

Trabajo Fin de Grado

**Métodos de transfección en macrófagos  
peritoneales de ratones ApoE K.O.**



Transfection methods  
in ApoE K.O. mice peritoneal macrophages

Autor:

**Andrei Mihai Stoian**

Director/es:

María Ángeles Navarro Ferrando

Luis Vicente Herrera Marcos

Facultad de Veterinaria

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Curso 2018 - 2019 – **Grado en Biotecnología**



## Índice

1. Resumen / Abstract.....	1
2. Introducción .....	2
2.1. Macrófagos.....	2
2.2. Marcadores de macrófagos: F4/80 y Cd68 .....	3
3. Objetivos .....	3
4. Materiales y métodos .....	4
4.1.1. Clonaje por recombinación: In-Fusion® HD Cloning Kit .....	4
4.1.1.1. Obtención del inserto: Región promotora de Cd68.....	5
4.1.1.1.1. Extracción de ADN genómico.....	5
4.1.1.1.2. Diseño de los cebadores .....	5
4.1.1.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa – PCR.....	5
4.1.1.1.4. Verificación, purificación y cuantificación del producto de PCR.....	6
4.1.1.2. Obtención del vector: Digestión de pLIVE.Pon3.luc para obtener pPon3.luc linearizado.....	6
4.1.1.2.1. Digestión parcial.....	6
4.1.1.2.2. Purificación en gel de agarosa y extracción del plásmido del gel.....	7
4.1.1.2.3. Cuantificación.....	7
4.1.1.3. Precipitación alcohólica de inserto y vector .....	7
4.1.1.4. Recombinación.....	8
4.1.2. Clonaje por ligación: TA Cloning™ Kit Dual Promoter con vector pCR™II.....	8
4.1.2.1. Obtención del inserto: Hot-start PCR.....	8
4.1.2.2. Ligación de pCR™II con la región promotora de <i>Cd68</i> .....	9
4.1.2.3. Construcción del plásmido pCd68.Pon3.luc.....	9
4.1. Clonaje de la región promotora de <i>Cd68</i> en pLIVE.Pon3.luc .....	4
4.2. Transformación de bacterias.....	9
4.2.1. Shock térmico.....	9
4.2.2. Análisis de las colonias recombinantes.....	10
4.2.2.1. Extracción cloroformo-fenol .....	10
4.2.2.2. Análisis coiled-supercoiled .....	10
4.2.2.3. Análisis de restricción.....	10
4.2.2.3.1. pCR™II.pCd68 .....	10
4.2.2.3.2. pCd68.Pon3.luc .....	11
4.2.3. Secuenciación.....	11
4.2.3.1. Miniprep.....	11
4.2.3.2. Secuenciación Sanger.....	11
4.3. Obtención y caracterización de macrófagos peritoneales de ratón .....	12
4.3.1. Obtención y siembra de los macrófagos.....	12
4.3.2. Caracterización por inmunofluorescencia .....	12
4.3.3. Electroporación: Transfección mediante un campo eléctrico .....	14
4.3.3. Estudio de la viabilidad celular.....	12
4.4. Transfección en macrófagos .....	13
4.4.1. Obtención de pCd68.Pon3.luc a gran escala mediante Maxiprep.....	13
4.4.2. Lipofección: Transfección mediante liposomas .....	13
4.4.4. Métodos de valoración de los macrófagos transfectados .....	15
4.4.4.1. Estudio de la actividad luciferasa .....	15
4.4.4.2. Estudio de la fosfatasa alcalina .....	15
4.4.4.3. Estudio de la fluorescencia.....	15
5. Resultados y discusión .....	15
5.1. Clonaje de la región promotora de <i>Cd68</i> en pLIVE.Pon3.luc .....	15
5.1.1.1. Obtención del inserto: Región promotora de Cd68.....	15
5.1.1.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa .....	16

5.1.1.1.3. Verificación, purificación y cuantificación del producto de PCR.....	16
5.1.1.2. Obtención del vector: Digestión de pLIVE.Pon3.luc para obtener pPon3.luc linearizado .....	16
5.1.1.2.1. Digestión parcial.....	16
5.1.1.2.2. Purificación en gel de agarosa .....	17
5.1.1.2.3. Cuantificación.....	17
5.1.1.3. Recombinación.....	17
5.1.2. Clonaje por ligación: TA Cloning™ Kit Dual Promoter con vector pCR™II.....	18
5.1.2.1. Obtención del inserto: Hot-start PCR.....	18
5.1.2.2. Ligación de pCR™II con la región promotora de <i>Cd68</i> .....	18
5.1.2.3. Construcción del plásmido pCd68.Pon3.luc.....	18
5.2. Transformación de bacterias.....	19
5.2.1.1. Análisis de las colonias recombinantes.....	19
5.2.1.2. Análisis de restricción.....	19
5.2.1.2.1. pCR™II.pCd68 .....	19
5.2.1.2.2. pCd68.Pon3.luc .....	19
5.2.2. Secuenciación.....	20
5.2.2.1. Miniprep.....	20
5.2.2.2. Secuenciación Sanger.....	20
5.3. Obtención y caracterización de macrófagos peritoneales de ratón .....	21
5.3.1. Obtención y siembra de los macrófagos.....	21
5.3.2. Caracterización por inmunofluorescencia .....	21
5.3.3. Estudio de la viabilidad celular.....	22
5.4. Transfección en macrófagos .....	22
5.4.1. Lipofección: Transfección mediante liposomas .....	22
5.4.2. Electroporación: Transfección mediante un campo eléctrico .....	23
6. Conclusiones.....	24
6. Conclusiones / Conclusions.....	24
7. Perspectivas futuras .....	24
8. Bibliografía .....	25

## Abreviaturas

**A:** Adenina

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNasa:** Nucleasa que cataliza la hidrólisis de ADN

**ADNg:** ADN genómico

**ApoE:** Apolipoproteína E

**ARNasa:** Nucleasa que cataliza la hidrólisis de ADN

**ATP:** Trifosfato de adenosina (del inglés *adenosine triphosphate*)

**BrEt:** Bromuro de etidio

**BSA:** Albúmina sérica bovina (*bovine serum albumin*)

**CIBA:** Centro investigación biomédica de Aragón

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono

**CMV:** Citomegalovirus

**ddH<sub>2</sub>O:** Agua destilada y desionizada

**DMEM:** Medio esencial Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

**dNTPs:** Desoxirribonucleótido trifosfato de adenina, timina, guanina y citosina

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**EtOH:** Etanol

**IL-10 / IL-12:** Interleucinas 10 y 12

**kb:** Kilobases

**kDa:** KiloDalton

**K.O.:** *Knockout*

**LB:** Medio Luria - Bertani

**LDL:** Lipoproteínas de baja densidad (*low density lipoproteins*)

**MgCl<sub>2</sub>:** Cloruro de magnesio

**MHC-II:** Complejo mayor de histocompatibilidad II (*major histocompatibility complex II*)

**MPM:** Marcador de peso molecular

**NaCl:** Cloruro de sodio

**NCBI:** Centro Nacional de Información Biotecnológica (*National Centre for Biotechnology Information*)

**nt:** Nucleótido

**pb:** Pares de bases

**PBS:** Tampón fosfato salino (*phosphate-buffer saline*)

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*)

**PON3/Pon3:** Paraoxonasa 3

**PrD:** Cebador directo (*direct primer*)

**PrR:** Cebador reverso (*reverse primer*)

**SDS:** Dodecilsulfato sódico

**SOC:** Medio de caldo superóptimo con represión por catabolito

**STE:** Cloruro de sodio-Tris-EDTA

**T:** Timina

**Taq ADN polimerasa:** Polimerasa de ADN de *Thermus aquaticus*

**TE:** Tris-EDTA

**Tm:** Temperatura de fusión de ADN (*melting temperature*)

### **Palabras clave**

Cd68, macrófagos peritoneales, transfección, lipofección, electroporación, sobreexpresión.

## 1. Resumen

Este estudio pretende lograr la expresión transitoria de genes en macrófagos peritoneales de ratones knockout para la apolipoproteína E (*ApoE*<sup>-</sup>) bajo la regulación de un promotor específico de macrófagos. Para ello se clonó en un plásmido la región promotora del gen *Cd68* murino, que codifica una glicoproteína específica de monocitos y macrófagos; seguido del gen *Pon3* murino, que codifica una proteína con actividad lactonasa y función antioxidante; y el gen reportero *luc* de la luciérnaga oriental, que codifica la proteína luciferasa.

El clonaje de la región promotora se abordó siguiendo dos estrategias distintas: una basada en la recombinación de secuencias homólogas y otra basada en la ligación de secuencias con extremos compatibles. Posteriormente se realizó la transfección de macrófagos peritoneales con el plásmido pCd68.Pon3.luc utilizando diferentes reactivos basados en dos métodos: transfección mediante liposomas o lipofección y transfección dirigida al núcleo mediante un campo eléctrico o electroporación.

La sobreexpresión del plásmido se comprobó mediante medición de la actividad luciferasa, fosfatasa alcalina y proteína verde fluorescente.

## Abstract

This study aims to achieve transient gene expression in apolipoprotein E knockout mice (*ApoE*<sup>-</sup>) peritoneal macrophages under the regulation of a specific macrophage promoter. To this end, the promoter region of the murine *Cd68* gene, which encodes a specific glycoprotein of monocytes and macrophages, was cloned into a plasmid followed by the murine *Pon3* gene, which encodes a protein with lactonase activity and antioxidant function; and the oriental firefly's reporter gene *luc*, which encodes the luciferase protein.

The cloning of the promoter region was approached following two different strategies: one based on the recombination of homologous sequences and the other based on the ligation of sequences with compatible ends. Subsequently, peritoneal macrophages were transfected with the plasmid pCd68.Pon3.luc using different reagents based on two methods: transfection by liposome or lipofection and transfection directed to the nucleus by means of an electric field or electroporation.

The overexpression of the plasmid was verified by measuring the luciferase, alkaline phosphatase and green fluorescent protein activities.

## **2. Introducción**

### **2.1. Macrófagos**

Los macrófagos son leucocitos mononucleares presentes en la mayoría de tejidos<sup>(1)</sup>. Su función principal es la fagocitosis, aunque también presentan capacidad secretora. Participan en procesos de remodelación de tejidos durante el crecimiento y en el mantenimiento de la homeostasis, fagocitando células muertas o apoptóticas y otros restos celulares, además de liberar factores de crecimiento, proteasas y otros productos<sup>(2,3)</sup>. Sin embargo, el papel más conocido de los macrófagos es el que cumplen en el desarrollo de la respuesta inmune.

Los macrófagos participan en la respuesta inmune innata gracias a su capacidad de fagocitar cuerpos extraños y patógenos y como productores de citoquinas. También participan en la respuesta inmune adaptativa como células presentadoras de antígenos procesados de bacterias y parásitos, ya que expresan en su membrana el MHC-II. Además, se ha descrito la participación de los macrófagos en cáncer, fibrosis y enfermedades inflamatorias como la aterosclerosis<sup>(4)</sup>.

Una característica importante de los macrófagos es su heterogeneidad. Dependiendo del tejido en el que se encuentran presentan fenotipos y perfiles de transcripción diferentes, e incluso reciben denominaciones distintas: células de Kupffer en el hígado, microglía en el sistema nervioso central, osteoclastos en el hueso, etc. Los macrófagos que se encuentran en tejidos adultos en reposo pueden tener dos orígenes distintos: derivan de la diferenciación de monocitos circulantes extravasados o se establecieron desde antes del nacimiento<sup>(5-7)</sup>.

En caso de lesión o infección, la mayoría de macrófagos provienen de la diferenciación de monocitos circulantes<sup>(8)</sup>. Los monocitos se generan en la médula ósea a partir de precursores llamados monoblastos, que a su vez provienen de células madre hematopoyéticas. Después, los monocitos pasan a circulación sanguínea donde permanecen hasta extravasarse a algún tejido en procesos inflamatorios, donde se diferencian a macrófagos o a células dendríticas.

Una vez activados, se puede agrupar a los macrófagos en dos grupos dependiendo de su fenotipo: M1 y M2<sup>(9,10)</sup>. Los macrófagos M1, también conocidos como macrófagos activados clásicos, tienen función proinflamatoria ya que secretan grandes cantidades de la citoquina IL-12. Los macrófagos M2 intervienen en procesos de reconstrucción de tejidos al participar en la angiogénesis y secretan citoquinas antiinflamatorias como IL-10. El fenotipo M2 es más heterogéneo e incluye varios subtipos, aunque no existe un consenso respecto a la clasificación de las distintas poblaciones. En general, en caso de herida, en las primeras fases del proceso de curación predominan macrófagos M1 y después, al reducirse la inflamación, macrófagos M2.

En este trabajo se va a trabajar con macrófagos peritoneales. El peritoneo es la membrana que reviste el interior de la cavidad abdominal. Se estructura en dos capas: una externa adherida a la pared de la cavidad abdominal (peritoneo parietal), y otra interna que envuelve el intestino delgado y otros órganos del abdomen (peritoneo visceral). El espacio entre ambas capas se denomina cavidad peritoneal y contiene una pequeña cantidad de fluido conocido como líquido peritoneal, rico en leucocitos. En ratón, se pueden aislar de 5 a 10 millones de células de esta cavidad, siendo 50-60% linfocitos B, 30-40% macrófagos y 5-10% linfocitos T<sup>(11)</sup>. Se ha elegido el peritoneo como lugar de extracción de macrófagos gracias a la facilidad del acceso y de la posterior recogida, y a los buenos rendimientos en cuanto al número de macrófagos que se obtienen por ratón. Gran parte de estos macrófagos se encuentran en un estado indiferenciado o naïve<sup>(11)</sup>, ya que no se han activado completamente a los fenotipos M1 o M2.



## 2.2. Marcadores de macrófagos: F4/80 y Cd68

Para caracterizar la población de células peritoneales y verificar la presencia de macrófagos, se escogieron los marcadores F4/80 y Cd68. Existen otros marcadores de macrófagos utilizados para caracterizar estas células. El uso de uno u otro dependerá de la población de macrófagos que se desee estudiar y del entorno en el que se encuentren. Esto se debe a que los macrófagos de distintos tejidos constituyen una población celular muy heterogénea en cuanto a su morfología, fenotipo, metabolismo, función y perfil transcripcional. Este hecho se podría asociar con funciones específicas de tejido; sin embargo, existen diferencias importantes incluso entre macrófagos que comparten un mismo microentorno<sup>(12)</sup>.

