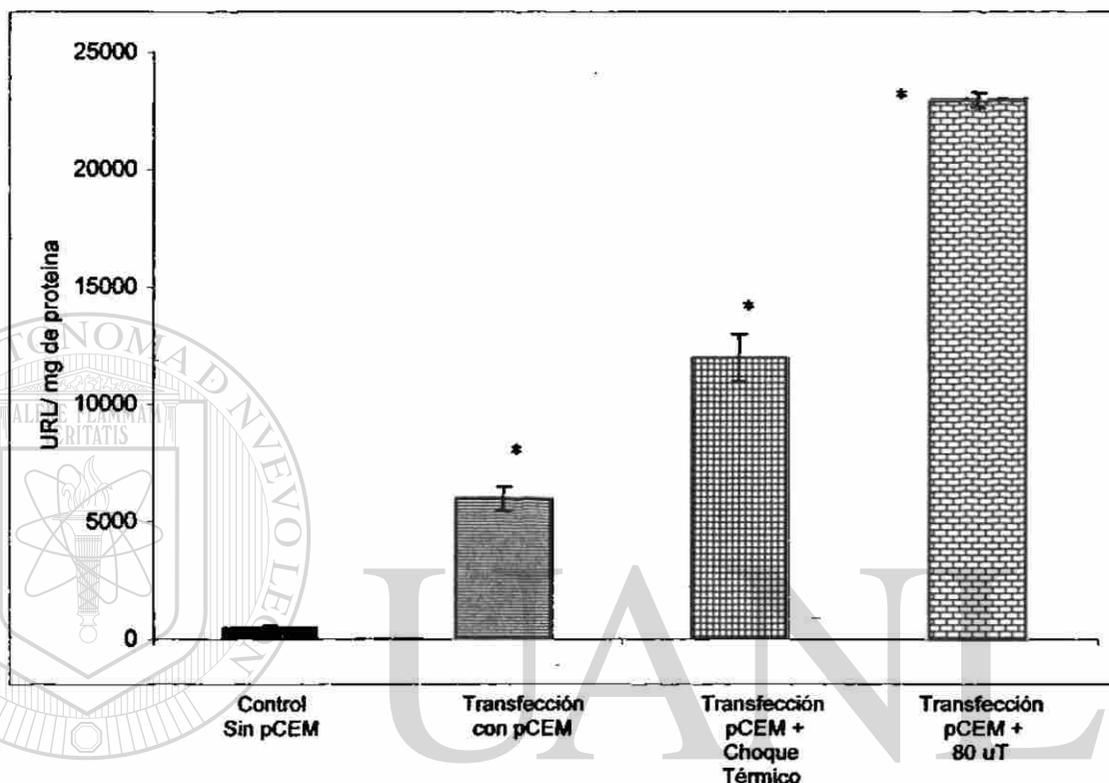


Figura 17. Efecto de $80 \mu\text{T}$ de CEM de 60 Hz sobre la activación del promotor de hsp70 en células HeLa transfectadas con pCEM. Las células fueron expuestas a la acción de CEM o CT durante 20 minutos. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de tres repeticiones por tratamiento. *, $p < 0.05$ al compararse con el control sin transfectar.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Finalmente, en la línea celular HeLa se determinó el efecto combinado de los CEM de $8 \mu\text{T}$ y el choque térmico sobre la expresión de luciferasa (Figura 18). Para esto se manejaron dos grupos expuestos a ambos factores: a) se expuso inicialmente a choque térmico y después a CEM y b) inicialmente expuesto a CEM para posteriormente exponer a choque térmico. Los resultados se compararon con un grupo de células que contenían pCEM y un grupo sin pCEM no expuestos a CEM ni a choque térmico. Se

encontró un alto nivel de expresión de luciferasa en el grupo expuesto inicialmente a choque térmico y después a CEM de 8 μ T (119698 \pm 141) con respecto a los demás grupos; el grupo expuesto inicialmente a CEM y después a choque térmico tuvo un valor de URL/mg de proteína de 19049 \pm 943. El grupo control transfectado con pCEM fue de 13945 \pm 581 URL/mg de proteína y el que no fue transfectado con pCEM fue de apenas 1350 \pm 141 URL/mg de proteína. Los datos se analizaron utilizando la prueba de ANOVA encontrando diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($P < 0.05$).

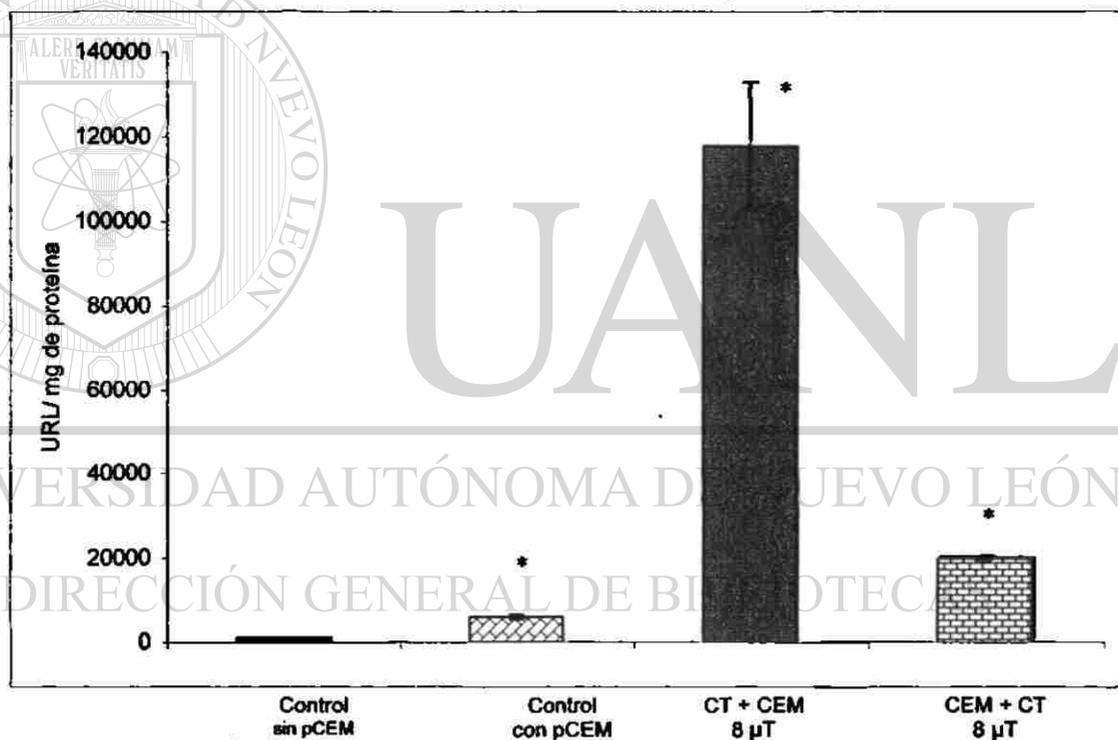


Figura 18. Efecto combinado entre el choque térmico y el campo electromagnético (8 μ T) en células HeLa transfectadas con pCEM. Las células fueron expuestas a la acción de CEM y/o CT durante 20 minutos. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de tres repeticiones por tratamiento. *, $p < 0.05$ al compararse con el control sin transfectar.

Por otra parte, células de la línea celular BMK16 se expusieron a CEM de 8 y 80 μ T y se compararon con un grupo expuesto a choque térmico así como también con un

grupo transfectado con pCEM y sin transfectar con pCEM (Figura 19). Se observó un nivel elevado de URL/mg de proteína en el grupo expuesto a 80 μ T (2896125 \pm 202347) y en menor nivel a 8 μ T (453530 \pm 88035). Para el grupo expuesto a choque térmico se obtuvieron valores inferiores a los expuestos a CEM (171551 \pm 17659), aunque superiores a los controles. ($P < 0.05$).

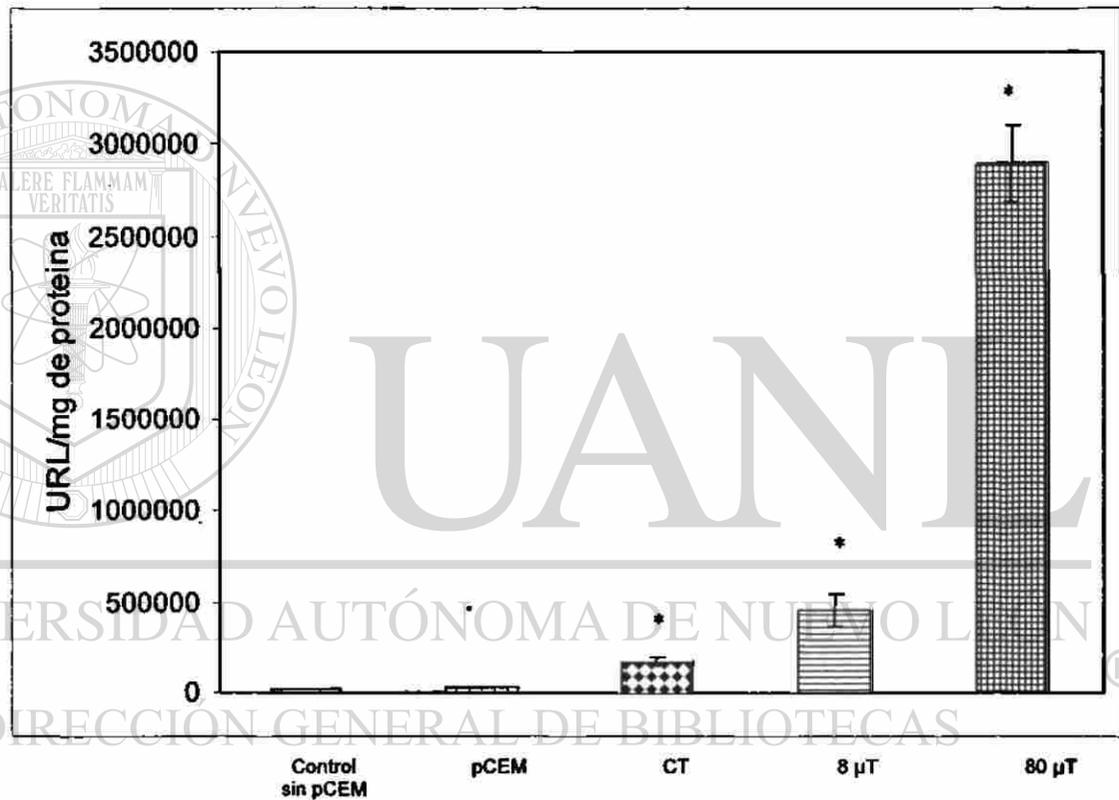


Figura 19. Efecto de los CEM y el choque térmico sobre la expresión del gen *luc* en la línea BMK16 transfectada con el vector pCEM. Las células fueron expuestas a la acción de CEM o CT durante 20 minutos. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de tres repeticiones por tratamiento. *, $p < 0.05$ al compararse con el control sin transfectar.

