

ISBN: 970-27-0770-6

ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO *in vitro* DE CÉLULAS L5178Y TRANSFECTADAS

Autores: César A. García Vázquez, Ramón Reynoso Orozco, Anne Santerre

Resumen

El cultivo de células se desarrollo a finales del siglo XIX, a partir del cultivo de tejidos y en el año de 1948 el grupo de Earle aisló células de la línea celular L. Los problemas fundamentales que se superaron fueron los relacionados con la asepsia y con la estandarización de las mezclas de nutrientes necesarias para el desarrollo óptimo de las células en el cultivo *in vitro*. c Actualmente la disponibilidad de antibióticos, los medios de composición definida, las instalaciones asépticas, los avances técnicos y la aparición de numerosas compañías de suministro de medios permiten que el cultivo celular sea una tecnología con reproducibilidad. Gracias a los avances ya citados es posible la obtención de líneas celulares puras, las cuales se definen como un tipo celular establecido *in vitro*¹.

La línea celular L5178Y fue derivada de un tumor tímico inducido en el modelo de ratón DBA/2 con metilcolantreno. Las células son viables para su desarrollo *in vitro* y ampliamente usadas en estudios de toxicidad y radiación² y ha sido muy importante para comprender el funcionamiento de los tumores y la respuesta inmunológica que se monta contra los mismos³.

La transformación genética o transfección es un proceso por medio del cual una célula acepta y expresa un nuevo fragmento de DNA, éste fragmento confiere a las células nuevas características que permiten su identificación. Existen las transfecciones por métodos bioquímicos, físicos y mediante virus. Por otro lado, se puede tomar con diferentes enfoques para transferir DNA a células eucariontes: una es la transfección transitoria donde se pretende obtener la expresión temporal de la secuencia de interés, por que no es necesario que el DNA se integre al genoma de la célula transfectada y la *transfección estable* o permanente que permite desarrollar clones de células que integran a su material genético la secuencia que se pretende expresar y desde donde dirige la síntesis de la proteína blanco⁴.

La Proteína Verde Fluorescente (PVF) fue descubierta por Shimomura y cols. en 1962 y es un polipéptido de 238 aminoácidos (Mr = 26,888) codificada por tres exones extendidos sobre 2.6 kb en el genoma de la medusa *Aequera victoria*. La PVF emite un color verde fluorescente característico. La proteína es estable a estados estresantes como: calor, pH extremo, desnaturalizantes químicos y aún después de la fijación con formaldehído⁵. En los últimos 10 años se ha convertido en una herramienta muy útil en Biología Molecular, dado

que mantiene su habilidad para fluorescer en organismos diferentes a *Aequera* y principalmente por que se expresa eficientemente en células eucariontes superiores y plantas

Para iniciar con éste tipo de investigaciones, nuestro grupo de trabajo ha realizado la transfección de las células L5178Y y ha obtenido 4 clonas con una adecuada expresión de la PVF. Es importante mencionar que cuando se trabaja *in vivo* con una línea de células tumorales transfectadas de manera estable, como en éste caso, es indispensable realizar estudios de evaluación de la respuesta en la bioquímica e inmunológica, que se inducen en los animales que han sido inoculados con dichas clonas de células. Principalmente para tomar como referencia los trabajos realizados con la línea madre no transfectada y que representan un gran acervo de información. Cabe mencionar que en este caso la transfección de la célula será de manera estable ya que es la que nos permite desarrollar clonas de células que integran a su material genético la secuencia que se pretende expresar y desde donde se dirige la síntesis de la proteína blanco.

El objetivo general de este proyecto es establecer las condiciones de crecimiento *in vitro* de células L5178Y, transfectadas mediante la inserción del gen que codifica para esta proteína a través del vector bacteriófago pEGFP-N1.

Bibliografía

- 1.- Cultivo celular: cultivo de células *in vitro*. Morgan, Darling. Línea celular: tipo celular establecido *in Vitro*. Morgan, Darling 1993.
- 2.- <http://www.biotech.ist.unige.it/cldb/cl3133.html>, consultado 29/09/05.
- 3.- Orozco-Barocio A., Zaitseva G., Chavez-Anaya A., Arceta Gonzalez I. V., Puebla-Perez A. M., Alfaro Bustamante F., Zimina IV., y Vitaly A. Modulation of immune response of BALB/c mice bearing lymphoma L5178Y treated with a bitter yellow Aloe vera (L) *in vivo*. Russian J of Immunol. 4: 44-50. 1999.
- 4.- Cramer A., Whitehorn E. A., Tate E. y Stemmer W. P. C. Improved Green Fluorescent Protein by molecular evolution using DNA shuffling. Nature Biotechnology. 14, 315-319. 1996.
- 5.- Inouye S. y Tsuji F. I. Aequorea green fluorescent protein expresión of the gen and fluorescence characteristics of the recombinant protein. FEBS Letters, 341:277-280. 1994.