El homólogo murino de EMR1, F4/80, es un marcador de poblaciones de macrófagos murinos bien conocido y ampliamente utilizado desde el descubrimiento de un anticuerpo monoclonal frente a este receptor en 1981<sup>(13)</sup>. Sin embargo, F4/80 es expresado por otras células inmunes, como los eosinófilos, y no se expresa por igual en los distintos tipos de macrófagos. Este es el caso del peritoneo, donde se ha visto que los niveles de F4/80 expresados por los macrófagos peritoneales varían dependiendo de su diferenciación y estado de activación<sup>(14)</sup>. Se han descrito dos subtipos que presentan expresión diferencial de este receptor, siendo definidos como Macrófagos Peritoneales Grandes (LPM: Large Peritoneal Macrophage) los que expresan niveles altos de F4/80 y son morfológicamente de mayor tamaño; y Macrófagos Peritoneales Pequeños (SPM: Small Peritoneal Macrophage) los que expresan F4/80 en menor medida y son de un tamaño menor<sup>(14)</sup>.

CD68 es una proteína altamente glicosilada específica de monocitos y macrófagos considerada como un marcador citoquímico de monocitos y macrófagos en el análisis histoquímico de tejidos inflamados, tejidos tumorales y otras aplicaciones inmunohistopatológicas. La macrosialina (*Cd68*) es la variante murina de CD68. Se localiza intracelularmente, sobre todo en endosomas avanzados, aunque se ha visto que se puede expresar una pequeña cantidad de dicha proteína en la superficie celular<sup>(15)</sup>. Existen diferencias entre los niveles de glicosilación de Cd68 según la exposición previa a estímulos inflamatorios y la inducción de fagocitosis<sup>(16)</sup>.

En un estudio realizado con vectores lentivirales dirigidos a la terapia génica, se probaron cinco variantes de la región promotora de CD68 como promotores específicos de macrófagos: el promotor completo de CD68; la región proximal del promotor de CD68 de 343 pares de bases (pb); la región proximal de 150 pb del promotor de CD68; y un promotor sintético construido a partir de la fusión de factores de transcripción al minipromotor p47<sup>phox</sup>, en orientación directa y reversa observándose buenos niveles de expresión y especificidad<sup>(17)</sup>.

## 3. Objetivos

El objetivo principal es lograr la sobreexpresión génica transitoria en macrófagos peritoneales de ratones *ApoE* knockout. Para ello se deben alcanzar los siguientes objetivos:

- Amplificación de la región promotora de *Cd68* y clonaje sustituyendo el promotor pLIVE en el plásmido pLIVE.Pon3.luc.
- Transformación de bacterias competentes y selección de un clon que haya incorporado el plásmido ingenierizado pCd68.Pon3.luc.
- Obtención y caracterización de la población celular extraída del peritoneo mediante marcaje inmunofluorescente de CD68 y F4/80.

- Transfección de pCd68.Pon3.luc en macrófagos peritoneales de ratones *ApoE* knockout.

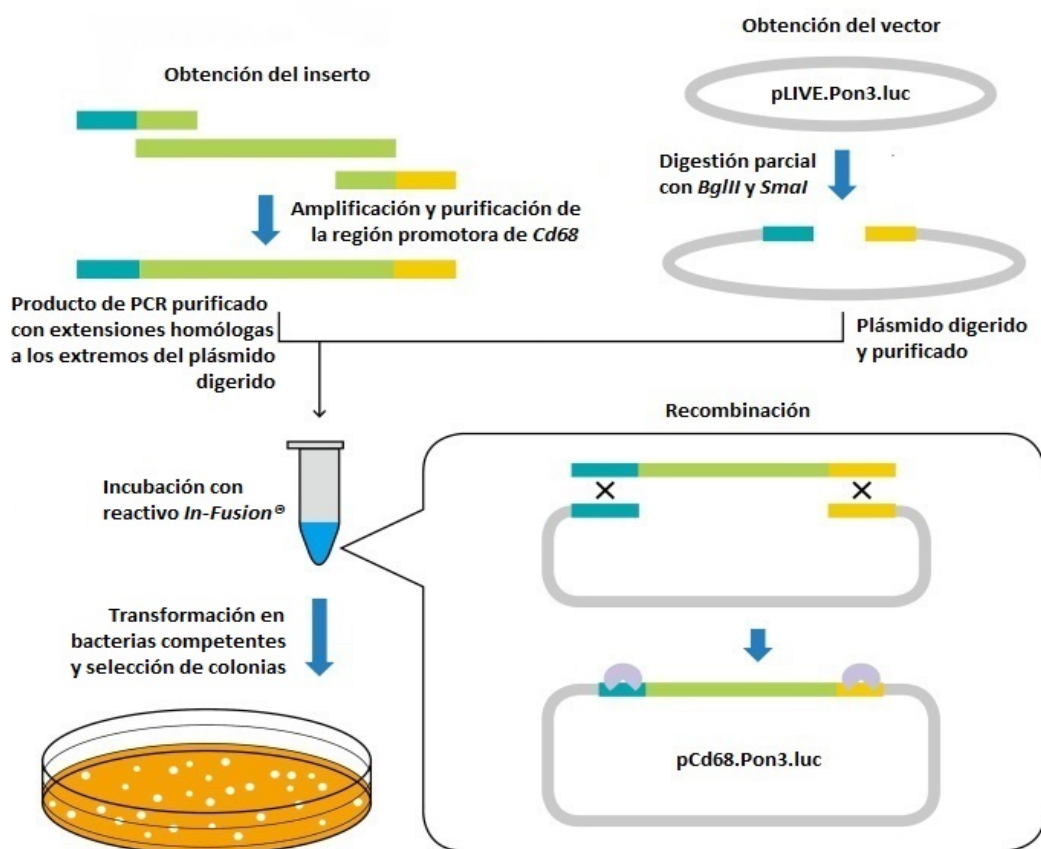
#### 4. Materiales y métodos

##### 4.1. Clonaje de la región promotora de *Cd68* en pLIVE.Pon3.luc

Se clonó la región promotora de *Cd68* (p*Cd68*) en el plásmido pLIVE.Pon3.luc (anexo 9.1.1), sustituyendo al promotor pLIVE® de MirusBio (Madison, WI, USA) y generando el plásmido recombinante pCd68.Pon3.luc (anexo 9.1.2). Para ello se siguieron dos estrategias distintas: una basada en la recombinación de secuencias homólogas mediante el sistema *In-Fusion*® HD Cloning Kit de Takara Bio (Kusatsu, Prefectura de Shiga, Japón); y una basada en la ligación utilizando el sistema de clonajes intermedios *TA Cloning*™ Kit Dual Promoter de ThermoFisher™ Scientific (Waltham, MA, USA).

##### 4.1.1. Clonaje por recombinación: *In-Fusion*® HD Cloning Kit

El método *In-Fusion*® HD Cloning Kit de Takara Bio permite el clonaje independiente de ligasa de productos de PCR en vectores linealizados. Este sistema se basa en una recombinasa que reconoce secuencias homólogas en los extremos del inserto (en este caso la región promotora de *Cd68*) y del vector (el plásmido pLIVE.Pon3.luc digerido con *Bgl*III y *Sma*I). Esta enzima lleva a cabo la recombinación de las secuencias homólogas generando un vector circular que contendrá el inserto.



**Figura 1.** Esquema de clonaje por recombinación de la región promotora de *Cd68* (p*Cd68*) en el plásmido pLIVE.Pon3.luc mediante el método *In-Fusion*® HD Cloning Kit, para generar el plásmido pCd68.Pon3.luc.

### Obtención del inserto: Región promotora de Cd68

Se extrajo el ADN genómico de una muestra de tejido de ratón (*Mus musculus*) y se obtuvo la secuencia de la región promotora del gen *Cd68* mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

#### 4.1.1.1. 4.1.1.1.1. Extracción de ADN genómico

Se homogeneizaron 100 mg de hígado de ratón con 1 mL de tampón de lisis (Tris – HCl 10 mM pH 7,4, EDTA 0,01 M, NaCl 0,15 M, SDS 10%) y 15 µL de proteinasa K (20 mg/mL) de Promega® (Madison, WI, USA). Se incubó la mezcla durante 4 horas a 56 °C con agitación continua y después se centrifugó a 13000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se recolectó el sobrenadante y se añadió 1 mL de etanol absoluto a -20 °C mezclando por inversión varias veces y se dejó en reposo en hielo por 20 minutos.

Se recogió el ADN con una pipeta pasteur y se transfirió a un tubo eppendorf con 200 µL de etanol al 70%. Posteriormente, se centrifugó a 12000 g y 4 °C durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se eliminaron los residuos de etanol por inversión del tubo sobre papel secante. Finalmente, se resuspendió el precipitado en 250 µL de tampón TE (Tris – HCl 10 mM, pH 8,0 con EDTA 1 mM, pH 8,0).

El ADN extraído se almacenó el ADN a -20 °C.

#### 4.1.1.1.2. Diseño de los cebadores

Los cebadores deben cumplir dos funciones: garantizar una PCR específica que permita la amplificación de la región promotora de *Cd68*; y permitir la recombinación del plásmido y el inserto.

A partir de las secuencias conocidas del plásmido pLIVE.Pon3.luc y de la región promotora de *Cd68*, se diseñó el segmento de los oligos destinado a la PCR teniendo en cuenta que el contenido en G+C debe encontrarse entre el 40% y el 60%, evitando  $T_m$  muy diferentes y con una longitud entre 18 y 25 nucleótidos (nt) con G o C en 3'. El segmento destinado a la reacción de recombinación se diseñó como una cola de 16 nt homóloga al punto de corte de *BglII* downstream del promotor pLIVE para los cebadores directos, y una cola de 18 nt homóloga al punto de corte de *SmaI* upstream de pLIVE en los cebadores reversos.

De esta manera, el cebador directo (PrD) presenta en su extremo 5' 16 nt en común con el plásmido pLIVE.Pon3.luc, y en su extremo 3' cuenta con 22 nt específicos del promotor *Cd68*. El cebador reverso (PrR) presenta en su extremo 5' 18 nt comunes al plásmido pLIVE.Pon3.luc además de 18 nt específicos del promotor de *Cd68* en su extremo 3'. Estos cebadores se encargaron a la casa ThermoFisher™ Scientific.

Se diseñaron y encargaron otras dos parejas de cebadores variando la secuencia de la región 3'. Las secuencias de los cebadores se encuentran en el anexo 9.2.

#### 4.1.1.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa – PCR

Se amplificó la región promotora de *Cd68* siguiendo el protocolo de *Clone AmpHiFi PCR premix de In-Fusion® HD Cloning Kit* de Takara Bio. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 20 µL y se incubó en el termociclador S1000™ ThermalCycler de BioRad Laboratories (Hercules, CA, USA).

El protocolo seguido fue el siguiente:

Reacción PCR		Programa termociclador	
ADNg (41 ng/μL)	1 μL	Iniciación	95 °C – 5 minutos
PrD (5 μM)	1,2 μL	1. Desnaturalización	98 °C – 10 segundos
PrR (5 μM)	1,2 μL	2. Hibridación	60 °C – 15 segundos
Clone AmpHifi PCR Premix 2x	10 μL	3. Extensión	72 °C – 7 segundos
ddH <sub>2</sub> O	6,6 μL	Extensión final	72 °C – 30 segundos

**Figura 2.** Protocolo seguido para la realización de la PCR. Se realizaron 35 ciclos de los pasos 1, 2 y 3.

#### 4.1.1.1.4. Verificación, purificación y cuantificación del producto de PCR

Para verificar la amplificación de la región promotora de *Cd68* se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% con BrEt al 0,004%. Se cargaron 250 ng del marcador de peso molecular de 1kb de ThermoFisher™ Scientific, y 2 μL de producto de PCR junto con 1 μL de *Loading buffer* 6x y 3 μL de agua destilada y desionizada (ddH<sub>2</sub>O). La electroforesis se llevó a cabo a 90V durante 30 minutos. Se valoró el resultado en un transiluminador con el sistema Gel Doc XR System.

A continuación, se purificó el producto de PCR siguiendo el protocolo *GeneJET PCR Purification Kit* de ThermoFisher™ Scientific, que elimina cebadores, nucleótidos sin incorporar, enzimas y sales procedentes de PCR.

Por último, se cuantificó el producto de PCR mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% junto a 250 ng de marcador de peso molecular de 1 kb pb de ThermoFisher™ Scientific. Con la ayuda del programa *Quantity One 1-D Analysis* de BioRad Laboratories se analizó la banda resultante y, comparándola con las bandas del marcador de peso molecular cuya cantidad de ADN se conoce, se calculó la concentración del producto purificado.

El material amplificado se almacenó a -20 °C.

#### 4.1.1.2.

#### Obtención del vector: Digestión de pLIVE.Pon3.luc para obtener pPon3.luc linealizado

##### 4.1.1.2.1. Digestión parcial

La secuencia del promotor pLIVE del plásmido pLIVE.Pon3.luc está flanqueada por un sitio de corte de *BglII* en su región 5' y por un sitio de corte de *SmaI* en su región 3'. El sitio de corte de *SmaI* es único; sin embargo, *BglII* realiza otro corte en el plásmido, por lo que se decidió realizar una digestión parcial.

Al digerir con *BglII* y *SmaI* el plásmido pLIVE.Pon3.luc aparecerán fragmentos de distinta longitud dependiendo del número de cortes realizado por las enzimas:

Nº de cortes realizados por <i>SmaI</i>	Nº de cortes realizados por <i>BglII</i>	Tamaño de los fragmentos originados (kb)		
1	0	7,7		
1	1 (extremo 5' de LIVE)	0,9	6,8	
1	1 (extremo 3' de Pon3)	1,1	6,6	
1	2	0,9	1,1	5,7
0	2	2		5,7

**Figura 3.** Fragmentos originados en la digestión de pLIVE.Pon3.luc con *BglII* y *SmaI*.

Se probaron distintas concentraciones de *SmaI* y *BglII* y distintos tiempos de incubación para favorecer la obtención del fragmento de 6812 pb kb correspondiente al plásmido pLIVE.Pon3.luc al que se le ha eliminado el promotor pLIVE. La digestión se realizó en el termociclador S1000™ ThermalCycler de BioRad. Tanto las enzimas utilizadas como el tampón fueron adquiridos a Fermentas de ThermoFisher™ Scientific.

#### 4.1.1.2.2. Purificación en gel de agarosa y extracción del plásmido del gel

Se llevó a cabo una electroforesis en el gel de agarosa al 0,8% y BrEt al 0,004% con el producto digerido, que se realizó a 30V durante 24 horas para asegurar una correcta separación. Se usaron 250 ng de marcador de peso molecular de 1 kb de ThermoFisher™ Scientific.