Por otro lado, se determinó el efecto del CEM de 80 μ T de 60 Hz de frecuencia combinado con el choque térmico sobre células BMK16. Se utilizaron 5 grupos :

a) Expuesto inicialmente a CEM por 20 minutos para después ser expuesto a choque térmico, b) Grupo expuesto inicialmente a choque térmico para posteriormente ser expuesto a CEM, c) Grupo expuesto únicamente a choque térmico, d) Grupo transfectado con pCEM sin exponer a ningún factor físico y e) Grupo sin pCEM. Se encontró el valor más alto de URL/ mg de proteína al exponer inicialmente a CEM de 80 μ T y luego a choque térmico (2579942 ± 330161); siguiendo el grupo expuesto a choque térmico solamente (1342143 ± 634764) con respecto al grupo expuesto inicialmente a choque térmico y luego a CEM de 80 μ T, este presentó valores inferiores que los grupos antes mencionados (919434 ± 181518); sin embargo estos valores siguieron siendo elevados comparados con los grupos control transfectados con pCEM o sin transfectar al ser evaluados mediante la prueba de Tukey (Figura 20).

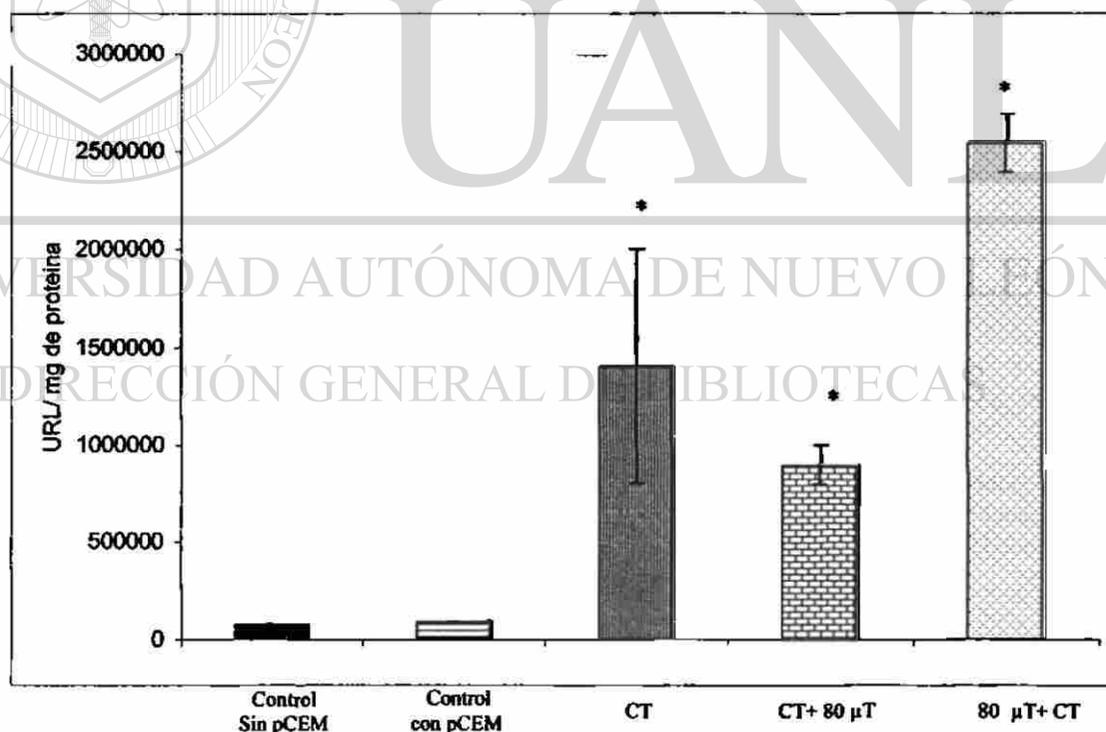


Figura 20. Efecto combinado del choque térmico y la Intensidad del CEM (80 μ T) sobre la expresión del gen *luc* en células BMK16 transfectadas con pCEM. Las células fueron expuestas a la acción de CEM y/o CT durante 20 minutos. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de tres repeticiones por tratamiento. *, $p < 0.05$ al compararse con el control sin transfectar.

Por otro lado, también se llevó a cabo la exposición a CEM en la línea celular RMA-E7 a intensidades de CEM de 8 y 80 μ T comparados con un grupo expuesto a choque térmico y un grupo sin transfectar y un grupo transfectado con pCEM pero sin exponer a factores físicos. No se encontró efecto de los CEM de 60Hz de frecuencia a las intensidades utilizadas sobre esta línea celular al someterse al ANOVA. (Figura 21).

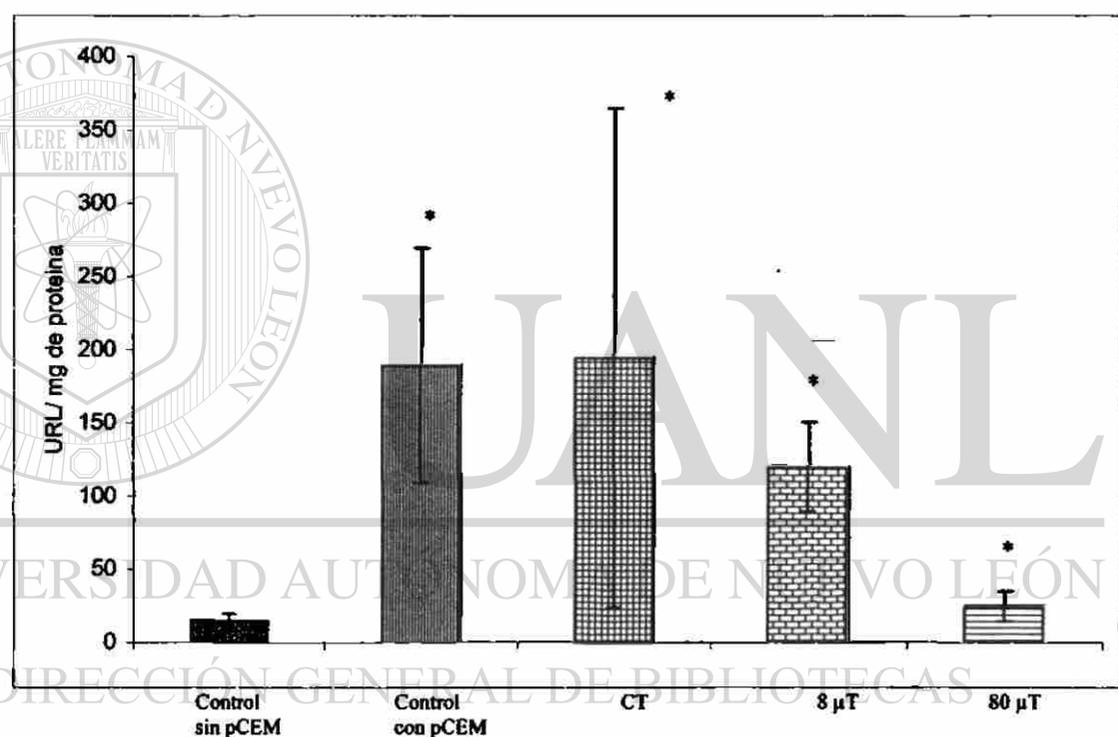


Figura 21. Efecto del CEM y CT sobre la expresión de el gen *luc* en células RMA E7 transfectadas mediante lipofectamina con pCEM. Las células fueron expuestas a la acción de CEM o CT durante 20 minutos. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de tres repeticiones por tratamiento. *, $p < 0.05$ al compararse con el control sin transfectar.

Además, se probó el efecto de los CEM de 8 y 80 μ T de 60 Hz de frecuencia sobre la expresión de luciferasa en la línea celular INER-37 comparados con un grupo expuesto a choque térmico, un grupo transfectado con pCEM pero sin exponer a factores

físicos y un grupo sin transfectar. Se encontró que el grupo expuesto a 8 μT fue el que presentó mayor nivel de expresión de URL/ mg de proteína de luciferasa (11080 ± 379), seguido del grupo expuesto a 80 μT (9831 ± 161) y el grupo expuesto a choque térmico (8906 ± 1395). Se llevó a cabo el análisis estadístico y se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre los grupos como se muestra en la figura 22.

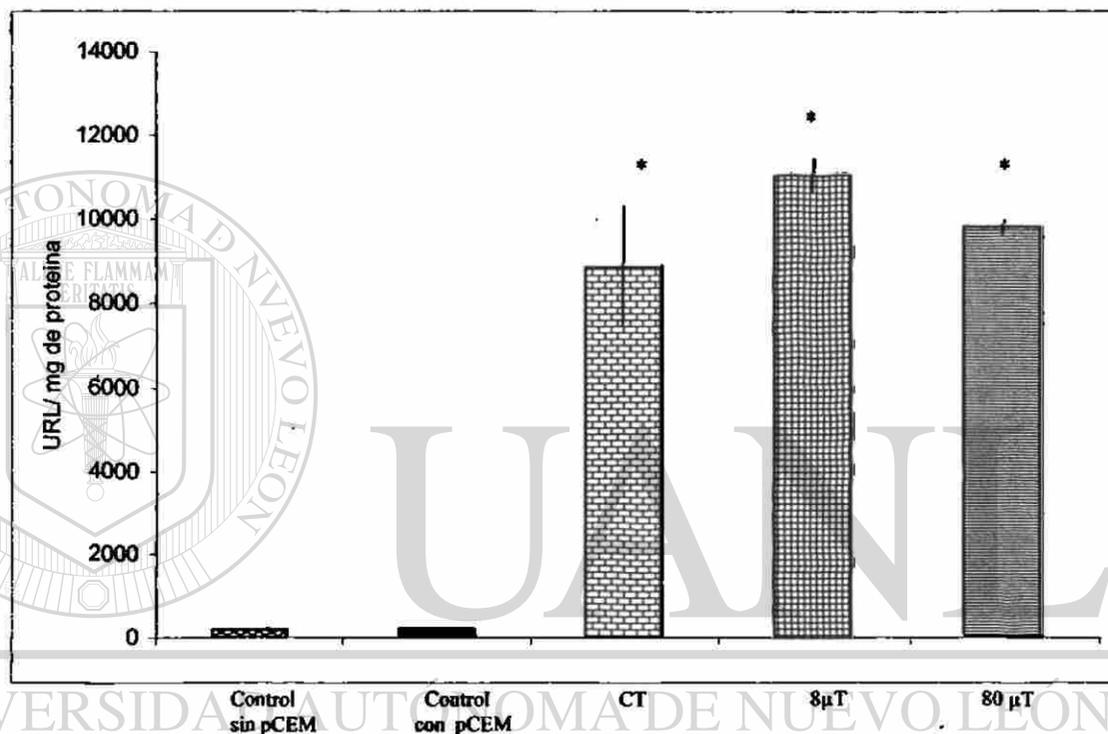


Figura 22. Efecto de los CEM de 8 y 80 μT y el CT sobre la expresión del gen *luc* en células INER-37 transfectadas mediante lipofectamina con el plásmido pCEM. Las células fueron expuestas a la acción de CEM o CT durante 20 minutos. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de tres repeticiones por tratamiento. *, $p < 0.05$ al compararse con el control sin transfectar.

7.3 Determinación de la expresión de luciferasa en ratón *Mus musculus in vivo*

En el primer experimento se determinó el tiempo en el cual se presentó un mayor nivel de expresión de luciferasa en ratones inyectados con el vector pCEM, se hicieron exposiciones a CEM de 80 μT a los días 1,3,5,7 y además de un grupo de animales inyectados con el vector más no expuestos a CEM como grupo control (Figura 23). Se

observó, que el mayor nivel de expresión de URL/mg de proteína fue a los 5 días de exposición (89535 ± 36048) con respecto a los demás días ($P < 0.05$).

