UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

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

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

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

MAR O 2008

1466608

TD
Z5320
FCP
2008
.R62

FONDO
TESIS
170908

4-Septiembre-08

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

ABRAHAM OCTAVIO RODRÍGUEZ DE LA FUENTE

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)

DEDICATORIA

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

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. RESUMEN Y ABSTRACT.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. HIPÓTESIS.....	5
4. OBJETIVOS.....	6
5. ANTECENTES.....	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 *Escherichia coli* 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 *E. coli* 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 *in vitro* 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 *in vivo* 59
6.3.1 Maxiprep con acetato de amonio para obtener pCEM. 60
6.3.2 Inyección de pCEM en *Mus musculus*. 61
6.3.3 Sistema de exposición *in vivo*. 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 *Mus musculus in vivo* 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 *Mus musculus*. 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 μT 76
15. Efecto de 24 μT de intensidad de CEM en la activación del promotor del gene de la Hsp70 en células HeLa 77
16. Efecto de 48 μT de Intensidad de CEM sobre la activación del promotor de hsp70 en células HeLa 78
17. Efecto de 80 μT de 60 Hz sobre la activación del promotor de hsp70 en células HeLa 79
18. Efecto sinérgico entre el choque térmico y 8μT 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 μT en BMK16 82
21. Efecto del CEM y CT en células RMA E7 83
22. Efecto de los CEM de 8 a 80 μT y el CT en células INER-37 84
23. Efecto de los CEM de 80μT de 60 Hz sobre la expresión de luciferasa en *Mus musculus* 85
24. Efecto de los CEM de 80 μT sobre la expresión de luciferasa en *Mus musculus* 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 *Mus musculus* expuesto a CEM *in vivo*, 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

NOMENCLATURA

Abs	Absorbancia
AC	Antes de Cristo
ADN	Acido desoxirribonucléico
ARN	Acido ribonucléico
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