Se procedió a recortar con bisturí la banda con el peso molecular esperado para el fragmento deseado (6,8 kb). Se extrajo del gel siguiendo el protocolo *GeneJET Gel Extraction kit* de ThermoFisher™ Scientific.

Dado que los fragmentos de 6,8 y de 6,6 kb tienen un tamaño parecido y para asegurar una correcta purificación sin trazas del fragmento no deseado, se llevó a cabo una segunda electroforesis en gel de agarosa al 0,8% con el producto extraído. Se recortó la banda de 6,8 kb y se extrajo del gel siguiendo el protocolo anteriormente mencionado.

#### 4.1.1.2.3. Cuantificación

El producto de esta segunda extracción se cuantificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Se usaron 250 ng de marcador de peso molecular de 1 kb de ThermoFisher™ Scientific y se analizó el gel con el programa *Quantity One 1-D Analysis Software* de BioRad Laboratories como se hizo con el producto de la PCR en el apartado 4.1.1.1.4.

El plásmido digerido se almacenó a -20 °C.

4.1.1.3.

#### Precipitación alcohólica de inserto y vector

Una vez conocidas las concentraciones de inserto y plásmido, se precipitaron para concentrarlos y optimizar los volúmenes de reacción.

Se mezclaron 210 ng del plásmido y 25 ng del inserto, quedando así a concentración equimolar. A continuación, se añadió una décima parte del volumen de NaCl 5 M, para aumentar la salinidad y neutralizar las cargas negativas de los ácidos nucleicos, disminuyendo así su solubilidad. Después se añadió un volumen de isopropanol igual al volumen de la solución anterior. El isopropanol atrapa moléculas de agua, facilitando la precipitación del ADN. Las proporciones finales de disolución de ADN, NaCl 5 M e isopropanol fueron de 10:1:11, respectivamente.

La solución se incubó durante 15 minutos a -80 °C y seguidamente se centrifugó 15 minutos a 15000 g y una temperatura de 4 °C. El ADN precipita en presencia del alcohol en este medio de alta salinidad. El sobrenadante se retiró y el pellet se lavó tres veces con EtOH al 75%. Finalmente se secó el pellet con el Speedvac Eppendorf Concentrator 5301.

El pellet obtenido se resuspendió en 4 µL de ddH<sub>2</sub>O y se almacenó en nevera durante 24 horas para asegurar la completa hidratación del ADN.

## Recombinación

Siguiendo el protocolo de clonaje *In-Fusion HD Cloning Kit* de Takara Bio, a los 4  $\mu\text{L}$  de plásmido e inserto concentrados se les añadió 1  $\mu\text{L}$  de *In-Fusion Enzyme Premix 5x*. Se incubó la mezcla a 50 °C durante 30 minutos en el termociclador S1000™ ThermalCycler de BioRad.

Se comprobó si la reacción de recombinación se llevó a cabo de forma correcta mediante una electroforesis a 90V durante 50 minutos en gel de agarosa al 1%.

### **4.1.2. Clonaje por ligación: TA Cloning™ Kit Dual Promoter con vector pCR™II**

El método *TA Cloning™ Kit Dual Promoter* con vector pCR™II (anexo 9.1.3) de ThermoFisher Scientific permite el clonaje en un paso de productos de PCR amplificados con polimerasa *Taq*. Esta polimerasa produce secuencias de ADN que poseen una adenina terminal no apareada en sus extremos 3'. El vector pCR™II proporcionado con el kit se encuentra linealizado y presenta una timina protuberante en sus extremos 3'. La complementariedad de los residuos de adenina del inserto y de los residuos de timina del vector permite una eficiente ligación.

Se clonó la región promotora de *Cd68* en el plásmido pCR™II originando el plásmido pCR™II.pCd68 (anexo 9.1.4). Se transformaron bacterias con este plásmido y se caracterizaron las colonias resultantes. Una vez elegida una con el plásmido de interés mediante los métodos descritos en la sección 4.2.2., se extrajo el plásmido mediante una miniprep. Este clonaje intermedio permitió digerir el inserto con las mismas enzimas de restricción usadas en la digestión parcial de pLIVE.Pon3.luc, originando extremos compatibles para su posterior ligación.

#### 4.1.2.1.

#### Obtención del inserto: Hot-start PCR

Partiendo de una muestra de ADN genómico de *Mus musculus*, se amplificó la región promotora de *Cd68* mediante una Hot-start PCR utilizando una polimerasa *Taq* y los cebadores diseñados en el apartado 4.1.1.1.2. Como se ha descrito, los cebadores contienen los sitios de restricción de *SmaI* y *BglII*. Se preparó un volumen de reacción de 20  $\mu\text{L}$  que se incubó en el termociclador S1000™ ThermalCycler de BioRad. El protocolo seguido fue el siguiente:

Reacción PCR		Programa termociclador	
ADNg (41 ng/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$	Iniciación	94 °C – 5 minutos
PrD/PrR (5 $\mu\text{M}$ )	0,5 / 0,85 / 1,2 $\mu\text{L}$	1. Desnaturalización	94 °C – 30 segundos
<i>Taq</i> polimerasa (2,5 U/ $\mu\text{L}$ )	0,125 $\mu\text{L}$	2. Hibridación	56,6 / 58,4 / 60,9 /
dNTPs (25 mM)	0,2 $\mu\text{L}$		62 °C – 30 segundos
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,6 $\mu\text{L}$	3. Extensión	72 °C – 30 segundos
ddH <sub>2</sub> O	Completar 20 $\mu\text{L}$	Extensión final	72 °C – 30 segundos

**Figura 4.** Protocolo seguido para la realización de la Hot-start PCR con ADN polimerasa *Taq*. Se probaron 3 concentraciones de cebadores y 4 temperaturas de hibridación o annealing diferentes. Se realizaron 3 ciclos de los pasos 1, 2 y 3.

Una vez transcurrida la PCR se limpió el producto siguiendo el protocolo de *GeneJET PCR Purification Kit* de ThermoFisher™ Scientific. Se cuantificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% de una décima parte de la muestra amplificada y analizando el gel con el programa *Quantity One 1-D Analysis Software* de BioRad Laboratories.

El material amplificado se almacenó a -20 °C.

### Ligación de pCR<sup>TM</sup>II con la región promotora de Cd68

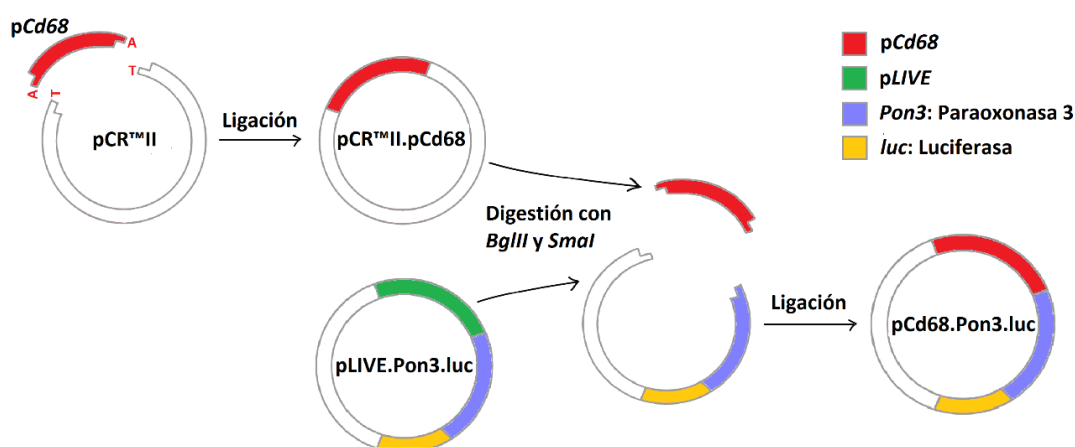
Se ligaron 100 ng de plásmido y 50 ng de producto de PCR, de modo que el inserto se encontrara en exceso. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 20 µL a los que se añadió 1 µL de enzima ligasa (1U/µL), 2 µL de tampón 10x y 11,5 µL de ddH<sub>2</sub>O para completar el volumen. Se incubó a temperatura ambiente durante 24 horas, originando el plásmido pCR<sup>TM</sup>II.pCd68.

4.1.2.2.

### Construcción del plásmido pCd68.Pon3.luc

Tras obtener una cantidad adecuada de pCR<sup>TM</sup>II.pCd68 mediante una miniprep, procedimiento descrito en el apartado 4.2.3.1, se digirió este plásmido con *Bgl*III y *Sma*I, originando el inserto correspondiente a la región promotora de *Cd68*. Se realizó una digestión parcial de pLIVE.Pon3.luc como se describió en el apartado 4.1.1.2.1, originando el plásmido linearizado sin promotor. Ambos fragmentos se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se extrajeron utilizando el kit *GeneJET Gel Extraction kit* de ThermoFisher<sup>TM</sup> Scientific. Se cuantificaron mediante una electroforesis en gel de agarosa y analizando el gel con el programa *Quantity One 1-D Analysis Software* de BioRad Laboratories como se ha descrito.

Se ligaron 100 ng del plásmido pLIVE.Pon3.luc digerido y 60 ng de inserto de forma que el inserto se encontrara en exceso. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 20 µL a los que se añadió 1 µL de enzima ligasa (1U/µL), 2 µL de tampón 10x y se completó el volumen con ddH<sub>2</sub>O. Se incubó a temperatura ambiente durante 24 horas, originando el plásmido pCd68.Pon3.luc.



**Figura 5.** Esquema de clonaje de la región promotora de *Cd68* (pCd68) en el plásmido pLIVE.Pon3.luc mediante ligación de extremos compatibles, con clonaje intermedio de pCd68 en pCR<sup>TM</sup>II por ligación de colas de adenina y timina.

## 4.2. Transformación de bacterias

### 4.2.1. Shock térmico

Se siguió el protocolo de Stellar<sup>TM</sup> Competent Cells PT5055-2 de Clontech, que emplea una cepa de *E. Coli* HST08 con elevada eficiencia de transformación.

Primero se descongeló la alícuota comercial en hielo y se tomaron 50 µL de células a los que se añadieron 100 ng del producto de la ligación, tanto para el caso de pCR<sup>TM</sup>II.pCd68 como para el caso de pCd68.Pon3.luc. A continuación, la mezcla se incubó durante 30 minutos en hielo, removiendo la alícuota suavemente cada 5 minutos.

Posteriormente, se sometieron las bacterias a shock térmico en un baño termostatzado a 42 °C durante 45 segundos para permeabilizar sus membranas permitiendo la internalización del plásmido. Pasado este tiempo, las células se devolvieron rápidamente a hielo donde se incubaron 2 minutos. Por último, se añadieron 250 µL de medio SOC para recuperar las células del estrés sufrido y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos en agitación.

Tanto las bacterias transformadas con el plásmido pCR™II.pCd68, como las transformadas con pCd68.Pon3.luc se sembraron en dos placas de LB agar a dos concentraciones logarítmicas distintas utilizando el asa de Driglasky. El primer plásmido en placas con ampicilina (50 µg/mL) y el segundo en placas con kanamicina (50 µg/mL). En ambos casos las placas se incubaron durante 24 horas en estufa a 37 °C.

Al día siguiente se seleccionaron varias colonias para estudiar y se les hizo un duplicado de seguridad en otra placa de LB agar con el antibiótico adecuado. Se incubaron a 37 °C hasta el día siguiente.

#### **4.2.2. Análisis de las colonias recombinantes**

##### Extracción cloroformo-fenol

Se realizó la extracción del ADN de las colonias seleccionadas mediante una bifase cloroformo-fenol con alcohol isoamílico en una proporción 24:25:1 respectivamente.

Se resuspendió la colonia a estudiar en 45 µL de medio STE (Cloruro de sodio 100 mM, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8), a los que se le añadieron 30 µL de la solución cloroformo-fenol-alcohol isoamílico. A continuación, la mezcla se vorteoó para lisar las bacterias y se centrifugó 10 minutos a 12000 g. Esto provocó la formación de dos fases: los ácidos nucleicos quedaron en la fase polar superior, en la interfase proteínas y en la fase apolar inferior lípidos y otros restos celulares.

Se tomaron 25 µL de la fase superior sobre los que se añadió 1 µL de ARNasa libre de ADNasas a una concentración de 200 µg/mL. La solución se incubó a 55 °C durante 30 minutos.

4.2.2.2.

##### Análisis coiled-supercoiled

El ADN plasmídico puede existir en tres conformaciones: súper enrollado (*supercoiled*), circular abierto (*open-circular*) y lineal. In vivo, el ADN plasmídico presenta forma superenrollada, pero in vitro pueden aparecer otras formas.

Se analizó el material genético extraído mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% durante 30 minutos a 90V. Se cargaron 250 ng del marcador de peso molecular de 1 kb de ThermoFisher™ Scientific.

##### Análisis de restricción

###### 4.2.2.3.1. pCR™II.pCd68

Se realizó un análisis mediante enzimas de restricción del ADN extraído usando la enzima *EcoRI*, la cual realiza dos cortes en la región de clonaje del plásmido pCR™II. En caso de no haber incorporado el inserto, se observaría un fragmento de 4 kb correspondiente al plásmido linearizado. En los plásmidos que incorporasen el inserto se observarían dos bandas: una de 0,85 kb correspondiente al inserto y otra de 4 kb correspondiente al plásmido linearizado.



Se digirieron 5 µL de ADN extraído con 1 U de *EcoRI* y el tampón correspondiente, completando la reacción hasta 20 µL con agua. Se incubó la mezcla a 37 °C durante 1 hora. Por último, se evaluaron las muestras mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% a 90V durante 1 hora, cargando 5 µL de la muestra digerida junto a 1 µL de Loading buffer 6x. Como marcador de peso molecular se usaron 250 ng del marcador de peso molecular de 1 kb de ThermoFisher™.

#### 4.2.2.3.2. pCd68.Pon3.luc

Se realizaron tres digestiones:

- Digestión con *BsrGI*: Realiza un único corte en el plásmido recombinante pCD68.Pon3.luc, originando así un fragmento de 7,6 kb. En el caso del plásmido pLIVE.Pon3.luc se originarían dos fragmentos, uno de 1,2 kb y otro de 5,2 kb. En caso de que el plásmido digerido se hubiese recircularizado sin incorporar inserto, se originaría un único fragmento de 6,8 kb.

- Digestión con *BglII*: Realiza dos cortes en el plásmido recombinante, originando un fragmento de 1,9 kb y uno de 5,7 kb. En el caso del plásmido pLIVE.Pon3.luc se originarían dos fragmentos, uno de 2 kb y otro de 5,7 kb. En caso de que el plásmido digerido se hubiese recircularizado sin incorporar inserto también se originarían dos fragmentos, uno de 1 kb y otro de 5,7 kb.