Con los datos anteriores se procedió a evaluar ratones inyectados con pCEM al exponer a CEM de $80 \mu\text{T}$ sobre la expresión del gen de luciferasa comparado con los grupos inyectados con el vector pNF κ B-luc que en este caso se utilizó como control positivo y el vector pCEM sin exposición a CEM (Figura 24). Se encontró mediante la prueba de comparación de medias de Tukey que el grupo expuesto a CEM inyectado con pCEM presentó un mayor nivel de expresión de luciferasa comparado con los grupos que fueron inyectados con el vector pNF κ B-luc y pCEM que no fue expuesto a CEM ($P < 0.05$).

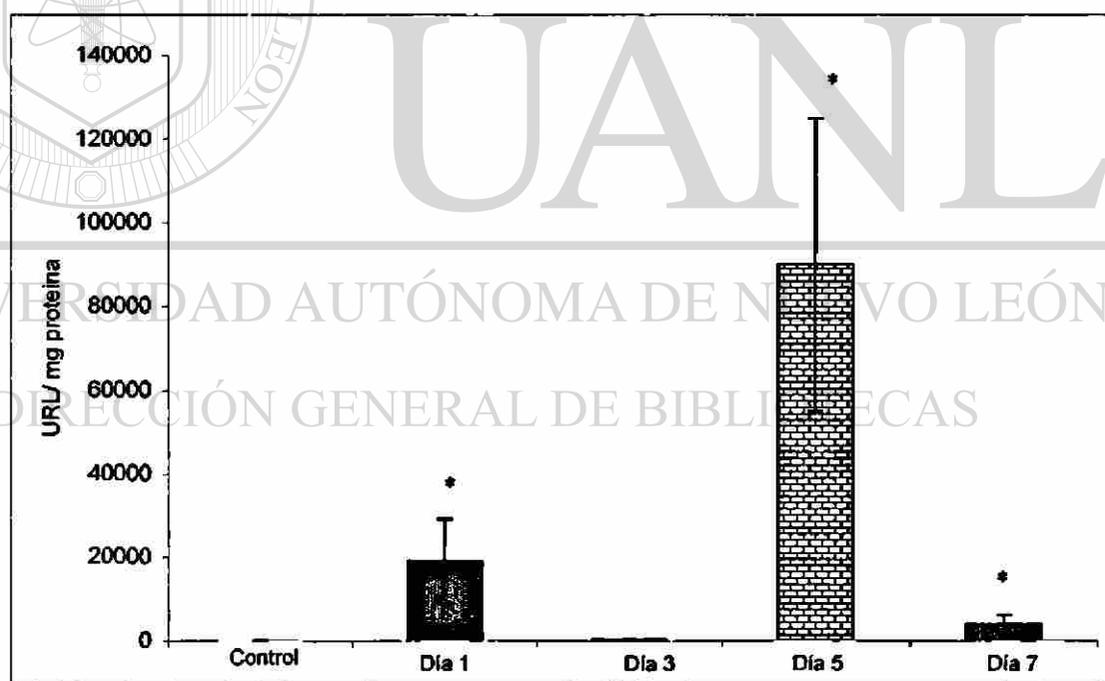


Figura 23 Efecto de los CEM de $80 \mu\text{T}$ de 60 Hz durante 7 días de exposición sobre la expresión de luciferasa en ratones *Mus musculus* de la línea Balb/c inyectados con pCEM. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de tres repeticiones por tratamiento. *, $p < 0.05$ al compararse con el control sin inyectar.

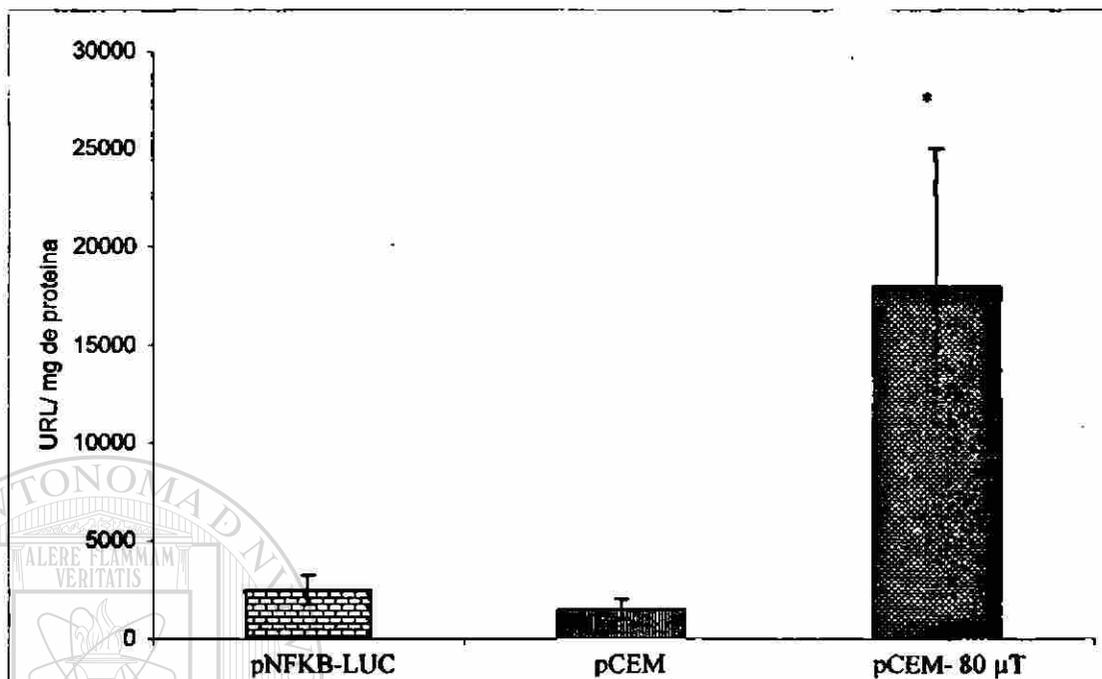


Figura 24 Efecto de los CEM de 80 μ T de 60 Hz sobre la expresión de luciferasa en ratones *Mus musculus* inyectados con pCEM y pNFkB-luc. Los ratones se expusieron a CEM 2 horas diarias durante 7 días. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de tres repeticiones por tratamiento. *, $p < 0.05$ al compararse con pNFkB-luc y pCEM.

7.4 Western Blot para detección de luciferasa

Se realizaron ensayos para determinar el nivel de expresión de luciferasa mediante Western Blot tanto *in vitro* como *in vivo*. Para la línea celular HeLa, el primer experimento consistió en el corrimiento de extractos de lisados celulares, en el carril 1 sin transfectar con pCEM, en el carril 2, transfectado con pCEM sin exponer a ningún factor físico, en el 3, se expusieron a choque térmico y en el carril 4 se expusió a CEM de 8 μ T, se encontró que las líneas celulares que presentaron expresión génica detectable fueron las expuestas a choque térmico y a CEM (Figura 25).

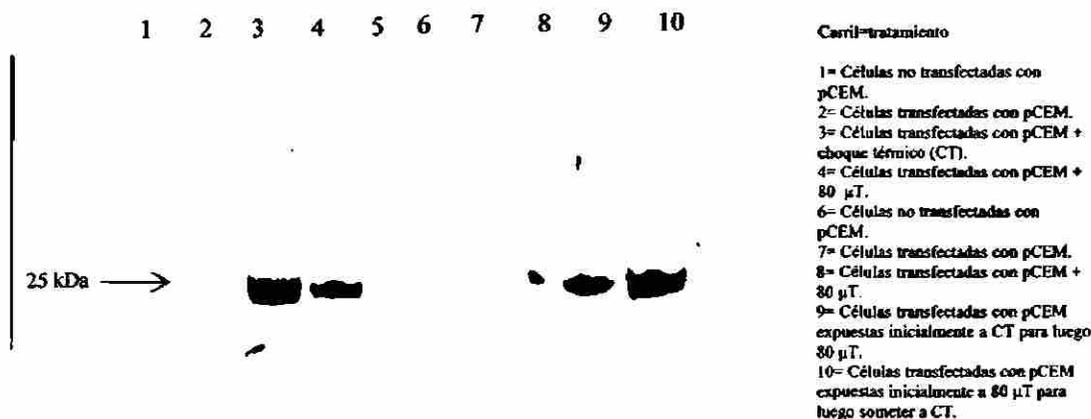


Figura 25. Análisis de Western-Blot en dos experimentos, en el primero (carril 1-4) se comparó el efecto de CEM sobre de la expresión de luciferasa de 25 kDa en la línea celular HeLa; en el segundo (Carril 6-10) se determinó el efecto combinado de los CEM y el choque térmico sobre la expresión de luciferasa en células transfectadas con pCEM.

Por otra parte, se llevó a cabo un segundo experimento en el cual se manejaron muestras de la misma línea celular en las cuales en el carril 6 no fue transfectada con pCEM, en el carril 7 contenía la muestra que fue transfectada con pCEM sin exponer a CEM de 8 μ T, en el carril 8 corresponde a las células que fueron transfectadas con pCEM expuestas a 8 μ T, en el carril 9 presenta las células que se expusieron inicialmente a choque térmico y posteriormente a 8 μ T y en el carril 10 contiene las células transfectadas con pCEM que se expusieron inicialmente a 8 μ T y posteriormente a choque térmico. Se detectó expresión de luciferasa en los grupos expuestos a) únicamente a CEM, b) a choque térmico y posteriormente 8 μ T y c) células expuestas inicialmente a 8 μ T y después a choque térmico. Se observó un mayor nivel de expresión en el expuesto inicialmente a CEM y después a choque térmico (Figura 25).