- Digestión con *XmiI* y *SmaI*: Se generan dos fragmentos en el plásmido recombinante, uno de 600 pb y otro de 7030 pb. En el caso del plásmido original se originarían dos fragmentos, uno de 8 pb y otro de 7,7 kb. El fragmento de 8 pb es muy pequeño, por lo que solo se observará un fragmento de 7,7 kb. En caso de que el plásmido se hubiera recircularizado sin incorporar inserto se originaría un único fragmento de 6,8 kb.

Se usó el tampón adecuado en cada caso y se incubaron las muestras a 37 °C durante 1 hora. Por último, se evaluaron las muestras digeridas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% a 90 V durante una hora con 250 ng del marcador de peso molecular de 1 kb de ThermoFisher™.

### 4.2.3. Secuenciación

4.2.3.1.

#### Miniprep

Una vez seleccionada una colonia que hubiera incorporado el vector adecuado, pCR™II.pCd68 o pCd68.Pon3.luc dependiendo del caso, se procedió a la extracción del plásmido mediante una miniprep. Se preparó un cultivo bacteriano de la colonia seleccionada en 10 mL de LB agar con ampicilina o kanamicina a 50 µg/mL, que se dejó incubar durante 24 horas a 37 °C en agitación.

Antes de extraer el ADN plasmídico se traspasaron 850 µL de este cultivo a un criotubo y se les añadió 150 µL de glicerol puro. Se mezcló y se guardó a - 80 °C. El resto del cultivo se purificó utilizando el kit comercial *ZymoPURE™ Plasmid Miniprep* de Zymo Research (Irvine, CA, USA). Por último, se midió la concentración y la pureza de este ADN plasmídico utilizando el dispositivo NanoDrop ND – 1000 Spectrophotometer.

#### Secuenciación Sanger

Se prepararon 12 µL de ADN plasmídico a 100 ng/µL que se mandaron al servicio de secuenciación del CIBA – Centro de Investigación Biomédica de Aragón. Para secuenciar pCR™II.pCd68 se enviaron las secuencias del cebador universal (-21) y el cebador reverso usado en la Hot-start PCR. En el caso de pCd68.Pon3.luc se enviaron las secuencias del cebador directo usado en la PCR y un cebador de Pon3. Los cebadores enviados tenían una concentración de 5mM. Las secuencias de los cebadores se encuentran en el anexo 9.4.

### **4.3. Obtención y caracterización de macrófagos peritoneales de ratón**

#### **4.3.1. Obtención y siembra de los macrófagos**

Para obtener los macrófagos se preparó en condiciones estériles una solución de recogida de tampón fosfato salino (PBS) con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de Penicilina – Estreptomicina. Dicha solución se inyectó en el peritoneo de ratones eutanasiados por sofocación en una cámara de CO<sub>2</sub>, a una razón de 5 mL/ratón. Tras masajear el peritoneo para asegurar una alta transferencia de células peritoneales al medio de recogida, se extrajo la mayor cantidad posible de líquido con ayuda de una pipeta y se depositó en un tubo estéril. Estos tubos se mantuvieron en hielo picado hasta llegar al laboratorio.

Se centrifugó el medio recogido a 400 g durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células peritoneales en 3 mL de medio DMEM y Ham's F-12 (1:1) con Penicilina – Estreptomicina al 1%. Después se midió la densidad celular mediante en un contador celular Countess™ II FL Automated Cell Counter de ThermoFisher™ Scientific. Se sembraron las células a razón de  $2,5 \cdot 10^6$  células/cm<sup>2</sup>, teniendo en cuenta que de acuerdo a la literatura<sup>(11)</sup> aproximadamente la mitad de las células contadas corresponden a macrófagos.

Se dejaron incubar 2 horas para permitir la adhesión de los macrófagos, se aspiró el medio y se lavó dos veces con PBS para eliminar las células no adheridas. Después se añadió el medio de mantenimiento (Ham's F-12 – DMEM 1:1 con Penicilina – Estreptomicina al 1%).

#### **4.3.2. Caracterización por inmunofluorescencia**

Para cerciorarse de que la población celular extraída y purificada del peritoneo estaba compuesta por macrófagos, se detectó la expresión de CD68 y F4/80 mediante inmunofluorescencia. Una vez adheridas las células a la placa, se retiró el medio y se lavó con PBS dos veces. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente y se permeabilizaron en caso de ser necesario con 0,1% de Tritón X-100 en PBS durante 15 minutos. Posteriormente se bloquearon las reacciones inespecíficas incubando las células durante 30 minutos con un tampón PBS con albúmina de suero bovino (BSA) al 5%. Transcurrido este tiempo, se incubaron las células durante 1 hora con los anticuerpos primarios acoplados a un fluorocromo, CD68 - Alexa Fluor 488 para el caso de CD68 y APC para F4/80, adquiridos a ThermoFisher™ Scientific y diluidos 1/200 en PBS con 1% BSA y 0,1% de Tritón X-100.

Tras realizar dos lavados con 0,1% de Tritón X-100 en PBS, se realizó la tinción de los núcleos con Hoescht diluido 1/5000 durante 5 minutos. Las imágenes se capturaron con el microscopio de fluorescencia FLoid Cell Imaging Station de ThermoFisher™ Scientific.

#### **4.3.3. Estudio de la viabilidad celular**

Se estudió la viabilidad de los macrófagos en las condiciones experimentales mediante tinción con azul de tripán. El azul de tripán es un colorante que permite discernir entre células vivas y muertas. Las células vivas tienen la membrana celular intacta, por lo que no incorporan el colorante; sin embargo, las células muertas con una membrana dañada son permeables, por lo que se teñirán. Por lo tanto, las células muertas aparecen de un distintivo color azul bajo el microscopio.

#### 4.4. Transfección en macrófagos

##### 4.4.1. Obtención de pCd68.Pon3.luc a gran escala mediante Maxiprep

Para obtener una gran cantidad de pCd68.Pon3.luc con el que realizar las transfecciones se siguió el protocolo del kit para purificación de ADN *EndoFree Plasmid Purification Maxiprep* de QIAGEN® (Hilden, Alemania).

##### 4.4.2. Lipofección: Transfección mediante liposomas

Se probaron distintos kits comerciales basados en la captación de ADN introducido en liposomas o lipofección. Estos kits contienen distintas soluciones de carácter lipídico que forman complejos con el ADN plasmídico y permiten su internalización por endocitosis en células animales y su posterior expresión.

Se probaron los kits:

**FuGENE® HD Transfection Reagent** de Promega, **EndoFectin™ Transfection Reagent** de GeneCopoeia™ (Rockville, MD, USA), **Lipofectamine® 3000 Reagent** de ThermoFisher™ Scientific, **TRANSFECTOSOME** de Nanovex Biotechnologies S.L (Parque tecnológico de Asturias, España) y **TransIT®-Lt1 Transfection Reagent** de MirusBio.

El protocolo seguido fue el siguiente:

Primero se incubó el ADN plasmídico con la solución proporcionada por el kit. Para un pocillo de 0,29 cm<sup>2</sup> de una placa de 96 pocillos con una densidad celular de 1,25 · 10<sup>6</sup> macrófagos/cm<sup>2</sup> y un volumen de 100 µL de medio de cultivo por pocillo, la incubación se llevó a cabo en un volumen de 10 µL del medio de cultivo utilizado en el pocillo. Esta solución se añadió a cada pocillo, alcanzando un volumen total de 110 µL. Una vez añadida la mezcla de transfección, se incubaron las células durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera húmeda, conteniendo un 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido ese tiempo se valoró la tasa de transfección.

Para intentar alcanzar una transfección eficaz se variaron los protocolos probando distintas concentraciones de reactivos y ADN plasmídico (Figura 6), así como distintos medios de cultivo surgidos de la combinación de los medios Opti-MEM®, DMEM y Ham's F-12.

Kit comercial	ADN por pocillo (µg)	Reactivo por pocillo (µL)	
<b>FuGENE® HD</b>	0,1	0,3	
	0,1	0,4	
<b>EndoFectin™</b>	0,1	0,2	
	0,1	0,3	
<b>Lipofectamine® 3000</b>	0,1	P3000: 0,2	L3000: 0,15
	0,1	P3000: 0,2	L3000: 0,3
<b>TRANSFECTOSOME</b>	0,1	0,2	
	0,1	0,3	
<b>TransIT®-Lt1</b>	0,1	0,3	

**Figura 6.** Condiciones experimentales ensayadas.

Para los experimentos de sobreexpresión génica mediante lipofección, además del plásmido diseñado en el presente trabajo, se utilizaron como control positivo dos plásmidos distintos que incluían genes reporteros bajo la regulación del promotor constitucional del citomegalovirus (pCMV):

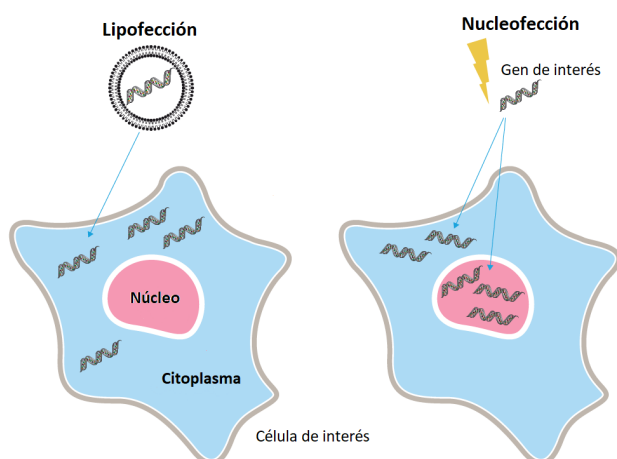
- pEZX.GA01 (GeneCopoeia™): Contiene el gen de la fosfatasa alcalina secretable (SEAP) bajo la regulación del promotor del citomegalovirus.

- pCMV.luc (Oxford genetics, Oxford, UK): Contiene el gen de la luciferasa de la luciérnaga oriental (*luc*) bajo la regulación del promotor del citomegalovirus.

Los mapas de ambos plásmidos se encuentran en el anexo 9.1.

#### 4.4.3. Electroporación: Transfección mediante un campo eléctrico

En este caso la captación del material genético se realiza por electroporación, un método físico. Al aplicar un pulso eléctrico adecuado sobre las células que se desea transfectar, su membrana se permeabiliza permitiendo la internalización de material genético exógeno. La tecnología *Nucleofector*™ combina unos parámetros eléctricos optimizados y soluciones específicas para los distintos tipos celulares para dirigir las moléculas de ADN plasmídico al interior celular, directamente al núcleo.



**Figura 7.** Representación de los fundamentos de la transfección por lipofección y por electroporación. Ilustración de *Nucleofector*™.

Se siguió el protocolo *Amaxa*® *Mouse Macrophage Nucleofector*™ Kit de Lonza (Basilea, Suiza), que permite la transfección de macrófagos murinos. Se añadieron  $2 \cdot 10^6$  células peritoneales con 2 µg de ADN plasmídico a la cubeta de electroporación, junto con 100 µL del reactivo *Ingenio Electroporation Solution* de Mirus (referencia MIR 501111). Después se le aplicó a la cubeta el programa *Nucleofector Program Y-001*.

Una vez acabado el protocolo, se añadieron 500 µl de medio de cultivo y se sembraron las células a la misma densidad descrita previamente ( $2,5 \cdot 10^6$  células/cm<sup>2</sup>). Las células se incubaron durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera húmeda, conteniendo un 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido ese tiempo se valoró la tasa de transfección.

En el experimento de electroporación también se utilizó un control positivo, en este caso el plásmido pZsGreen1-N1 (Addgene, Watertown, MA, USA): Contiene el gen reportero de la proteína fluorescente ZsGreen bajo la regulación del promotor pCMV. (Mapa en anexo 9.1.).

#### 4.4.4. Métodos de valoración de los macrófagos transfectados

##### Estudio de la actividad luciferasa

Para valorar la tasa de transfección y la funcionalidad del plásmido pCd68.Pon3.luc en las células transfectadas se utilizó el gen de la luciferasa de la luciérnaga oriental (*Photinus pyralis*) como gen reportero. Si se ha sobreexpresado luciferasa, se habrá sobreexpresado Pon3 y la transfección habrá sido eficaz, ya que el promotor controla la expresión de ambos genes. Para estudiar la actividad de la luciferasa, primero se retiró el medio de cultivo y se lavaron los pocillos con PBS dos veces. A continuación, se lisaron los macrófagos con un tampón Tris – HCl 25 mM a pH 7,5 con Tritón 100x al 0,03%. Se añadieron 25 µL de este tampón a cada pocillo, liberando de esta forma el contenido celular al medio. Se traspasaron los 25 µL a una placa opaca, y se le añadió a cada pocillo 60 µL de un tampón de revelado con D-luciferina 100 µM, 6,25 mM Tris – HCl pH 7,5, 10 mM de MgCl<sub>2</sub> y 2,5 µM de ATP. La luciferasa metaboliza la luciferina en presencia de ATP, originando luz. La luminiscencia se midió en el lector de microplacas FLUOstar® Omega de BMG Labtech.

##### Estudio de la fosfatasa alcalina

A los dos días post-transfección, se recogieron 50 µL de medio de los pocillos a estudiar y se calentaron a 65 °C durante 15 minutos. Se transfirieron por duplicado 10 µL a una placa de 96 pocillos y se añadieron a cada pocillo 100 µL de tampón de dietanolamina 0,5 mM, pH 9,8 con MgCl<sub>2</sub> al 10% y p-nitrofenilfosfato al 0,1%. Tras incubar 1 hora a 37 °C, la fosfatasa alcalina metaboliza el p-nitrofenilfosfato a p-nitrofenol, que adquiere color amarillo a pH alto. Se midió la absorbancia a 405 nm en el lector de microplacas FLUOstar® Omega de BMG Labtech.

##### 4.4.4.3. Estudio de la fluorescencia

En el experimento de electroporación se utilizó como control positivo un plásmido que contiene como gen reportero la proteína verde fluorescente ZsGreen. Esta proteína emite fluorescencia a 509 nm (zona verde del espectro visible) al ser irradiada con luz ultravioleta. La fluorescencia se observó directamente en la placa de cultivo con el microscopio de fluorescencia FLoid Cell Imaging Station de ThermoFisher™ Scientific.

### 5. Resultados y discusión

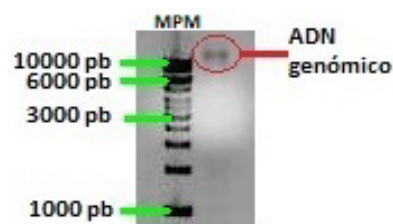
#### 5.1. Clonaje de la región promotora de Cd68 en pLIVE.Pon3.luc

##### 5.1.1. Clonaje por recombinación: In-Fusion® HD Cloning Kit

##### Obtención del inserto: Región promotora de Cd68

##### 5.1.1.1.1. Extracción de ADN genómico

Al realizar una electroforesis en gel de agarosa con el ADN genómico extraído de hígado de *Mus musculus* (figura 7), se observó una única banda de gran peso molecular. Esto se traduce en una correcta extracción del ADN genómico, ya que la presencia de una única banda corresponde a cromosomas íntegros. La concentración medida con NanoDrop ND – 1000 Spectrophotometer del ADN extraído fue de 41 ng/µL con un índice de pureza (Abs<sub>260</sub>/Abs<sub>280</sub>) de 1,88.



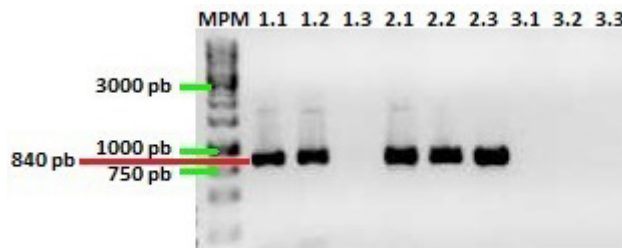
**Figura. 8.** Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% del ADN genómico extraído visualizado con Gel Doc XR. MPM (marcador de peso molecular) de 1 kb.

#### 5.1.1.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa

Para este trabajo se eligió como región promotora una secuencia de 806 nt formada por el primer nucleótido codificante de *Cd68* y los 805 nt upstream desde el inicio de la secuencia codificante de la variante transcripcional 1 del gen *Cd68* murino (NM\_001291058.1)<sup>(18)</sup>.

Se probaron las 9 combinaciones posibles de los cebadores directos y reversos de las 3 parejas de cebadores diseñadas (anexo 9.2) a una misma concentración y en las mismas condiciones de temperatura y tiempos de incubación. Por ejemplo, la combinación del cebador directo 1 con el

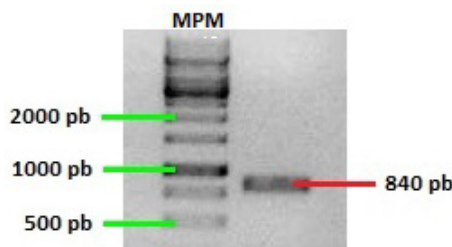
cebador reverso 1 sería 1.1 y así sucesivamente. Se comprobó la amplificación de las muestras mediante una electroforesis en gel de agarosa. Un resultado positivo se tradujo en la presencia de una única banda a una altura de 840 pb, correspondiente a la región promotora de 806 pb de *Cd68* junto con las secuencias homólogas a pLIVE.Pon3.luc destinadas a la recombinación.



**Figura. 9.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos amplificados por PCR visualizado con Gel Doc XR. 1.1 indica la reacción del cebador directo 1 y el cebador reverso1. MPM de 1 kb.

La amplificación fue exitosa en 5 de las 9 combinaciones de cebadores: 1.1, 1.2, 2.1, 2.2 y 2.3 (figura 9). Se escogió la condición 1.1 ya que tiene la región promotora escogida integra.

#### 5.1.1.1.3. Verificación, purificación y cuantificación del producto de PCR



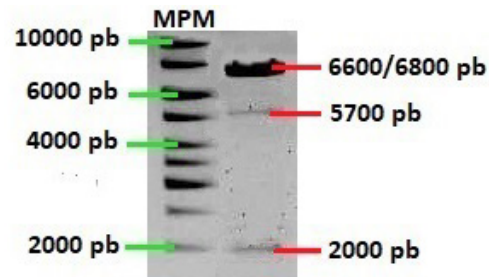
**Figura. 10.** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del producto de PCR 1.1 purificado, visualizado con Gel Doc XR. MPM de 1 kb.

Tras limpiar el producto de PCR 1.1 con el kit *GeneJET PCR Purification Kit*, se cuantificó la concentración del producto extraído mediante una electroforesis en gel de agarosa. El gel se analizó con el programa *Quantity One 1-D Analysis* (figura 10). La concentración calculada fue de 6 ng/ $\mu$ L.

#### Obtención del vector: Digestión de pLIVE.Pon3.luc para obtener pPon3.luc linearizado

##### 5.1.1.2.1. Digestión parcial

La figura 11 corresponde a la digestión de 6  $\mu$ g del plásmido pLIVE.Pon3.luc con 10 U de *SmaI* y 0,5 U de *BglII* en tampón Tango durante 30 minutos a 30 °C. Se observó una banda intensa a una altura de 6,8 kb correspondiente al plásmido pLIVE.Pon3.luc al que se le ha eliminado el promotor pLIVE. El fragmento de 6,6 kb también se encuentra a esta altura.



**Figura. 11.** Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% del plásmido pLIVE.Pon3.luc digerido con *BglII* y *SmaI*, visualizado con Gel Doc XR. MPM de 1 kb.

#### 5.1.1.2.2. Purificación en gel de agarosa

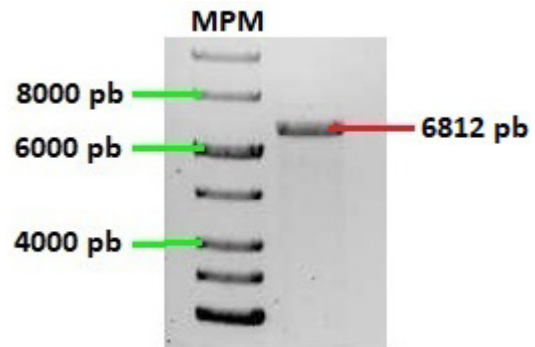


**Figura. 12.** Electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, del plásmido pLIVE.Pon3.luc digerido con *BglII* y *SmaI* y recorte del mismo. Visualizado con Gel Doc XR. MPM de 1 kb.

Una vez comprobado el tamaño correcto del plásmido digerido (6,8 kb), se realizó la extracción del gel. Para evitar trazas del fragmento de 6,6 kb se realizó una segunda purificación. En la figura 12 se puede observar el recorte del gel de esta segunda purificación.

#### 5.1.1.2.3. Cuantificación

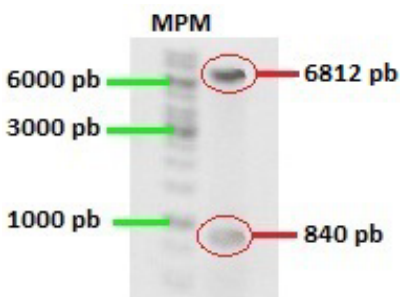
Tras realizar la digestión parcial, se purificó el fragmento de 6812 pb con el kit *GeneJET Gel Extraction*. El producto de esta purificación se cuantificó mediante una electroforesis en gel de agarosa (figura 13). La concentración calculada con el programa *Quantity One 1-D Analysis* del producto purificado fue de 39 ng/ $\mu$ L.



**Figura. 13.** Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% del fragmento de 6812 pb extraído y purificado. Visualizado con Gel Doc XR. MPM de 1 kb.

5.1.1.3.

#### Recombinación



**Figura. 14.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del vector y el inserto sin recombinar, visualizado con Gel Doc XR. MPM de 1 kb.

Una vez realizada la recombinación del plásmido digerido y purificado con el inserto amplificado, se comprobó el resultado mediante una electroforesis en gel de agarosa. Una recombinación exitosa resultaría en la aparición de una banda a una altura de 7,6 kb correspondiente al plásmido recombinante pCd68.Pon3.luc, que tiene un tamaño de 7612 pb. Se observaron sin embargo únicamente 2 bandas a una altura de 6,8 y 0,84 kb (figura 14), correspondientes al plásmido de 6812 pb y al inserto de 840 pb sin recombinar.

Se secuenció el plásmido pLIVE.Pon3.luc y se observó que la secuencia usada para diseñar la región del cebador reverso destinada a la recombinación no era completamente homóloga al plásmido. Se diseñó un nuevo cebador reverso (secuencia en anexo 9.3.) y se repitió todo el proceso.

Al comprobar si la recombinación fue exitosa en este segundo experimento mediante una electroforesis en gel de agarosa, el resultado fue el mismo que en el caso anterior: 2 bandas de bandas de 6,8 y 0,84 kb, correspondientes al plásmido y al inserto sin recombinar.

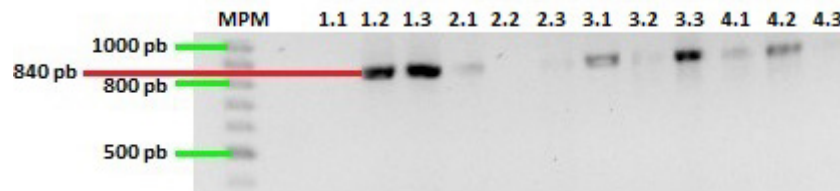
Se decidió cambiar el método de clonaje a un protocolo basado en la ligación.

### 5.1.2. Clonaje por ligación: TA Cloning™ Kit Dual Promoter con vector pCR™II

#### Obtención del inserto: Hot-start PCR

Se probaron 12 condiciones de PCR distintas, variando la concentración de los cebadores (anexo 9.2 y 9.3) y las temperaturas de annealing (condiciones en figura 4). Se comprobó si la amplificación fue exitosa mediante electroforesis en gel de agarosa de los 12 productos de PCR (figura 15).

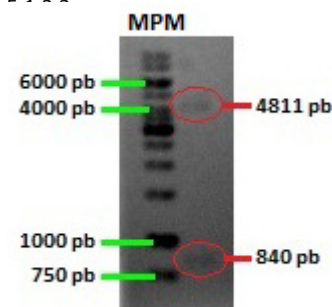
La intensidad de la banda es proporcional a la concentración del producto amplificado. Teniendo esto en cuenta, las mejores condiciones fueron 1.2, 1.3 y 3.3.



**Figura. 15.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la región promotora de *Cd68* amplificada con polimerasa *Taq*. Visualizado con Gel Doc XR. MPM de 100 bp.

Se purificó la muestra 1.2, obteniendo un producto con una concentración de 5 ng/μL.

#### Ligación de pCR™II con la región promotora de *Cd68*



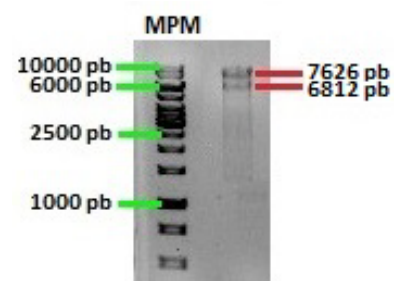
**Figura. 16.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de la ligación de pCR™II y p*Cd68* visualizado con Gel Doc XR. MPM de 1 kb.

Al realizar una electroforesis en gel de agarosa con el producto de la ligación de pCR™II y p*Cd68* (figura 16), se observaron dos bandas: una banda a una altura de 0,8-0,9 kb, correspondiente al inserto de 840 pb; y otra a una altura de 5 kb. La banda de aproximadamente 5 kb corresponde al plásmido recombinante pCR™II.p*Cd68*, que tiene un tamaño de 4811 pb. No se observó ninguna banda de 4 kb que se correspondería al plásmido pCR™II.

Se observó la presencia de inserto (banda de 0,84 kb) ya que se añadió en exceso.

#### Construcción del plásmido p*Cd68*.Pon3.luc

Una vez realizada la ligación del plásmido sin promotor con el inserto correspondiente a la región promotora de *Cd68* procedente de la digestión con del plásmido pCR™II.p*Cd68* con las enzimas *SmaI* y *BglII*, se realizó una electroforesis en gel de agarosa del producto ligado (figura 17). Se observaron dos bandas de un tamaño parecido a una altura de 6-8 kb. La de mayor tamaño corresponde al plásmido recombinante de 7626 pb, mientras que la de menor tamaño corresponde el plásmido digerido de 6812 pb. No se observó la banda correspondiente al inserto, que aparecería como una banda a 840 pb.



**Figura. 17.** Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% del producto de la ligación de pPon3.luc y p*Cd68* visualizado con Gel Doc XR. MPM de 1 kb.

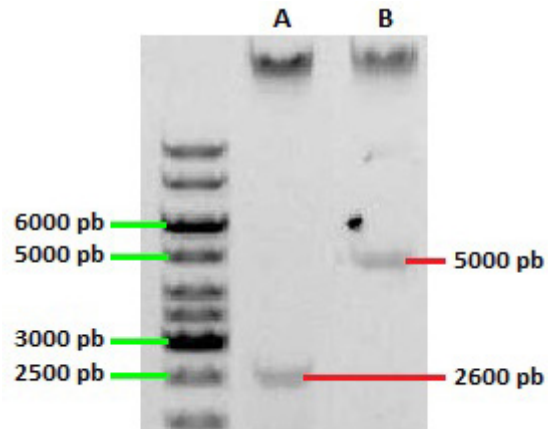


## 5.2. Transformación de bacterias

### 5.2.1. Análisis de las colonias recombinantes

#### Análisis coiled-supercoiled

En la figura 18 se puede observar una electroforesis en gel de agarosa del ADN extraído de dos colonias: la colonia A había incorporado el plásmido recombinante pCR<sup>TM</sup>II.pCd68 (5 kb), mientras que la colonia B había incorporado el plásmido pLIVE.Pon3.luc (7,6 kb). En ambas colonias se observó una banda de gran peso molecular, correspondiente al ADN cromosómico, y dos bandas de menor tamaño correspondiente al ADN plasmídico. En ambos casos dicha banda correspondía a la forma *supercoiled* del plásmido, por lo que apareció a un tamaño menor de los esperado para el plásmido lineal del mismo tamaño.



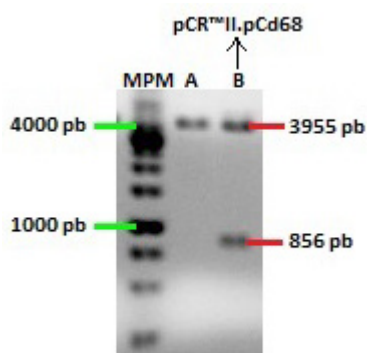
**Figura. 18.** Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% del ADN extraído de dos colonias visualizado con Gel Doc XR. MPM de 1 kb.

#### Análisis de restricción

5.2.1.2.

5.2.1.2.1.

pCR<sup>TM</sup>II.pCd68



**Figura. 19.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la digestión con *EcoRI* del ADN extraído de dos colonias, visualizado con Gel Doc XR. MPM de 1 kb.