En otro ensayo, se determinó si el CEM de 80 μ T antes y después de exponer a choque térmico podía afectar la expresión de luciferasa en la línea celular BMK16 (carril 1 al 5). Se encontró en todos los grupos transfectados expresión de luciferasa, en el grupo sin transfectar no se detectó expresión. Por otra parte, en este mismo ensayo, se determinó el efecto de CEM de 8 y 80 μ T sobre la línea celular INER-37 (carril 6-10). Se encontró una mayor presencia de luciferasa en los grupos expuestos a CEM de 8 y 80 μ T (carriles 9 y 10), además de el grupo expuesto a choque térmico (carril 8), por otra parte se logró ver una banda muy tenue en el grupo únicamente transfectado sin exposición a factor físico (carril 7) y no hubo detección en el grupo que no fue transfectado. (Figura 26)

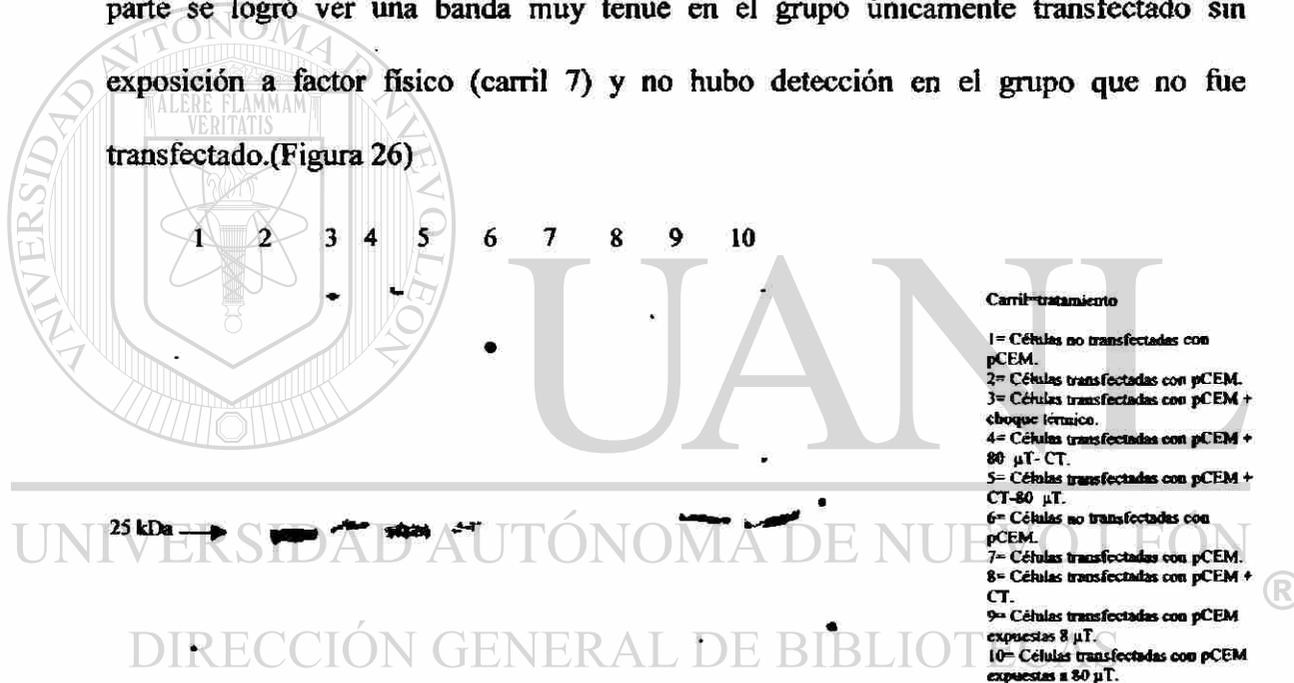


Figura 26. Análisis de Western-Blot en dos experimentos, en el primero (carril 1-5) se comparó el efecto combinado de CEM sobre la línea celular BMK16, sobre la expresión de luciferasa (25 kDa); en el segundo experimento (Carril 6-10) se determinó el efecto de los CEM y el choque térmico sobre la expresión de luciferasa en células INER-37 con pCEM.

Por otro lado, se llevó a cabo un tercer ensayo de Western Blot en el cual se evaluó la expresión de luciferasa en ratones *in vivo* expuestos a CEM y a PNFKB-luc.

En el carril 1 se aplicó muestra de ratones inyectados con pCEM sin exposición a CEM de 80 μ T, en el carril 2 contenía muestra de tejido de ratón inyectado con pNFkB-luc sin exposición a CEM, y en el carril 3 contenía tejido muscular de ratón que había sido inyectado con pCEM y expuesto a 80 μ T. Se encontró un alto nivel de expresión en pNFkB-luc y en pCEM expuesto a CEM, y no hubo detección en células transfectadas sin exponer a CEM y en células no transfectadas. También se determinó en este ensayo el efecto de los CEM sobre la expresión de luciferasa a el día 1, 3, 5,7 y un grupo transfectado con pCEM pero no expuesto a dicho factor, se encontró que a los días 3 y 5 se presentó el mayor nivel de expresión de luciferasa, al séptimo día se encontró un decaimiento en el nivel de expresión y no se logró detectar expresión en el grupo transfectado con pCEM sin exponer a CEM ni en el grupo que solo tuvo un día de exposición (Figura 27).

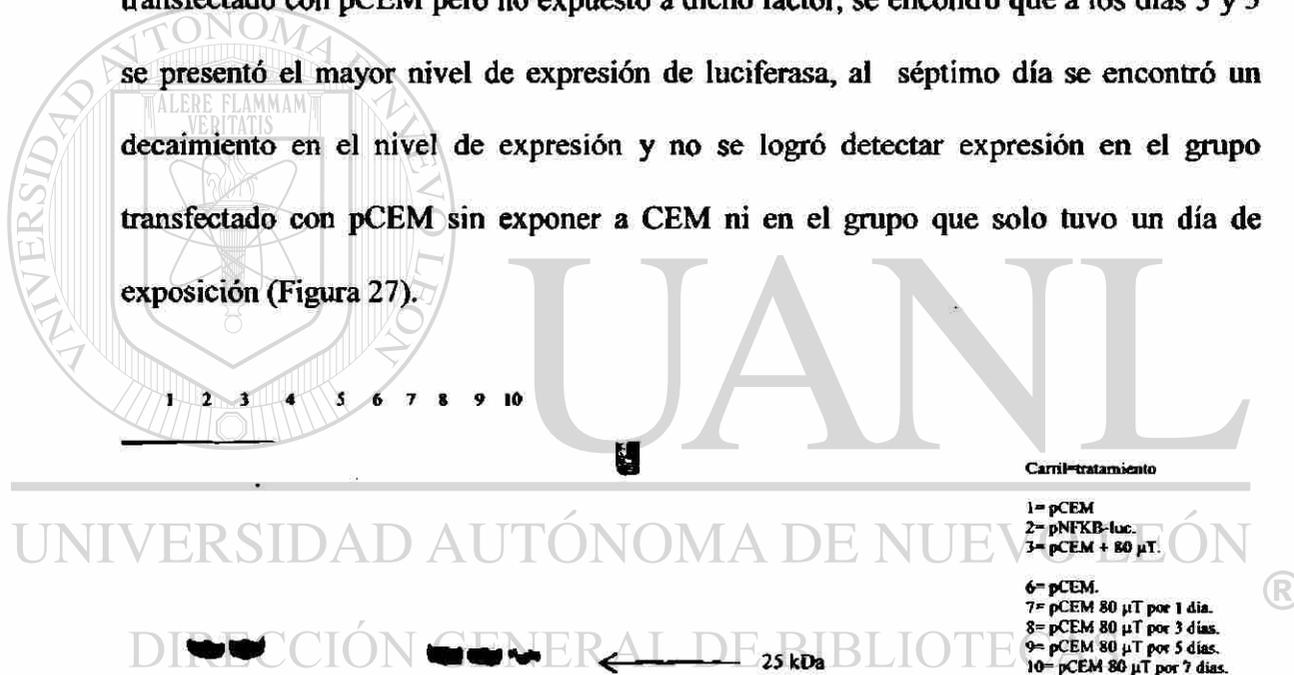


Figura 27. Análisis de Western-Blot de dos experimentos, en el primero (carril 1-3) se determinó el efecto de la exposición a CEM 2 horas diarias durante 7 días, sobre ratones *Mus musculus in vivo*, sobre la expresión de luciferasa(25 kDa); en el segundo experimento (Carril 6-10) se el efecto de los CEM de 80 μ T sobre la expresión de luciferasa en ratones *Mus musculus* a los días 1,3,5,7 inyectados con pCEM .

8. DISCUSIÓN

Se logró construir un vector con elementos de respuesta a CEM, dicha zona comprendió el promotor de 273 nucleótidos de hsp70 humano, el cual contenía además el gen de luciferasa de *Photinus pyralis*. La secuencia codificante es seguida por una señal de poliadenilación tardía de SV40 para asegurar el procesamiento eficiente. Además, presentaba el origen de replicación pUC y el gen de resistencia a ampicilina para la selección y propagación en *Escherichia coli*. Este vector podría ser potencialmente útil para insertar genes terapéuticos y llevar a cabo la expresión regulada del gen. Existen reportadas en la literatura muy variadas alternativas para regular la expresión génica, como es el caso de vectores que contienen promotores que pueden ser inducidos por agentes químicos tales como las tetraciclinas, hormonas esteroideas, citocinas, rapamicina y metales pesados (Walther *et al.*, 1997; Rossy y Blau, 1998). Tales promotores y el construido en este trabajo, hacen factible poder controlar el encendido y apagado de genes terapéuticos, lo que da lugar a estrategias que prometen ser muy consistentes. Asimismo, se han encontrado otras alternativas para llevar a cabo la regulación de la expresión mediante el factor temperatura sobre el promotor de hsp70. Por ejemplo, en un estudio relacionado con el presente, se utilizó el calor dirigido a partes específicas del organismo en combinación con un promotor sensible a choque térmico para ayudar a obtener expresión ya que como se mencionó anteriormente, ciertos miembros de la familia de promotores de proteínas de choque térmico son regulados fuertemente por la temperatura, en dicho estudio se utilizó al

promotor de hsp70. Se incrementó la temperatura de 5 a 8°C en la región específica por 45 minutos, y se encontró un incremento en la expresión génica de hsp70 entre la región focal y la circundante en un rango de 3 hasta 67 veces (Madio *et al.*, 1998). Sin embargo en estas estrategias pueden existir efectos indeseables, como es que los genes se expresen en forma insuficiente o bien excesiva a causa de una mala regulación de la temperatura. Por otra parte, la alternativa aquí presentada tiene la capacidad de regular la activación del promotor de hsp70 mediante CEM de 60 Hz, además no genera daño al tejido ni incrementa las temperaturas y se puede controlar el nivel de expresión al limitar el tiempo de exposición a CEM. Este trabajo se realizó en base a estudios previos realizados sobre este promotor por otros investigadores (Lin *et al.*, 1997; Goodman y Blank, 2002). Por otro lado, existen varias líneas de evidencia que muestran que las células responden a campos magnéticos: Mediante estudios transcripcionales sobre cromosomas de la glándula salival en *Sciaria coprophila* y *Drosophila melanogaster* se detectó producción de ARN después de exponer a campos magnéticos (Goodman *et al.*,

1983; Weisbrot *et al.*, 1993a). Además, en otro estudio se encontró una inducción en la expresión de genes de estrés en levaduras y células humanas cultivadas al exponer a campos magnéticos (Weisbrot *et al.*, 1993b; Goodman *et al.*, 1994; Blank *et al.*, 1994), y también se han tenido hallazgos que demuestran que los campos magnéticos pueden contribuir a que las células puedan resistir otros factores de estrés. Tal es el caso de la termotolerancia adquirida en el caso del estrés térmico (Carmody *et al.*, 2000). Estas evidencias tienen potencial terapéutico como es el caso de la citoprotección ante factores de estrés.

Por otra parte, en nuestros resultados se observó un incremento de la expresión de luciferasa regulada por el promotor de hsp70 al exponer a CEM de 8 y 80 μ T a las líneas celulares HeLa, Iner-37 y BMK16 con respecto a los grupos control no expuestos a campos magnéticos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Lin y sus colaboradores (1998), quienes expusieron varias líneas celulares a CEM de 8 μ T por 20 minutos, para posteriormente medir la actividad transcripcional del gen de hsp70; y encontraron que se incrementaba el nivel de expresión en células expuestas a CEM, con respecto a aquellas que no se habían expuesto a dicho factor. Asimismo, los resultados que se obtuvieron en nuestro estudio son muy similares a los obtenidos recientemente por investigadores alemanes, (Lupke *et al.*, 2006) ellos determinaron el efecto de los CEM de extremadamente baja frecuencia sobre la activación de monocitos derivados de la sangre de cordón umbilical. Las células fueron expuestas por 45 minutos a CEM de 1.0 a 1.5 mT y encontraron alteración en la expresión de 986 genes involucrados en el metabolismo, procesos fisiológicos, señal de transducción y respuesta inmune. En otro trabajo, (Lin *et al.*, 1996) previamente habían obtenido resultados similares al exponer a CEM a la línea HL60 a CEM de 60Hz, midiendo la expresión del gen c-myc. También se evaluó el efecto de los CEM sobre la línea celular RMA-E7, sin embargo no se logró observar un incremento en la expresión de luciferasa con respecto a los grupos control. Estos cambios en las respuestas a CEM por las líneas celulares, pueden ser debidos a variaciones a nivel de los factores de transcripción que intervienen en la respuesta a CEM. Esto ha sido previamente mencionado por un grupo de investigadores quienes encontraron en distintas líneas celulares que los factores de transcripción AP-1, AP-2 y SP-1, están involucrados en la unión al ADN permitiendo la transcripción génica en presencia de este factor físico (Lin *et al.*, 1998).

En otro trabajo reciente (Czyz *et al.*, 2006), se determinó el efecto de los CEM sobre células pluripotenciales de embriones de ratón, se expusieron células deficientes en p53 y células con p53 funcional a CEM de 0.1, 1.0 y 2.3 mT de 50 Hz de frecuencia para evaluar la capacidad transcripcional de *egr-1*, *p21*, *c-jun*, *c-myc*, *hsp70* y *bcl2* mediante RT-PCR. Se encontró un incremento en la actividad transcripcional de *p21*, *c-jun* y *egr-1* solo en células deficientes en p53; en células con p53 normal no hubo cambios, por lo que se consideró, que el efecto de los CEM es dependiente de la función de p53.

Por otra parte, en nuestro estudio se investigó el efecto combinado de los CEM y el choque térmico a 43°C por 20 minutos en células HeLa, además se modificó el orden de los factores físicos y se encontró que cuando se exponía inicialmente a choque térmico para luego exponer a CEM de 8 μ T de intensidad, se incrementaba la expresión de luciferasa en forma considerable con respecto a los demás grupos; además se logró detectar mediante Western-Blot la expresión de luciferasa en esta línea celular. Estos

resultados concuerdan con los obtenidos por Tokalov y Gutzeit (2004), ellos demostraron que los genes de choque térmico en las células humanas podían responder a CEM solos y en la combinación con estrés térmico, para esto se expusieron células HL-60 por 30 minutos a CEM de 10 a 140 μ T, para luego cuantificar la expresión de los genes HSP27, HSP60, HSP70 (A, B, y C), HSC70, HSP75, HSP78, y HSP90 por RT-PCR y encontraron que los genes de choque térmico, en particular los tres genes de HSP70 (A, B, y C), son inducidos por CEM con un máximo de respuesta a una densidad de flujo de 60 a 80 μ T. Sin embargo otro grupo de investigación (Coulton *et al.*, 2004), evaluó el efecto combinado de CEM de hasta 100 μ T y choque térmico sobre leucocitos

humanos de sangre venosa periférica, sobre la expresión de HSP27, HSP70A y HSP70B y sus resultados no mostraron efecto de los CEM en combinación con choque térmico sobre la expresión de estos genes. También el grupo de Henderson *et al.*, (2003) evaluaron el efecto de los campos magnéticos de 50 Hz y 700 μ T sobre la expresión de HSP60 en células de endotelio y observaron que al exponer a CEM solos, o en combinación con choque térmico, no se presentó incremento en la producción de HSP60.

Por otra parte, en los estudios que fueron llevados *in vivo* en ratones inyectados con pCEM y expuestos a CEM de 80 μ T; se encontró en el día 5 la mayor expresión de luciferasa. Además se logró detectar expresión de esta proteína en los grupos expuestos mediante ensayo de Western Blot. Este resultado concuerda con el encontrado por otro grupo de investigadores (Junkersdorf *et al.*, 2000) que estudiaron el efecto de los CEM de hasta 150 μ T combinado con distintas temperaturas sobre el control de los

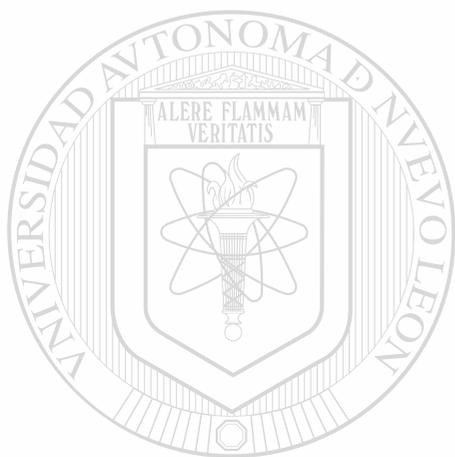
promotores de hsp26 y hsp70 que expresaban el gen reportero lacZ en *Caenorhabditis elegans*, ellos encontraron que los CEM incrementaban drásticamente la expresión del gen reportero controlado por estos dos promotores. Otro trabajo que apoya el hecho aquí encontrado *in vivo*, fue el elaborado por investigadores en Italia (Malagoli *et al.*, 2004), ellos evaluaron el efecto de los campos magnéticos de 50 Hz a intensidades de 300, 400 y 600 μ T sobre la expresión de proteínas de choque térmico (HSP70 y HSP90) en inmunocitos de mejillones *Mytilus galloprovinciales*. Los resultados obtenidos en los Western Blot indicaron que dosis de 300 y 400 μ T no incrementaron la expresión de proteínas de choque térmico con respecto a un grupo no expuesto al factor físico, sin

embargo a 600 μ T se encontraron los niveles más elevados en comparación con el grupo control no expuesto a CEM.

Los efectos sobre la expresión génica no han sido probados exclusivamente en CEM, también han sido evaluados con radiaciones ionizantes. En el trabajo presentado por Ding *et al.*, (2002) se comparó el efecto de los CEM de 60 Hz de 5 mT contra los rayos X sobre la expresión del gen GAP-43 en células de glioma humano MO54. Ellos utilizaron las técnicas de RT-PCR e inmunocitoquímica encontrando que el pico de la transcripción se presentaba a las 10 horas, teniendo una disminución a las 24 h de haber expuesto a CEM, también encontraron que el efecto de los rayos X era muy similar al provocado por los CEM. Esto comprueba que la expresión génica puede ser afectada por otro tipo de radiaciones además de los CEM de 60 Hz, además nuestros resultados concuerdan con lo obtenido por Ding *et al.*, (2002) en relación a que la expresión presenta un pico máximo con respecto a la expresión génica para posteriormente

regresar a valores normales como fue en nuestro estudio que presentó los mayores niveles a los 5 días de exposición. Por otra parte, a pesar de no encontrar trabajos similares en los que se evaluara el efecto de los CEM sobre la regulación mediante el promotor de hsp70 *in vivo*, existen otros trabajos en los que se han evaluado los efectos *in vivo* sobre otros genes. En un estudio se logró determinar el efecto de los CEM sobre la expresión de genes ETS *in vivo*, (Mucci *et al.*, 2001) en donde detectaron un incremento en la expresión de RNAm ETS1 y de proteína, pero una disminución en niveles de proteína del ETS2. Asimismo se ha encontrado que se puede afectar de forma significativa los niveles de expresión de Ntan1 que esta involucrado en la función neural

(Goto et al., 2006). Sin embargo nuestros resultados obtenidos al medir el grado de expresión del gen de luciferasa tanto *in vitro* como *in vivo* nos indican la factibilidad de utilizar el vector pCEM para la regulación de genes terapéuticos inducidos mediante CEM para el control de diversas enfermedades.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

9. CONCLUSIONES

- Se subclonó en el vector pNFkB-luc el promotor de hsp70 humano conteniendo elementos de respuesta a campos electromagnéticos y se detectó y caracterizó mediante digestión enzimática y PCR.

- Los campos electromagnéticos de 60 Hz de frecuencia y de 8 y 80 μ T, incrementaron la expresión del gen de la luciferasa en las líneas celulares HeLa, Iner-37 y BMK16 estimado mediante luminometría.

- Se observó un efecto sinérgico en cuanto a la expresión de luciferasa determinada mediante luminometría al exponer células pretratadas con choque térmico a campos electromagnéticos de 60 Hz de frecuencia y de 8 y 80 μ T. ®

- Los campos electromagnéticos de 60 Hz de frecuencia y de 8 y 80 μ T, no modificaron la expresión de luciferasa en la línea celular RMA-E7.

- Los campos electromagnéticos de 80 μ T y de 60Hz de frecuencia incrementaron la expresión de luciferasa en tejido muscular de ratones *Mus musculus* inyectados con el vector pCEM *in vivo* determinado mediante luminometría.

LITERATURA CITADA

Alipov Ye D, Berlev I Ya and Aizenberg OA. 1994. Systemic reaction of *Escherichia coli* cells to weak electromagnetic fields of extremely low frequency. *Bioelectrochemistry*, **34**: 5-12.

Alonso M, Rojo O. 1981. *Física campos y ondas*. Addison-Wesley Iberoamericana, S.A. México. Pp 15-157

Andrew C, Basset L. 1985. Aspectos prácticos y fundamentos de usos terapéuticos de campos electromagnéticos pulsados. *Revista de Ingeniería Biomédica*. **5**:451-529.

Antonopoulos A, Yang BC, Estamm A, Heller WD, Obe G. 1995. Cytological effects of 50 Hz electromagnetic fields on human lymphocytes *in vitro*. *Mutation Research Letters*. **346**:3 pp 157-157.

Azanza MJ, Del Moral A. 1994. Cell membrane biochemistry and neurobiological approach to biomagnetism. *Progress in Neurobiology*. **44**: 517-601.

Balcer-Kubiacek EK, Zhang XF, Harrison GH, McCready WA, Shim ZM, Han LH, Abraham JM, Ampey LL 3rd, Meltzer SJ, Jacobs MC, Davis CC. 1996. Rodent cell transformation and intermediate early gene expression following 60-Hz magnetic field exposure. *Environ Health Perspect.*, **104**(11):1188-1198.

Blackman CF, Benane SG, Elliot DJ. 1988. Influence of electromagnetic field on the efflux of calcium ions from brain tissue *in vitro*: a three model analysis consistent with the frequency response up to 50 Hz. *Bioelectromagnetics* **9**:215-27.

Blank M., Khorkova O., Goodman R. 1994. Changes in polypeptide distribution stimulated by different levels of electromagnetic and thermal stress. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **33**:109-114.

Blank M. 1995. Biological effects of environmental electromagnetics fields: Molecular mechanism. *Biosystems*. **35**:175-178.

Bowman JD, Thomas DC, London SJ, Peters JM. 1995. Hypothesis : The risk of childhood leukemia is related to combinations of power-frequency and static magnetic fields. *Bioelectromagnetics*. **16**(1): 48-59.

Brusik D. (1987). *Principles of genetic toxicology*. New York. Plenum Press. 1st Edition. pp 53-76.