En la figura 19 se observa la digestión con *EcoRI* del ADN plasmídico extraído de dos colonias, A y B. En la colonia A se observó una única banda de aproximadamente 4 kb. En la colonia B también se observó dicha banda, además de otra de menor tamaño a una altura de 850 pb.

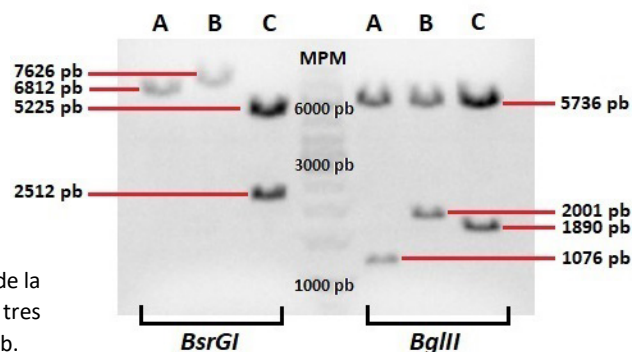
Se puede concluir que la colonia A ha incorporado el plásmido pCR<sup>TM</sup>II circularizado, que tiene un tamaño de 3971 pb. La digestión con *EcoRI* genera dos fragmentos: uno de 3955 pb, que es el que se observa; y uno de 16 pb. La colonia B ha incorporado el plásmido recombinante pCR<sup>TM</sup>II.pCd68 ya que, además de la banda correspondiente al plásmido, se observa otra de 856 pb, correspondiente a la región promotora de 840 pb de *Cd68*. Se seleccionó esta colonia para trabajar.

5.2.1.2.2.

pCd68.Pon3.luc

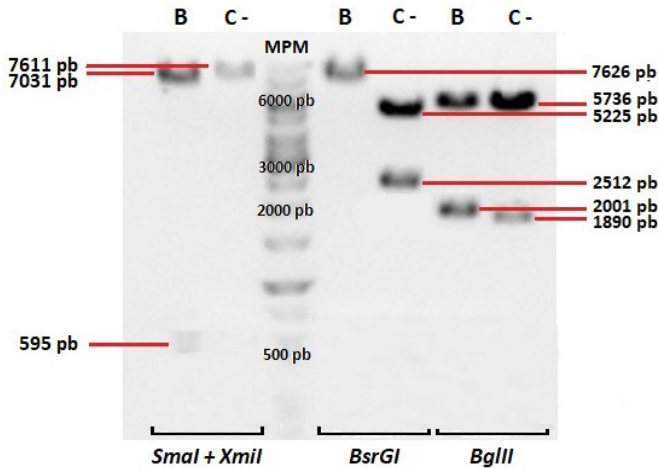
En la figura 20 se observan los patrones de digestión del ADN plasmídico extraído de tres colonias: A, B y C. Las muestras situadas a la izquierda del MPM fueron digeridas con *BsrGI*, las de la derecha con *BglII*.

**Figura. 20.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la digestión con *BsrGI* y *BglII* del ADN extraído de tres colonias. Visualizado con Gel Doc XR. MPM de 1 kb.



La colonia A presentó el patrón de digestión del fragmento de 6811 pb que se ha circularizado sin incorporar inserto; mientras que la colonia C presentó el patrón de digestión del plásmido original pLIVE.Pon3.luc.

La colonia B presentó el patrón esperado para el plásmido pCd68.Pon3.luc, por lo que fue la que se seleccionó.



Tras extraer el ADN de dicha colonia mediante miniprep, se realizó un segundo análisis de restricción, usando como control negativo (C-) una extracción del plásmido pLIVE.Pon3.luc. Se usaron las enzimas *BsrGI* y *BglII* como en el análisis anterior, además de una digestión con *SmaI* y *XmiI* (figura 21). Los fragmentos resultantes fueron los esperados para el plásmido pCd68.Pon3.luc.

**Figura. 21.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la digestión con *BsrGI*, *BglII* y *SmaI* y *XmiI* del ADN extraído de la colonia B por miniprep y del plásmido pLIVE.Pon3.luc. Visualizado con Gel Doc XR. MPM de 1 kb.

## 5.2.2. Secuenciación

### 5.2.2.1.

#### Miniprep

Tras la purificación de ADN con el kit *ZymoPURE™ Plasmid Miniprep* se cuantificó el ADN plasmídico con el aparato Nanodrop, ND-100 Spectrophotometer. Para el plásmido pCR™II.pCd68 se obtuvo una concentración de 107 ng/μL y un índice de pureza ( $Abs_{260}/Abs_{280}$ ) de 1,91. Para el plásmido pCd68.Pon3.luc la concentración obtenida fue de 181 ng/μL con un índice de pureza de 1,90.

### 5.2.2.2.

#### Secuenciación Sanger

La secuenciación fue llevada a cabo en la unidad de genómica funcional del CIBA.

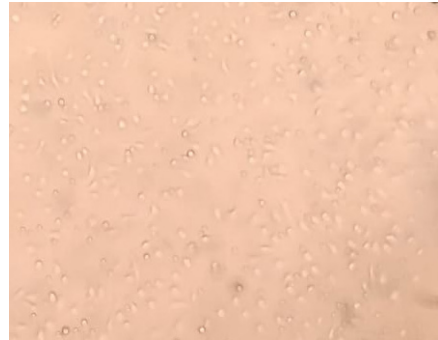
Las secuencias obtenidas para el plásmido pCR™II.pCd68 se alinearon al 99,7% con la región promotora de *Cd68* mediante el programa NCBI Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se puede afirmar que el plásmido alberga el promotor de *Cd68*.

Las secuencias obtenidas para el plásmido pCd68.Pon3.luc se alinearon al 99% con la región promotora de *Cd68* mediante el programa NCBI Blast. Se puede afirmar que el plásmido alberga el promotor de *Cd68*.

### 5.3. Obtención y caracterización de macrófagos peritoneales de ratón

#### 5.3.1. Obtención y siembra de los macrófagos

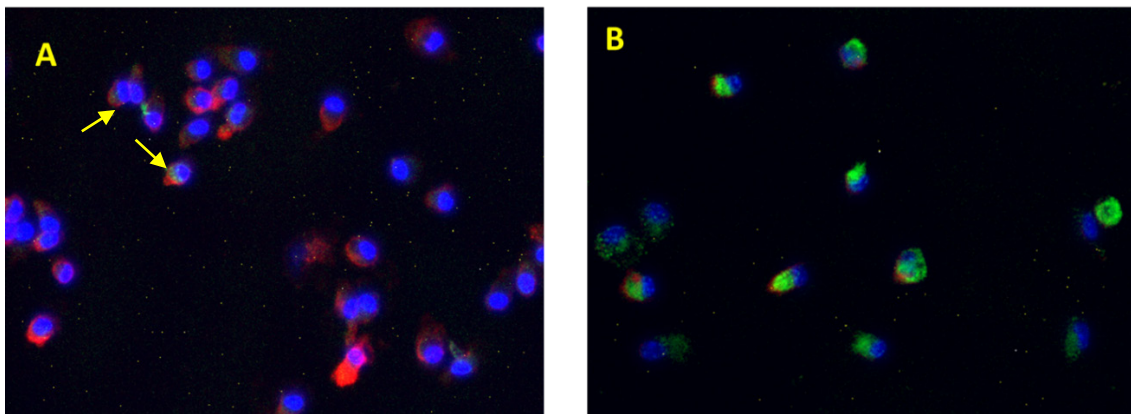
Las células peritoneales recogidas se sembraron a razón de  $2,5 \cdot 10^6$  células/cm<sup>2</sup>. Tras dos horas de incubación y lavar dos veces con PBS, se tomó una foto de las células adheridas (figura 22).



**Figura 22.** Células peritoneales adheridas tras 2 horas de incubación y lavado con PBS.

#### 5.3.2. Caracterización por inmunofluorescencia

Para cerciorarse de que la población celular extraída y purificada del peritoneo estaba formada por macrófagos se detectó la expresión de CD68 y F4/80 mediante inmunofluorescencia. Tras la incubación con los anticuerpos primarios acoplados a un fluorocromo, se obtuvieron las siguientes imágenes:

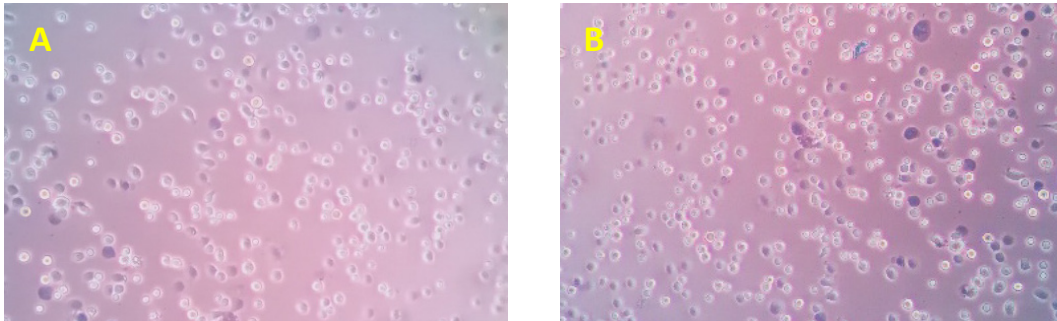


**Figura 23.** Detección por inmunofluorescencia en macrófagos peritoneales murinos de los antígenos CD68 (Alexa Fluor 488 verde) y F4/80 (APC rojo). Sin Tritón X-100 (A) o permeabilizando las células con 0,1 % de tritón X-100 (B).

Tal y como se muestra en la figura 23 la capacidad para detectar el antígeno por parte de los anticuerpos depende de la presencia o ausencia de Tritón X-100. Predominando el marcaje para F4/80 en rojo en la incubación sin Tritón (figura 23. A) al ser un marcador de superficie; y marcándose de manera muy débil (verde indicado con flechas amarillas) para CD68, cuya localización es fundamentalmente intracelular. Sin embargo, al permeabilizar las células con Tritón X-100 predomina el marcaje de CD68 frente al de F4/80 (figura 23. B).

### 5.3.3. Estudio de la viabilidad celular

Previo a la sobreexpresión de los experimentos de sobreexpresión génica decidimos caracterizar cual es la viabilidad celular en nuestras condiciones experimentales. Para ello se realizó una tinción con Azul de tripán al 0,4% de los macrófagos tras la siembra y transcurridos 3 días tanto en presencia como ausencia de los distintos reactivos de transfección empleados.



**Figura 24.** Fotografías de macrófagos teñidos con azul de tripán. La fotografía A se tomó el día de la siembra, la fotografía B se tomó tras 24 horas en cultivo.

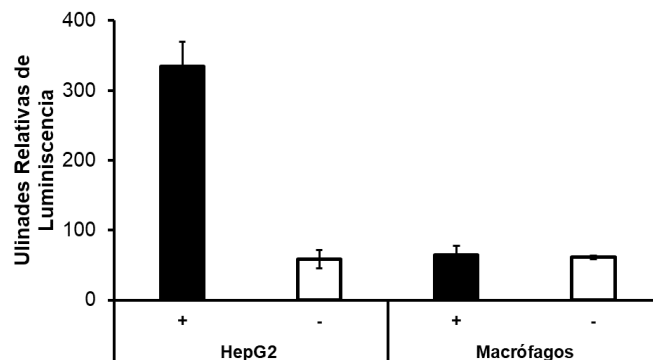
Como era de esperar la viabilidad y el número de células disminuyeron sensiblemente tras el periodo experimental.

## 5.4. Transfección en macrófagos

### 5.4.1. Lipofección: Transfección mediante liposomas

En un primer experimento se transfectaron macrófagos con pCd68.Pon3.luc utilizando todas las condiciones descritas en el apartado de material y métodos. La transfección se realizó el mismo día de siembra tras la eliminación de las células no adherentes, y se midió la actividad luciferasa al segundo y tercer día sin detectar señal alguna del reportero en ninguna de las condiciones de transfección.

A fin de cerciorarnos de que tanto el protocolo de transfección como el protocolo de medición de luz se siguieron de forma correcta, se realizó una segunda intervención con controles positivos tanto del plásmido (pCMV.luc) como de la línea celular (HepG2) utilizando para ello el kit de *Lipofectamine™ 3000*. Observando los siguientes resultados:

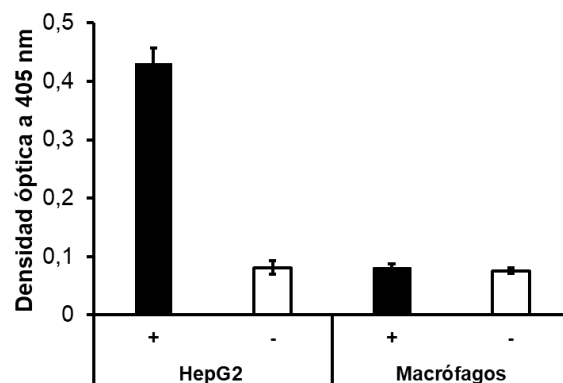


**Figura 25.** Medición de la actividad luciferasa en células HepG2 y macrófagos peritoneales murinos en presencia o ausencia del plásmido pCMV.luc.

Con estos resultados, queda de manifiesto que el protocolo seguido para la medición de luz es adecuado ya que en los controles positivos funcionan quedando en duda las siguientes opciones:

- El método de transfección no funcione en macrófagos peritoneales de ApoE K.O.
- Los promotores pCd68 y pCMV no funcionen en macrófagos murinos.
- Una combinación de las anteriores que nos lleve a una expresión del reportero por debajo del umbral de detección.

Para descartar la hipótesis de la sensibilidad del reportero se probó a transfectar otro plásmido que contenía la SEAP como sistema de detección (pEZX.GA01) en las mismas condiciones experimentales. De nuevo solo funcionó en el caso de las HepG2.