Cairo P, Greenbaum B, Goodman E. 1998. Magnetic field exposure enhances mRNA expression of sigma 32 in *E. coli*. *J. Cell Biochem*. **68**(1):1-7.

Campbell-Beachler M, Ishida-Jones T, Haggren W, Phillips JL. 1998. Effect of 60 Hz magnetic field exposure on c-fos expression in stimulated PC12 cells. *Mol. Cell Biochem.*, **189**(1-2):107-111.

Cantini M, Cossarizza A, Bersani F, Cadossi R, Cecherelli G, Tenconi R, Gatt C, Franceschi C. 1986. Enhancing effects of pulsed electromagnetic fields on lectin-induced human lymphocyte proliferation. *J. Bioelectric.*, **5**:91-104.

Carmody S, Wu XL, Lin H, Blank M, Skopicki H, Goodman R. 2000. Cytoprotection by electromagnetic field-induced hsp70: a model for clinical application. *J Cell Biochem.* **79**(3):453-9.

Coleman M., Bell J, Skeet R. 1983. Leukemia incidence in electrical workers. *Lancet.* **982-983.**

Coulton LA, Harris PA, Barker AT, Pockley AG. 2004. Effect of 50 Hz electromagnetic fields on the induction of heat-shock protein gene expression in human leukocytes. *Radiat Res.* **161**:430-4.

Davis JG. 1992. Health effects of low-frequency electric and magnetic fields. Oak Ridge Associated Universities.

Day RN, Day KH. 1994. Specific repression of rat prolactin gene expression in transplanted tumor cells. *Mol. Endocrinol.* **8**:12-20.

Day RN, Kawecky M, Berry D. 1998. Dual-function reporter protein for analysis of gene expression in living cells. *Biotechniques.* **25**:848-856.

De la Rosa R. 1995. Evolución y Conceptos Físicos del Electromagnetismo. Contaminación electromagnética. Terapión. Valencia. Pp 47-68.

Di Carlo A, White N, Guo F, Garrett P, Litovitz T. 2002. Chronic electromagnetic field exposure decreases HSP70 levels and lowers cytoprotection. *J Cell Biochem.* **84**:447-54.

Dihel LE, Smith-Sonneborn J, Middaugh CR. 1985. Effects of an extremely low frequency electromagnetic field on the cell division rate and plasma membrane of *Paramecium tetraurelia*. *Bioelectromagnetics.* **6**: 61-71

Dillon PJ, Rosen CG. 1990. A rapid method for the construction of synthetic genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques.* **9**:3:298-300.

Ding GR, Nakahara T, Miyakoshi J. 2002. Exposure to power frequency magnetic fields and X-rays induces GAP-43 gene expression in human glioma MO54 cells. *Bioelectromagnetics.* **23**(8):586-91.

Ferran AM. 1996. SPSS para Windows. Editorial LIMUSA. Primera edición. Pp 222-230.

Fajardo-Gutiérrez A, Garduno-Espinoza J, Yamamoto-Kimura L, Hernández-Hernández M, Gómez-Delgado A, Mejia-Cartagen, SA, Martínez-García MC. 1993. Reinscince close to high-tension electric power lines and its association with leukemia in children. *Bol. Med. Hosp. Inf. Méx.* 59:32-8.

Fiorani M, Cantoni, O, Sestili P, Conti R, Nicolini P, Vetrano F, Dacha M. 1992. Electric and/or magnetic field effects on DNA structure and function in cultured human cells. *Mutation Research.* 282:25-9.

Galar-Castelan I. 1988. Electricidad y magnetismo. Editorial LIMUSA. Primera edición pp 222-230 .

Goodman R, Bassett CAL, Henderson AS. 1983. Pulsing electromagnetic Fields induce cellular transcription. *Science.*, 220:1283-1285 .

Goodman R., Blank M., Lin H., Khorkova O., Soo L., Weisbrot D., Henderson A. 1994. Increased levels of hsp transcripts are induced when cells are exposed to low frequency electromagnetic fields. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 33:115-120.

Goodman R, Blank M. 2002. Insights into electromagnetic interaction mechanisms. *Journal of cellular physiology.*, 192:16-22.

Goodman R, Cizmazhek Y, Shirley-Henderson A. 1993. Electromagnetic fields and cells. *J. Cell. Biochem.*, 51: 436-441.

Goto Y, Taniura H, Yamada K, Hirai T, Sanada N, Nakamichi N, Yoneda Y. 2006. The magnetism responsive gene *Ntan1* in mouse brain. *Neurochem Int.* 49(4):334-41.

Grimaldi S, Pasquali E, Barbatano L, Lisi A, Santoro N, Serafino A, Pozzi D. 1997. Exposure to a 50 Hz electromagnetic field induces activation of the Epstein-Barr virus genome in latently infected human lymphoid cells. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 16(2-3):205-207.

Han L, Lin H, Head M, Jin M, Blank M, Goodman R. 1998. Application of magnetic field-induced heat shock protein 70 for presurgical cytoprotection. *J. Cell Biochem.* 71:4 577-583.

Hemmersbach R, Becker E, Stockem W. 1997. Influence of extremely low frequency electromagnetic fields on the swimming behavior of ciliates. *Bioelectromagnetics.*, 18:491-498.

Henderson BR, Pfister G, Boeck G, Kind M, Wick G. 2003. Expression levels of heat shock protein 60 in human endothelial cells in vitro are unaffected by exposure to 50 Hz magnetic fields. *Cell Stress Chaperones.* 8(2):172-82.

Hewitt. 1998. Física Conceptual. Addison Wesley Longman (Editorial). Séptima reimpresión. pp. 616-629.

Jahreis GP, Johnson PG, Zhao YL, Hui SW. 1998. Absence of 60-Hz, 0.1-mT magnetic field-induced changes in oncogene transcription rates or levels in CEM-CM3 cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1443**(3):334-342.

Junkersdorf B, Bauer H, Gutzeit HO. 2000. Electromagnetic fields enhance the stress response at elevated temperatures in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Bioelectromagnetics*. **21**:100-106.

Juutilainen J, Lang S. 1997. Genotoxic, carcinogenic and teratogenic effects of electromagnetic fields. Introduction and overview. *Mutat. Res.* **387**: 165-171.

Kato M, Honma K, Shigemitsu T, Siga Y. 1993. Effects of exposure to a circularly polarized 50 Hz magnetic field on plasma and pineal gland melatonin levels in rats. *Bioelectromagnetics* **19** (2): 97-106.

Kato M, Honma K, Shigemitsu T, Shiga Y. 1994. Circularly polarized 50 Hz magnetic fields reduces pineal gland and blood concentrations of Long Evans rats. *Neurosci Lett.* **166** (1): 59-62.

Kowalczyk CI, Robbins L, Thomas JM, Saunders RD. 1996. Dominant lethal studies in male mice after exposure to 50 Hz magnetic field. *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* **328**: 2 pp. 229-237.

Lagroye I, Poncy JL. 1998. Influences of 50-Hz magnetic fields and ionizing radiation on c-jun and c-fos oncoproteins. *Bioelectromagnetics.* **19**(2):112-6.

Libertini CR, Panozzo J, Groh KR, Chang-Liu CM, Woloschak GE. 1994. Effects of gamma rays, ultraviolet radiation, sunlight, microwaves and electromagnetic fields on gene expression mediated by human immunodeficiency virus promoter. *Radiat. Res.*, **140**(1):91-96.

Liboff AR, Williams T, Strong DM, Wistar R. 1984. Time-varying magnetic fields: effects on DNA synthesis. *Science.*, **223**: 818-820.

Lin C. 1994. Advances in electromagnetic fields in living systems. Volume 1. First Edition. Plenum Press. N.Y. pp. 18-20.

Lin H, Blank M., Jin M., Goodman R. 1996. Electromagnetic field stimulation of biosynthesis: changes in c-myc transcript levels during continuous and intermittent exposures. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics.* **39**:215-220

Lin H., Blank M, Goodman R. 1999. A magnetic field-responsive domain in the human HSP70 promoter. *J. Cell Biochem.*, **75**:1 170-176.

Lin H, Han L, Blank M, Head M, Goodman R. 1998. Magnetic field activation of protein-DNA binding. *J. Cell Biochem.*, 70:3 297-303.

Lin H, Opler M, Head M, Blank M, Goodman R. 1997. Electromagnetic field exposure induces rapid, transitory heat shock factor activation in human cells. *J. Cell Biochem.*, 66(4):482-428.

Lin JC. 1994. *Advances in electromagnetic fields in living systems*. Plenum Press., New York . pp 16,17,130,149 .

Liburdy RP. 1992. Calcium signaling in lymphocytes and ELF fields. Evidence for an electric field metric and a site of interaction involving the calcium ion channel. *FEBS Letters* 301 (1):53-9.

Luceri C, Filippo CD, Giovannelli L, Blangiardo M, Cavalieri D, Aglietti F, Pampaloni M, Andreuccetti D, Pieri L, Bambi F, Biggeri A, Dolara P. 2005. Extremely low-frequency electromagnetic fields do not affect DNA damage and gene expression profiles of yeast and human lymphocytes. *Radiat Res.* 164(3):277-85.

Loberg LI, Gauger JR, Buthod JL, Engdahl WR, McCormick DL. 1999. Gene expression in human breast epithelial cells exposed to 60 Hz magnetic fields. *Carcinogenesis.* 20:8 1633-1636.

Lupke M, Frahm J, Lantow M, Maercker C, Remondini D, Bersani F, Simko M. 2006. Gene expression analysis of ELF-MF exposed human monocytes indicating the involvement of the alternative activation pathway. *Biochim Biophys Acta.* 1763(4):402-12.

Madio DP, Van Gelderen P, DesPres D, Olson AW, de Zwart JA, Fawcett TW, Holbrook NJ, Mandel M, Moonen CT. 1998. On the feasibility of MRI-guided focused ultrasound for local induction of gene expression. *J. Magn Reson Imaging.* 8:1 101-4

Malagoli D, Lusvardi M, Gobba F, Ottaviani E. 2004. 50 Hz magnetic fields activate mussel immunocyte p38 MAP kinase and induce HSP70 and 90. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 137(1):75-9.

McDowall ME. 1983. Leukemia mortality in electrical workers in England and Wales. *Lancet.* p 243.

McLeod K, Lee R, Erlich. 1987. Frequency dependence of electric fields modulation of fibroblast protein synthesis. *Science.*, 236:1465-1469.

Miki H, Ohmori M, Hirakawa E, Winters WD. 1999. Effects of environmental level magnetic field exposures on transcription of CMV immediate early promoter DNA in a cell-free *in vitro* transcription system. *Bioelectromagnetics.* 20:8 519-521.

Milham S. 1982. Mortality from leukemia in workers exposed to electrical and magnetic fields. *New Engl. J. Med.* p 307,249.

Miller SC, Haberer J, Venkatachalam U, Furniss MJ. 1999. NF-kappaB or AP-1-dependent reporter gene expression is not altered in human U937 cells exposed to power-line frequency magnetic fields. *Radiat. Res.*, 151(3):310-318.

Mishima S. 1988. The effects of long-term pulsing electromagnetic fields stimulation on experimental osteoporosis of rats. *Sangyo Ika Daigaku Zasshi.* 10 (1):31-45.

Morales-Matamoros O. 1997. Campos Electrodomésticos y salud humana, Informe Instituto Costarricense de Electricidad (ICE). San José, Costa Rica.

Morehouse CA., Owen RD. 2000. Exposure to low-frequency electromagnetic fields does not alter HSP70 expression or HSF-HSE binding in HL60 cells. *Radiat. Res.*, 153:(5) 658-662.

Morehouse CA, Owen RD. 2000. Exposure of Daudi cells to low-frequency magnetic fields does not elevate MYC steady-state mRNA levels. *Radiat. Res.*, 153:(5) 663-669.

Moreno-Trujillo OA. 1997. Diseño de un equipo de Tesla modulado en baja frecuencia para el tratamiento experimental de la osteoporosis aplicable al laboratorio de fisiología de la escuela médico militar - Universidad del ejército y fuerza aérea escuela militar de ingenieros. Tesis inédita. pag. 33.

Mucci N, Ianni A, Ursini CL, Arzani D, Bhat NK, Navarra P, Romano-Spica V. 2001. *In vivo* modulation of ETS genes induced by electromagnetic fields. *In Vivo.* 15(6):489-94.

Muñoz R. 1994. Estudios jurídicos sobre la regulación y reglamentación que existe en materia de riesgos , derivados de problemas que se producen en los campos electromagnéticos y sobre el reconocimiento en la legislación del peligro potencial de daño que existe en instalaciones eléctricas de alto voltaje. Comisión Federal de Electricidad., pp 1-10.

Nordstrom S, Birke E, Gustavsson L. 1983. Reproductive hazards among workers at high voltage substations. *Bioelectromagnetics.*, 4: 91-101 .

Parker SP. 1993. *Encyclopedia of Physics.* Second edition. McGraw-Hill., pp 337-339.

Pearce NE, Sheppard RA, Howard JK, Fraser J, Lilley BM. 1985. Leukemia in electrical workers in New Zeland. *Lancet.* p 811-812.

Perry TS. 1994. Today's view of magnetic fields. *IEEE SPECTRUM.* December 14-23.

Pipkin JL, Hinson WG, Young JF, Rowland KL, Shaddock JG, Tolleson WH, Duffy PH, Casciano DA. 1999. Induction of stress proteins by electromagnetic fields in cultured HL-60 cells. *Bioelectromagnetics.*, **20**:6 347-357.

Postow E, Swicord ML. 1996. Modulated Fields and "window" Effects, in: Polk C., Postow E. (Eds). *Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields*. CRC Press, Boca Ratón, USA. pp. 535-581.

Pothakamury UR, Barletta BJ, Barbosa GV, Swanson BG. 1993. Inactivación de microorganismos en alimentos usando campos magnéticos oscilantes - *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos.*, **33**: 479-489.

Ramon C, Martin JT, Powell MR. 1987. Low-level, magnetic-field-induced growth modification of *Bacillus subtilis*. *Bioelectromagnetics.*, **8**: 275-282.

Reese JA, Jastes RF, Frazier ME. 1998. Exposure of mammalian cells to 60 Hz magnetic or electric fields, Analysis for DNA single-strand breaks. *Bioelectromagnetics.* **9**: 237-47.

Rodan GA, Bourret LA, Norton LA. 1978. DNA synthesis in cartilage cells is stimulated by oscillating electric fields. *Science.*, **199**:690-692.

Romano-Spica V, Mucci N, Ursini CL, Ianni A, Bhat NK. 2000. Ets1 cogene induction by ELF-modulated 50 MHz radiofrequency electromagnetic field. *Bioelectromagnetics.* **21**:1 8-18.

Ripamonti A, Ettiene EM, Frankel RB. 1981. Effect of homogeneous magnetic fields on responses to toxic stimulation in *Spirostomum ambiguum*. *Bioelectromagnetics.* **2**: 187-198.

Rojo A. 1981. Física de campos y ondas. Primera edición. Editorial Fondo Educativo® Moderno Interamericano., pp 132 - 145 .

Rossi MV, Blau HM. 1998. Recent advances in inducible gene expression systems. *Current Opinion in Biotechnology.* **9**:451-456

Saffer JD, Thurston SJ. 1995. Short exposures to 60 Hz magnetic fields do not alter MYC expression in HL60 or Daudi cells. *Radiat. Res.*, **144**(1):18-25.

Scarfi MR, Lioi, MB, Zeni, O, Della-Noce M, Franceschi C, Bersani F. 1999. Micronucleus frequency and cell proliferation in human lymphocytes exposed to 50 Hz sinusoidal magnetic field. *Health Phys* **76** (3): 244-50.

Schreiber GH, Swaen GM, Meijers JM, Slangen JJ, Sturmans F. 1993. Cancer mortality and residence near electric transmission equipment: a retrospective cohort study. *International Journal of Epidemiologist.* **22** (9): 1539-582.

Shi B, Isseroff RR, Nuccitelli R. 2003. Power line frequency electromagnetic fields do not increase the rate of protein synthesis in human skin fibroblasts as previously reported. *Bioelectromagnetics*. 24(7):465-72.

Simko M, Mattsson MO. 2004. Extremely low frequency electromagnetic fields as effectors of cellular responses in vitro: possible immune cell activation. *J Cell Biochem*. 93(1):83-92.

Stewart JR. 1979. The electrostatic and electromagnetic effects of A.C. transmission Lines. IEEE., pp 4-10 .

Strother GK. 1980. Física aplicada a las ciencias de la salud. Mc Graw Hill.,pp. 312 .

Tabrah FL, Mower HF, Batkin S, Greenwood PB. 1994. Enhanced Mutagenic effect of a 60 Hz time-varying magnetic field on numbers of azide-induced TA1000 revertant colonies. *Bioelectromagnetics*., 15:85-93.

Takahashi K, Kaneko I, Date M, Fukada E. 1987. Influence of pulsing electromagnetic field on the frequency of sister-chromatid exchanges in cultured mammalian cells. *Experimentia*., 43:331-332.

Tenforde TS. 1991. ELF field interactions at the animal , tissue, and cellular Levels. *Electromagnetics in biology and medicine*., 39: 225-245.

Tipping DR, Chapman KE, Birley AJ, Anderson M. 1999. Observations on the effects of low frequency electromagnetic fields on cellular transcription in *Drosophila* larvae reared in field-free conditions. *Bioelectromagnetics* 20:2 129-130.

Tokalov SV, Gutzeit HO. 2004. Weak electromagnetic fields (50 Hz) elicit a stress response in human cells. *Environ Res*. 94:145-151.

Tomenius L, Hellstroem L, Enander B. 1982. Electrical constructions and 50 Hz magnetic field at the dwelling of tumor cases (0-18 years of ages) in the county of Stockholm - Proceedings of the International Symposium on Occupational Health and Safety in Mining and Tunneling ,Prague. p 117.

Tsuchiya K, Okuno K, Ano T, tanaka K, Takahashi H, Shoda M. 1999. High magnetic field enhances stationary phase-specific transcription activity of *Escherichia coli*. *Bioelectrochem. Bioenerg*., 48:2 383-387.

Tuinstra R, Goodman E, Greenbaum B. 1998. Protein kinase C activity following exposure to magnetic field and phorbol ester. *Bioelectromagnetics*., 19:8 469-476.

Ventura C, Maioli M, Pintus G, Gottardi G, Bersani F. 2000. ELF-pulsed magnetic fields modulate opioid peptide gene expression in myocardial cells. *Cardiovasc. Res*. 45: (4) 1054-1064.

Walther W, Wendt J, Stein U. 1997. Employment of the *mdr1* promoter for the chemotherapy-inducible expression of therapeutic genes in cancer gene therapy. *Gene Ther.* 4, 544-552

Walleczek J. 1992. Electromagnetic field effects on cells of the immune system: the role of calcium signaling. *FASEB J.* 6(13):3177-85.

Weisbrot DR, Uluc A, Henderson AS, Goodman R. 1993. Transcription in *Drosophila melanogaster* salivary gland cells is altered by exposure to low frequency electromagnetic fields: analysis of chromosomes 2R and 2L. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 31: 39-47.

Weisbrot D, Khorkova O, Henderson A, Goodman R. 1993. The effect of low frequency electric and magnetic fields on gene expression in *Sacharomyces cerevisiae*. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 31:167-177.

Wertheimer N, Leper E. 1979. Electrical wiring configurations and childhood Cancer. *Am. J. Epidemiol.*, 109:273-284.

Wood R. 1991. Magnetismo: De la brújula a los imanes superconductores. 1ª. Edición. McGraw-Hill. Capítulo 12 Biomagnetismo. pp 165-173.

WU R, Jiang H, HU G, FU Y, LU D. 2000. Cloning and identification of magnetic field-responsive genes in Daudi cells. *Chinese Science Bulletin.* 45(11) : 1006-1010.

Wright W, Peters JM, Mack TM. 1982. Leukemia in workers exposed to electrical and magnetic fields. *Lancet.* pp 1160-1161 .

Yen-Patton GPA, Patton WF, Beer DH, Jacobson BS. 1988. Endothelial response to electromagnetic fields: stimulation of growth rate and angiogenesis *in vitro*. *J. Cell. Physiol.*, 134:37-46.

APÉNDICES

ANEXO I

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

1) Agar LB

Agregar 32 g de agar LB por 1 litro de agua destilada

2) Caldo Broth LB

Agregar 20 g de caldo LB a 1 litro de agua destilada

Preparación de ampicilina a una concentración de 50 µg/ ml

Se mezclan 500 mg de ampicilina sodica con 10 ml bajo condiciones de absoluta esterilidad y posteriormente se forman alícuotas de 1 ml

Esta solución de penicilina esta lista para usarse agregando 10 µL por cada 100 ml de medio.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

- **TRIS BAS 1.0 M pH 8.0**

Se agregan 121.4 g de Tris base a 1000 ml de agua destilada y posteriormente se ajusta el pH a 8.0.

- **SOLUCION DYE**

Azul de bromofenol 0.1 %

Sacarosa 6 %

Fenol saturado con Tris pH 8.0

- **PREPARACION DE FENOL**

* En un tubo cónico se agregan 25 ml de fenol, el cual previamente se debe de haber licuado cuidadosamente a temperatura de hasta 68 °C hasta que todo el fenol este en fase liquida. Posteriormente se agregan 25 ml de Tris 1.0 M pH 8.0 y se mezcla de manera vigorosa.

* Se centrifuga a 2500 R.P.M. por 30 minutos y transcurrido este tiempo se elimina la fase superior, y la fase inferior se mezcla vigorosamente con buffer Tris 0.1 M.

* Se centrifuga nuevamente a 2500 R.P.M. por 30 minutos, se separa nuevamente la fase superior y se agregan 25 ml de buffer Tris 0.01 M.

* Se centrifuga a 2500 R.P.M. por 30 minutos, se elimina la fase superior y se mezcla nuevamente con buffer Tris 0.001 M., para posteriormente volver a centrifugar a 2500 R.P.M. por 30 minutos.

* Se elimina el sobrenadante y se le agregan 25 ml de fenol .001M (no se mezcla), el liquido resultante se pasa a un frasco de color ámbar, se agrega hidroxiquinoleina hasta dar una concentración final de 0.1 %, y finalmente se mantiene a 4 °C.

- **NaOH 1 N**

Se agregan 40 g de grageas de NaOH y se mezclan con 1000 ml de H₂O destilada.