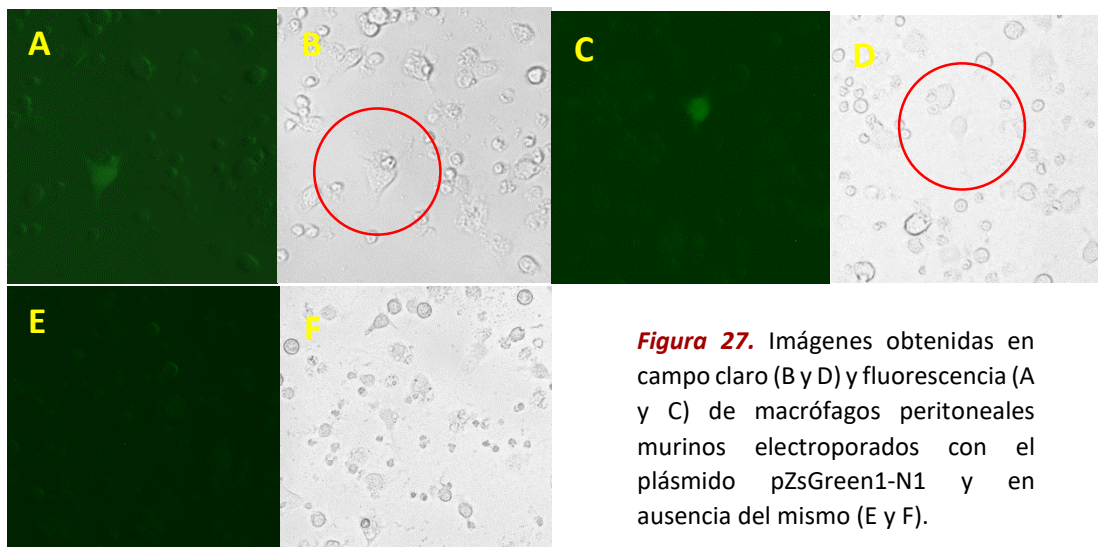


**Figura 26.** Medición de la actividad SEAP en células HepG2 y macrófagos peritoneales murinos en presencia o ausencia del plásmido pEZX.GA01.

Todo esto, junto con la experiencia de otros autores, nos lleva a pensar que el sistema de reporteros no es la causa principal de la ausencia de señal en este modelo celular y la necesidad de ensayar un método de sobreexpresión génica más adecuado.

#### 5.4.2. Electroporación: Transfección mediante un campo eléctrico

Tras la electroporación del control positivo (pZsGreen1-N1), y trascurridas 24 horas se pasó a evaluar los resultados de la sobreexpresión al microscopio de fluorescencia Fluid Cell Imaging Station de ThermoFisher™ Scientific observando los siguientes resultados:



**Figura 27.** Imágenes obtenidas en campo claro (B y D) y fluorescencia (A y C) de macrófagos peritoneales murinos electroporados con el plásmido pZsGreen1-N1 y en ausencia del mismo (E y F).

Como se observa en la Figura 27, en los macrófagos electroporados con el control positivo sí que se detectaron algunas células con fluorescencia siendo este un patrón que no se observó en el control negativo.

## **6. Conclusiones**

1. El clonaje de la región promotora de Cd68 en pLIVE.Pon3.luc por recombinación no fue exitoso. Sin embargo, el clonaje basado en la ligación utilizando clonajes intermedios obtuvo colonias con el plásmido ingenierizado pCd68.Pon3.luc.
2. La población celular extraída del peritoneo fue positiva para la expresión de CD68 y F4/80 mediante inmunofluorescencia.
3. La transfección de los plásmidos en macrófagos peritoneales de ratones *ApoE* knock out por lipofección no obtuvo resultados positivos. Sin embargo, en la transfección mediante electroporación se observó la presencia de células con fluorescencia.

## **Conclusions**

1. The Cd68 promoter region cloning in pLIVE.Pon3.luc by recombination was unsuccessful. However, the ligation using intermediate cloning resulted in colonies containing the engineered plasmid pCd68.Pon3.luc.
2. The peritoneum-extracted cell population was positive for the expression of CD68 and F4/80 by immunofluorescence.
3. The plasmids transfection into peritoneal macrophages of ApoE knock out mice by lipofection did not yield positive results. However, in the transfection by electroporation the presence of fluorescent cells was observed.

## **7. Perspectivas futuras**

Finalizado nuestro estudio nos planteamos optimizar las condiciones de electroporación con el control positivo pZsGreen1-N1 en macrófagos peritoneales de ratones *ApoE* knock out ya que la tasa de transfección obtenida fue baja y poco intensa. Una vez optimizado, el siguiente paso sería realizar un experimento de transfección con el plásmido pCd68.Pon3.luc mediante electroporación. En caso de no detectar la presencia de actividad luciferasa tendríamos que probar con métodos de transfección basados en vectores virales.

Alcanzar el objetivo perseguido en este estudio nos permitirá en un futuro evaluar el estrés oxidativo de estos macrófagos transfectados ya que la expresión de *Pon3* puede tener un papel importante en la disminución del estrés oxidativo celular <sup>(19,20)</sup>.

## 8. Bibliografía

1. Ovchinnikov D.A. (2008). Macrophages in the embryo and beyond: much more than just giant phagocytes / *Genesis* (9 Sep, 2008); Volume 46, Issue 9, p.447–62. PMID: 18781633. <https://doi.org/10.1002/dvg.20417>
2. Xia Zhang, Ricardo Goncalves, David M. (2008). The isolation and characterization of murine macrophages / *Current Protocols in Immunology* (15 Nov, 2008); Volume 83, Issue 1, Unit 14.1. PMID: 19016445. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1401s83>
3. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. (2008). Macrophage activation and polarization / *Frontiers in Bioscience* (1 Jan, 2008); Volume 13, p.453-61. PMID: 17981560. <https://doi.org/10.2741/2692>
4. Wynn T.A., Chawla A., Pollard J.W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease / *Nature* (Apr 25, 2013); Volume 496, p.445-55. PMID: 23619691. <https://doi.org/10.1038/nature12034>
5. Hashimoto D., Chow A., Noizat C., Teo P., Beasley M.B., Leboeuf M., Becker C.D., et al. (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes / *Immunity* (18 Apr, 2013); Volume 38, p.792–804. PMID: 23601688. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.004>
6. Yona S., Kim K.W., Wolf Y., Mildner A., Varol D., Breker M., et al. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis / *Immunity* (24 Jan, 2013); Volume 38, Issue 1, p.79-91. PMID: 23273845. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.12.001>
7. A-Gonzalez N., Guillen J.A., Gallardo G., Diaz M., de la Rosa J.V., Hernandez I.H., et al. (2013). The nuclear receptor LXR $\alpha$  controls the functional specialization of splenic macrophages / *Nature Immunology* (16 Jun, 2013); Volume 14, p.831–839. PMID: 23770640. <https://doi.org/10.1038/ni.2622>
8. Hesketh M., Sahin K.B., West Z.E., Murray R.Z. (2017). Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing / *International Journal of Molecular Sciences* (17 Jul, 2017); Volume 18, Issues 7. PMID: 28714933. <https://doi.org/10.3390/ijms18071545>
9. Mills C.D. (2012). M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease / *Critical Reviews in Immunology* (2012); Volume 32, Issue 6, p 463-88. PMID: 23428224. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v32.i6.10>
10. Galdiero M.R., Garlanda C., Jaillon S., Marone G., Mantovani A. (2013). Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression / *Journal of Cellular Physiology* (12 Oct, 2012); Volume 228, Issue 7, p.1404–12. PMID: 23065796. <https://doi.org/10.1002/jcp.24260>
11. Ray A., Bonnie N. Dittel B.N. (2010). Isolation of Mouse Peritoneal Cavity Cells / *Journal of Visualized Experiments* (28 Jan, 2010). PMID: 20110936. <https://doi.org/10.3791/1488>
12. Dos Anjos Cassado A. (2017). F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen / *Springer, Cham* (29 Apr, 2017); Volume 62, p.161-179. PMID: 28455709. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-54090-0\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-54090-0_7)
13. Austyn J.M., Gordon S. (1981). F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage / *European Journal of Immunology* (Oct, 1981); Volume 11, Issue 10, p.805-15. PMID: 7308288. <https://doi.org/10.1002/eji.1830111013>
14. Ghosn E.E., Cassado A.A., Govoni G.R., Fukuhara T., Yang Y., Monack D.M., et al. (2010). Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets / *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* (9 Feb, 2010); Volume 107, Issue 6; p.2568-73. PMID: 20133793. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915000107>
15. Holness C.L., da Silva R.P., Fawcett J., Gordon S., Simmons D.L. (1993). Macrosialin, a mouse macrophage-restricted glycoprotein, is a member of the lamp/lgp family / *The Journal of Biological Chemistry* (5 May, 1993); Volume 268, Issue 13, p.9661-6. PMID: 8486654.
16. da Silva R.P., Gordon S. (1999). Phagocytosis stimulates alternative glycosylation of macrosialin (mouse CD68), a macrophage-specific endosomal protein / *Biochemical Journal* (15 Mar, 1999); Volume 338, Part 3, p.687–94. PMID: 8486654.

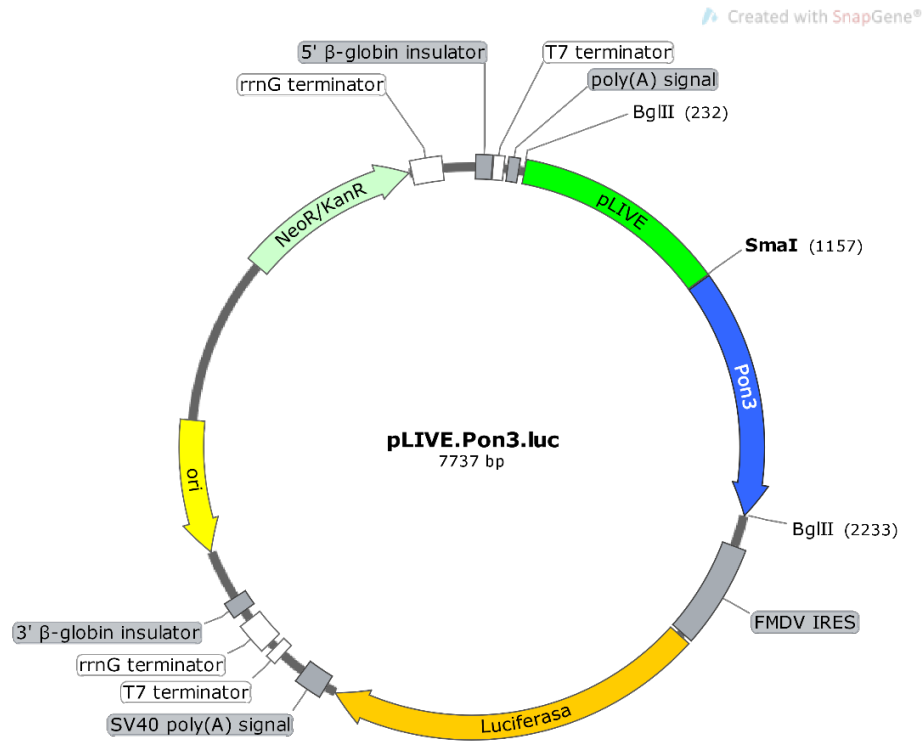
17. Levin M.C., Lidberg U., Jirholt P., Adiels M., Wramstedt A., Gustafsson K. (2012). Evaluation of macrophage-specific promoters using lentiviral delivery in mice / *Gene Therapy* (1 Dec, 2012); Volume 19, p.1041-7. PMID: 22130447. <https://doi.org/10.1038/gt.2011.195>
18. NCBI: National Centre for Biotechnology Information [Internet]; - [actualizado 12 Nov 2018; citado 25 Nov 2018]. Disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM\\_001291058.123](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_001291058.123).
19. Liu Y, Mackness B, Mackness M. Comparison of the ability of paraoxonases 1 and 3 to attenuate the in vitro oxidation of low-density lipoprotein and reduce macrophage oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2008 Sep 15;45(6):743-8.
20. Rosenblat M, Aviram M. Paraoxonases role in the prevention of cardiovascular diseases. *Biofactors*. 2009 Jan-Feb;35(1):98-104



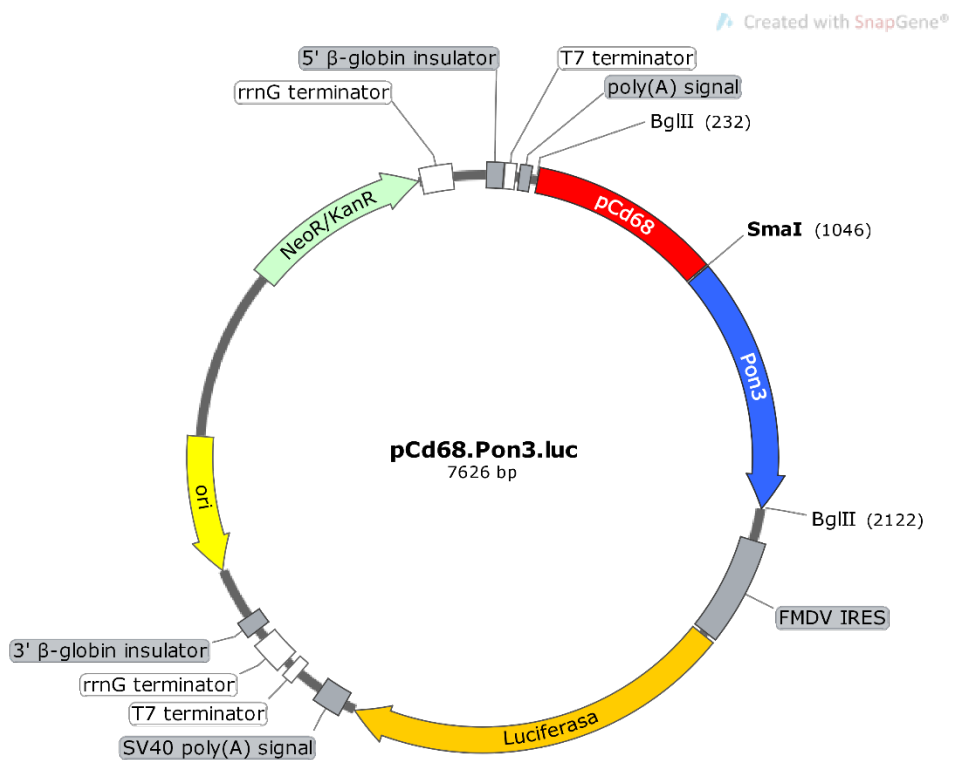
## 9. Anexo

### 9.1. Plásmidos utilizados

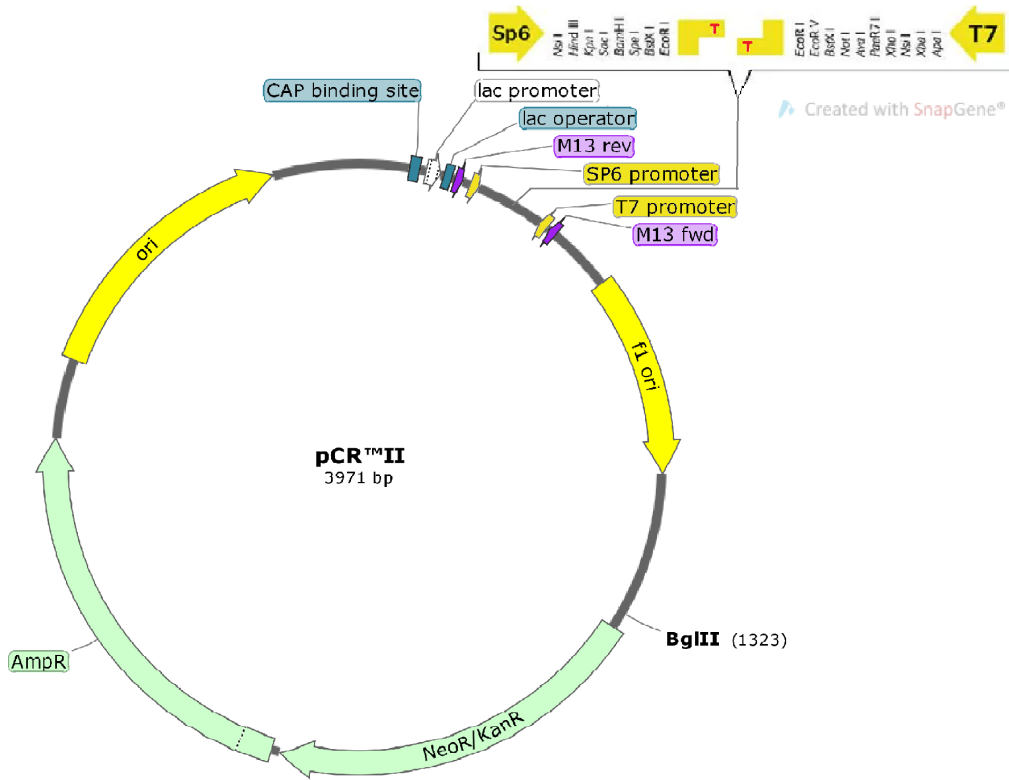
#### 9.1.1. pLIVE.Pon3.luc



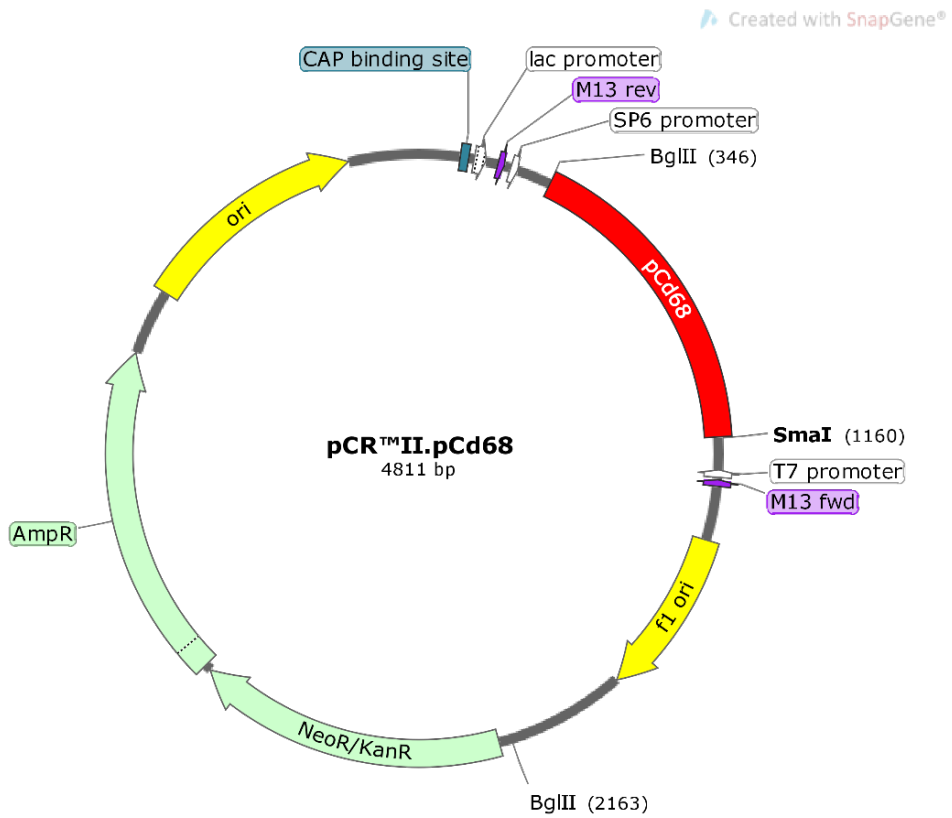
#### 9.1.2. pCd68.Pon3.luc



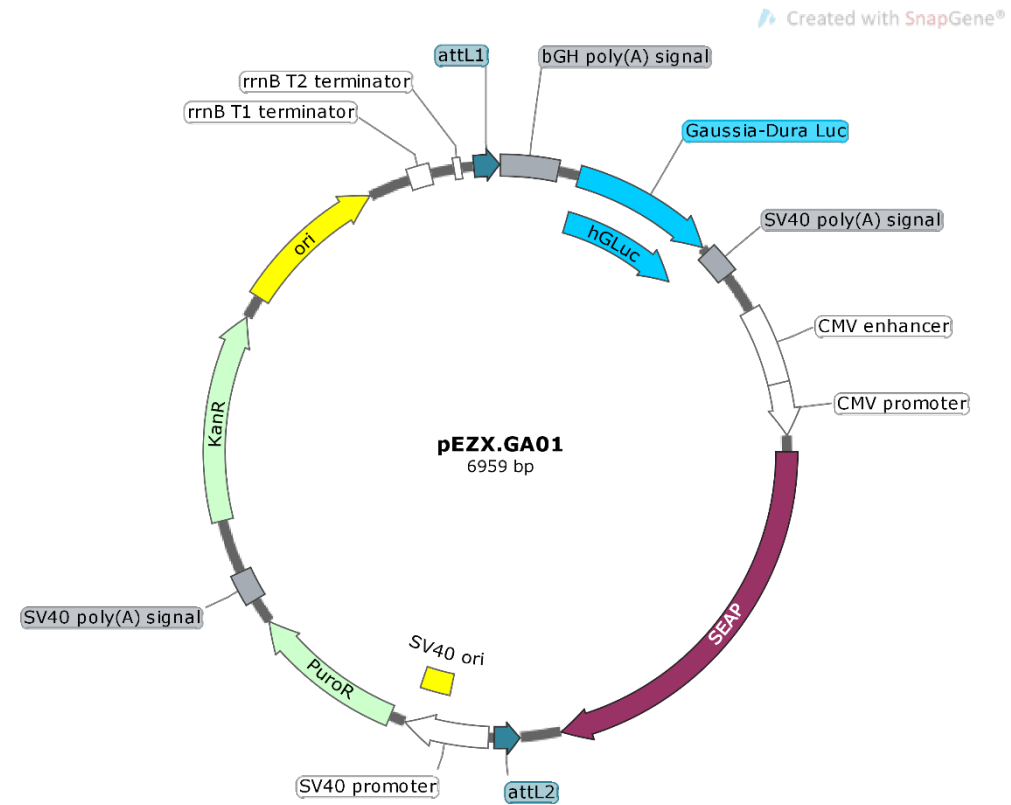
### 9.1.3. pCR™II



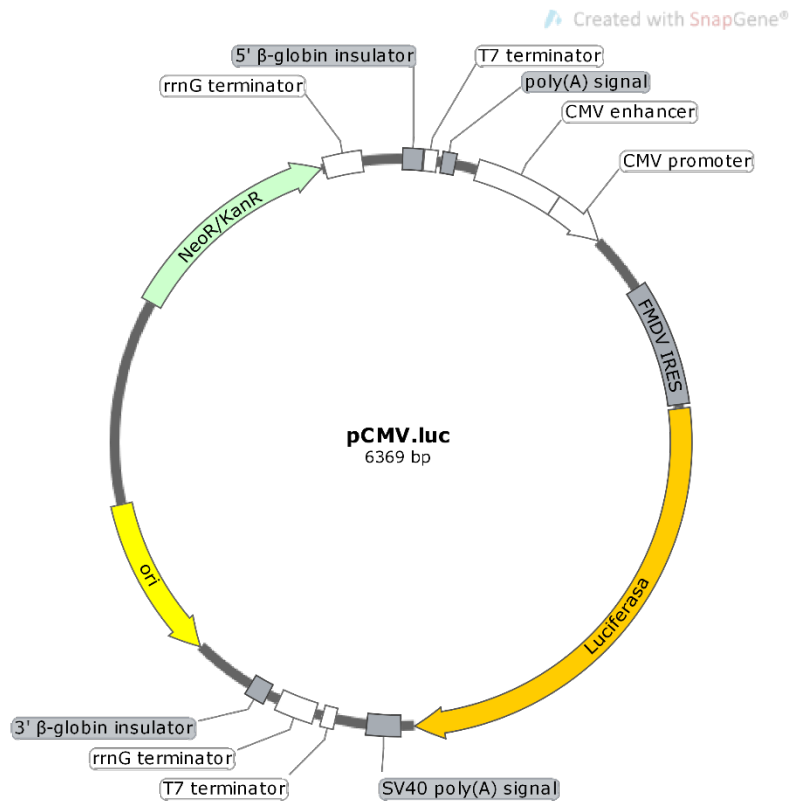
### 9.1.4. pCR™II.pCd68



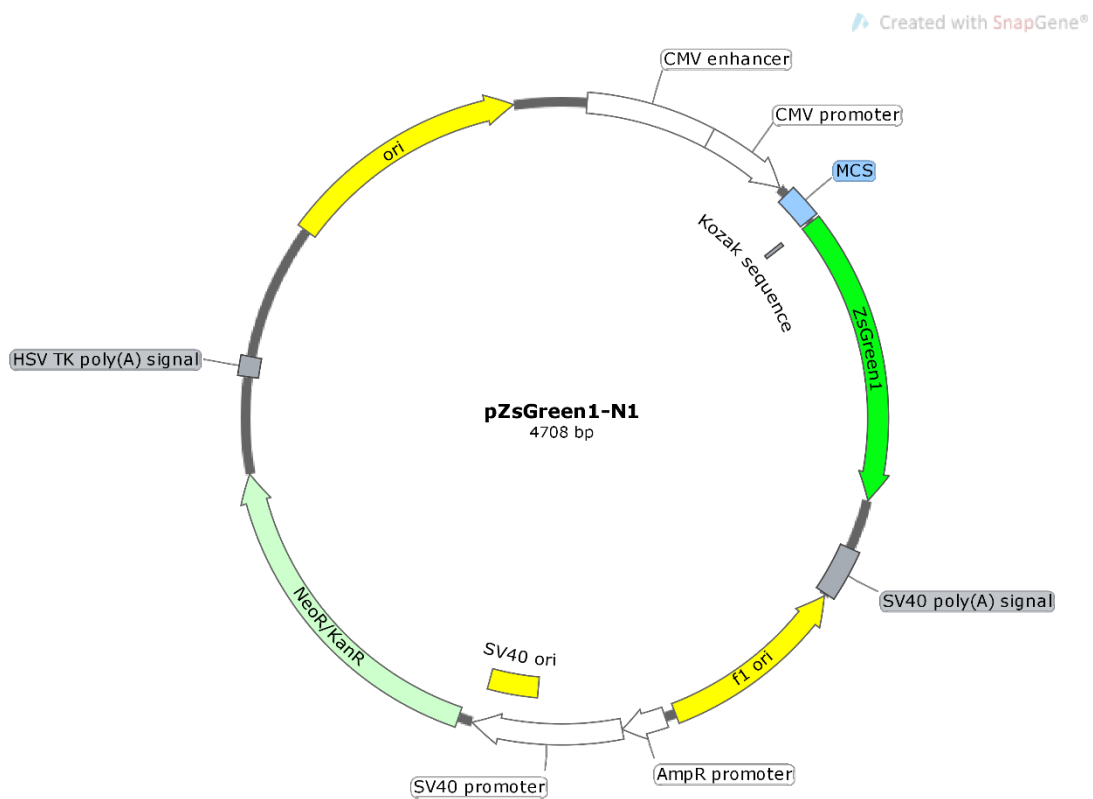
### 9.1.5. pEZX.GA01



### 9.1.6. pCMV.luc



### 9.1.7. pZsGreen1-N1



### 9.2. Diseño de cebadores para la obtención de la región promotora de Cd68 mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (Apartado 4.1.1.1.2.)

	Secuencia	Longitud (pb)	GC (%)	Tm (°C)	Tm específica del gen (°C)
<b>PrD1</b>	5' – GAGTGTAGCCAGATCTAGTT GATTACTGAATTTGCCATG – 3'	39	41	67,5	58,6
<b>PrR1</b>	5' – CATGGTGTGCGATCCCGGG CAGAGATGCTCAGACCAG – 3'	36	63	78,9	62,5
<b>PrD2</b>	5' – GAGTGTAGCCAGATCTTAGTT GATTACTGAATTTGCCATGT – 3'	41	39	67,5	59,2
<b>PrR2</b>	5' – CATGGTGTGCGATCCCGGGC AGAGATGCTCAGACCAGCTAG – 3'	38	63	79,2	63,1
<b>PrD3</b>	5' – GAGTGTAGCCAGATCTACTA GTTGATTACTGAATTTGCCA – 3'	40	40	67,3	58,5
<b>PrR3</b>	5' – CATGGTGTGCGATCCCGGGG ATGCTCAGACCAGCTAGGC – 3'	38	61	78,8	61,5

**9.3. Cebadores rediseñados para la obtención de la región promotora de Cd68 mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (Apartado 5.1.1.1.4.)**

	Secuencia	Longitud (pb)	GC (%)	Tm (°C)	Tm específica del gen (°C)
<b>PrD1</b>	5' – GAGTGTAGCCAGATCTAGTT GATTACTGAATTTGCCATG – 3'	39	41	67,5	58,6
<b>PrR1</b>	5' – TTCCCCATGGTGTCCCGG GCAGAGATGCTCAGACCAG – 3'	37	62	79,0	62,8

**9.4. Secuencias de los cebadores para la secuenciación Sanger (Apartado 4.2.3.2.)**

	Secuencia	Concentración (μM)	Tm (°C)
<b>pCR™II.pCd68</b>	PrD: Hibrida con el promotor pSP6 5' – ATTTAGGTGACACTATAG – 3'	5	42
	PrR: Hibrida con el promotor pCd68 5' – TTCCCCATGGTGTCCCGGG CAGAGATGCTCAGACCAG – 3'	5	72,8
<b>pLIVE.Pon3.luc</b>	PrD: Hibrida con el promotor pCd68 5' – GAGTGTAGCCAGATCTAGTT GATTACTGAATTTGCCATG – 3'	5	63,3
	PrR: Hibrida con Pon3 5' – GGTC AAGCCCACCACTGATT – 3'	5	57,3