- **NaOH 5 M**

Se agregan 200 g de grageas de NaOH y se mezclan con 1000 ml de H₂O destilada.

- **SOLUCIONES PARA MINIPREP**

a) **SOLUCION I:** Glucosa 50 mM
Tris-Cl 25 mM (pH 8.0)
EDTA 10 mM (pH 8.0)

La solución se prepara a un volumen final de 100 ml, se esteriliza por autoclave a 10 Lb de presión por 15 minutos y se mantiene a 4 °C.

b) **SOLUCION II:** NaOH 0.2 N
SDS 1 %

c) **SOLUCION III:** Acetato de potasio 5 M 60 mL
Acido acético glacial 11.5 mL
Agua destilada 28.5 mL

- **Tris-Cl 1 M**

Se agregan 157.64 g de Tris-Cl en 1000 ml de H₂O destilada estéril

- **Glucosa 500 mM**

Se mezclan 90.1 g de glucosa en 1000 ml de H₂O destilada estéril.

- **Acetato de potasio 5 M**

Se mezclan 490.7 g de Acetato de potasio en 1000 mL de H₂O destilada estéril

- **Acetato de amonio 2 M**

Se agregan 154.2 g de acetato de amonio a 1000 ml de H₂O destilada estéril y se ajusta el pH a 7.4.

- **Acetato de amonio 7.5 M**

Se agregan 578.25 g de acetato de amonio a 1000 ml de H₂O destilada estéril y se ajusta el pH a 7.6.

- **SDS al 20 %**

Se mezclan 2 g de SDS en polvo con 10 ml de H₂O destilada.

- **Buffer TAE 50X (Tris-acetato):**

Se mezclan 242 g de Tris base, posteriormente se agregan 57.1 mL de ácido acético glacial, después se agregan 100 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0 y se afora a 1000 mL con agua destilada estéril.

- **Buffer loading tipo III**

Azul de bromofenol al 0.25 % (0.25 g), se agrega xilen cianol 0.25 % (0.25g) y glicerol al 30 % (30 mL) y se agregan 70 mL de agua destilada estéril. Se mezcla bien y se mantiene a 4 °C.

ACRILAMIDA/BISACRILAMIDA

Se disuelven 38 g de acrilamida y 2 g de metilen-bis-acrilamida en agua destilada y se lleva a 100 ml de Vf.

BROMURO DE ETIDIO (solución)

Disolver 100 mg de bromuro de etidio en 10 ml de agua. Centrifugar y descartar el precipitado, tres veces. Conservar a 4 °C. **IMPORTANTE:** poderoso mutagénico, usar guantes descartables.

CINa 3M

Disolver 174,9 g de cloruro de sodio en agua destilada. Llevar a valor final de 1000 ml.

CLOROFORMO/ISOAMILICO

Mezclar 240 ml de cloroformo con 10 ml de alcohol isoamílico; agregar 1 volumen de agua destilada y agitar vigorosamente. Conservar en agua.

COLORANTE DESNATURALIZANTE

Mezclar 9,5 ml de formamida con 0,5 ml de agua y agregar una pizca de xilencianol y otra de azul de bromofenol. Agitar bien, centrifugar a 10000xg y descartar el precipitado.

COLORANTE NO DESNATURALIZANTE

Preparar una solución saturada de sacarosa en agua y agregar una pizca de xilencianol y otra de azul de bromofenol. Agitar bien, centrifugar a 10000xg y descartar el precipitado.

CTAB

Disolver 2 grs. de bromuro de cetil trimetil amonio en una solución constituida por 47 ml de CINa 3M, 10 ml de TRIS/CIH 1M pH: 7,5 y 40 ml de EDTA 0,5M pH: 8, calentando ligeramente para favorecer el proceso. Agregar 0,2 ml de mercaptoetanol y ajustar a 100 ml de volumen final.

EDTA 5%

Disolver 5 gramos de EDTA disódico en 80 ml. de agua destilada, ajustar a 100 ml de volumen final. Conservar a 4 °C.

EDTA 0,5M pH: 8

Disolver 186,1 gramos de EDTA disódico en 800 ml de agua destilada. Agregar lentejas de hidróxido de sodio hasta pH: 8, con agitación constante. Llevar a Vf: 1000 ml.

ETANOL/AMONIO

Disolver 12 mg de acetato de amonio en 100 ml de etanol absoluto. Conservar en heladera.

FOSFATO DE SODIO 0,5M pH 7,2

Disolver 137,5 g de fosfato disódico heptahidratado en 800 ml de agua destilada. Ajustar a pH 7,2 con ácido fosfórico. Llevar a Vf: 1000 ml.

SOLUCION PARA PCR

La solución debe contener 50 mM ClK, 10 mM tris/Cl (pH 8,3), 1,5-2,5 mM cloruro de magnesio, 1,0 uM de cada "primer" y 200 uM de cada dNTPs.

NaOH 1M

Disolver 40 g de hidróxido de sodio en lentejas en 1 litro de agua destilada.

SDS 10%

Disolver 100 g de dodecil sulfato de sodio en 900 ml de agua caliente. Ajustar a pH 7,2 por agregado de unas gotas de ácido clorhídrico concentrado. Llevar a Vf: 1000 ml.

Mezclar por agitación.

TINCION CON PLATA

Solución detenedora: Llevar 200 ml de ácido acético glacial a 2 lts. con agua destilada.

Solución de tinción: Disolver 1 gr de nitrato de plata en 2 lts. de agua destilada. Agregar 3 ml de formaldehído. Preparar en el día de uso.

Solución reveladora: Disolver 60 g de carbonato de sodio anhidro en 2 lts de agua destilada y enfriar en heladera. Inmediatamente antes del uso, agregar 3 ml de formaldehído y 400 ul de tiosulfato de sodio 10 mg/ml.

TRIS/ClH 1M pH: 7,5

Disolver 121,1 gramos de tris base en 800 ml de agua destilada. Ajustar a pH 7,5 por agregado de ácido clorhídrico concentrado. Llevar a Vf: 1000 ml.

ANEXO 2**RESUMEN CURRICULAR**

Abraham Octavio Rodríguez de la Fuente

Candidato para el Grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Microbiología

Tesis: CONSTRUCCIÓN DE UN PROMOTOR CONTENIENDO ELEMENTOS DE RESPUESTA A CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS Y SU UTILIZACIÓN PARA MANIPULAR LA EXPRESIÓN DE GENES TERAPÉUTICOS

Campo de Estudio: Ciencias Biológicas

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 16 de Junio de 1973, hijo de Octavio Rodríguez Zavala y Felicitas de la Fuente Lopez

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 1998, con el premio a la Excelencia Académica otorgado por la federación de Colegios Profesionales de Nuevo León A.C el 13 de diciembre de 1995. y premio a la mejor tesis de Licenciatura, además de haber obtenido el grado de Maestro en Ciencias con especialidad en microbiología en 1999.

Experiencia Profesional: maestro en el CONALEP durante 1997-2000, maestro de Licenciatura la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL desde el 2000 y Maestro de Postgrado desde Junio del 2005.

ANEXO 3

PUBLICACIONES REALIZADAS

Heredia-Rojas JA, Rodríguez-De La Fuente AO, del Roble Velazco-Campos M, Leal-Garza CH, Rodríguez-Flores LE, de La Fuente-Cortez B. 2001. Cytological effects of 60 Hz magnetic fields on human lymphocytes in vitro: sister-chromatid exchanges, cell kinetics and mitotic rate. *Bioelectromagnetics*. (3):145-9.

Heredia-Rojas JA, Caballero-Hernandez DE, Rodríguez-de la Fuente AO, Ramos-Alfano G, Rodríguez-Flores LE. 2004. Lack of alterations on meiotic chromosomes and morphological characteristics of male germ cells in mice exposed to a 60 Hz and 2.0 mT magnetic field. *Bioelectromagnetics*. 25(1):63-8.

Mancilla Rendón JA, Heredia -Rojas JA, Santoyo-Stephano MA, Castañeda Garza E, Rodríguez de la Fuente AO y Rodríguez-Flores L. 2004. Biofísica el Agua: las Estructuras Moleculares Metaestables y sus funciones. *Medicina Universitaria Volumen 6*, página S14-S15, ISSN 1665-5796

Garza Sáenz JA, Heredia -Rojas JA, Santoyo-Stephano MA, Castañeda Garza E, Rodríguez de la Fuente AO y Rodríguez-Flores L. Evaluación de Niveles de Radiación Electromagnética no ionizante en el Área Metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México. *Medicina Universitaria Volumen 6. Suplemento*, 2004 página S108-S109, ISSN 1665-5796

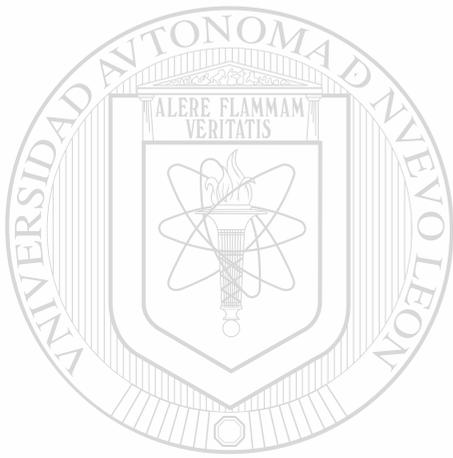
Arciniega de los Santos A, Heredia -Rojas JA, Santoyo-Stephano MA, Castañeda Garza E, Rodríguez de la Fuente AO y Rodríguez-Flores L. Efecto de Agua Electrónicamente Transferida con Fungizona sobre el Crecimiento de *Candida Albicans* in vitro. *Medicina Universitaria Volumen 6, Suplemento*, 2004 página S190, ISSN 1665-5796

Heredia-Rojas A, Rodríguez-Flores L, Santoyo-Stephano M, Castañeda-Garza E, Rodríguez-de la Fuente AO. 2003. Los Campos Electromagnéticos: ¿Un Problema de Salud Pública? *Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición. RESPYN*. Vol. 4 No. 1 Enero-Marzo 2003. Editorial: Facultad de Salud Pública y Nutrición, UANL. México.

Cayetano Torres A, Heredia-Rojas JA, Santoyo-Stephano MA, Castañeda Garza E, Rodríguez de la Fuente AO, Rodríguez Flores L Y Morales Vallarta M. 2003. Capacidad de la Molécula de Agua para Almacenar Oscilaciones Electromagnéticas de Metronidazol y Su Efecto en el Crecimiento de *Entamoeba Histolytica* in vitro. *Revista: Medicina Universitaria Volumen 5*. Editorial: ISSN: México.

Heredia Rojas JA, Castañeda Garza E, Santoyo Stephano MA, Rodríguez Flores, Rodríguez de la Fuente AO. 2003. Evaluación de la Calidad de Agua Producida en un Sistema Comercial Denominado "Pi-Mag Water System". *Revista: Medicina Universitaria. Volumen 5*. Editorial: ISSN: México

Rodriguez de la Fuente AO., Heredia Rojas JA, Alcocer Gonzales JM, Santoyo Stephano MA, Rodriguez Flores, Heredia Rojas JA. Influence of 60 Hz Magnetic Field on Growth and Differentiation of *Entamoeba invadens*.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

