6. MÉTODOS

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

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

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

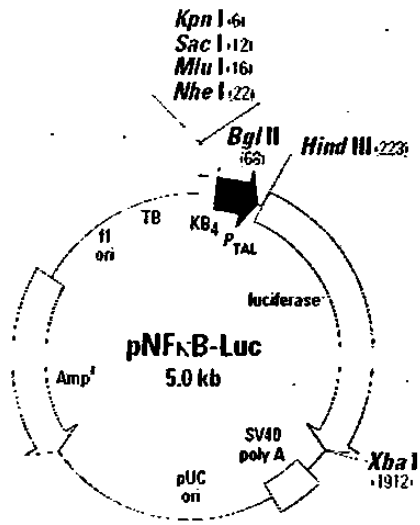

Figura 1. Mapa del vector pNFKB-luc de 5.0 Kb mostrando los sitios de restricción.

```
GGTACCGAGC TCTTACGCGT GCTAGCGGGA ATTTCCGGGA ATTTCCGGGA ATTTCCGGGA
ATTTCCAGAT CTGCCGCCCC GACTGCATCT GCGTGTTCGA ATTCGCCAAT GACAAGACGC
TGGGCGGGGT TTGTGTCATC ATAGAACTAA AGACATGCAA ATATATTTCT TCCCGGGACA
CCGCCAGCAA ACGCGAGCAA CGGGCCACGG GGATGAAGCA GAAGCTTGGC ATTCCGGTAC
TGTTGGTAAA GCCACCATGG AAGACGCCAA AAACATAAAG AAAGGCCCGG CGCCATTCTA
TCCGCTGGAA GATGGAACCG CTGGAGAGCA ACTGCATAAG GCTATGAAGA GATACGCCCT
GGTTCCTGGA ACAATTGCTT TTACAGATGC ACATATCGAG GTGGACATCA CTTACGCTGA
GTACTTCGAA ATGTCCGTTC GGTTGGCAGA AGCTATGAAA CGATATGGGC TGAATACAAA
TCACAGAATC GTCGTATGCA GTGAAAACTC TCTTCAATTC TTTATGCCGG TGTTGGGCGC
GTTATTTATC GGAGTTGCAG TTGCGCCCGC GAACGACATT TATAATGAAC GTGAATTGCT
CAACAGTATG GGCATTTCGC AGCCTACCGT GGTGTTCGTT TCCAAAAACG GGTTGCAAAA
AATTTTGAAC GTGCAAAAAA AGCTCCCAAT CATCCAAAAA ATTATTATCA TGGATTCTAA
AACGGATTAC CAGGGATTTC AGTCGATGTA CACGTTCGTC ACATCTCATC TACCTCCCGG
TTTTAATGAA TACGATTTTG TGCCAGAGTC CTTCGATAGG GACAAGACAA TTGCACTGAT
CATGAACTCC TCTGGATCTA CTGGTCTGCC TAAAGGTGTC GCTCTGCCTC ATAGAACTGC
CTGCGTGAGA TTCTCGCATG CCAGAGATCC TATTTTTGGC AATCAAATCA TTCCGGATAC
TGCGATTTTA AGTGTTGTTC CATTCCATCA CGGTTTTGGA ATGTTTACTA CACTCGGATA
TTTGATATGT GGATTTCGAG TCGTCTTAAT GTATAGATTT GAAGAAGAGC TGTTTCTGAG
GAGCCTTCAG GATTACAAGA TTCAAAGTGC GCTGCTGGTG CCAACCCTAT TCTCCTTCTT
CGCCAAAAGC ACTCTGATTG ACAAATACGA TTTATCTAAT TTACACGAAA TTGCTTCTGG
TGGCGCTCCC CTCTCTAGGG AAGTCGGGGA AGCGGTTGCC AAGAGGTTCC ATCTGCCAGG
TATCAGGCAA GGATATGGGC TCACTGAGAC TACATCAGCT ATTCTGATTA CACCCGAGGG
GGATGATAAA CCGGGCGCGG TCGGTAAAGT TGTTCCATTT TTTGAAGCGA AGGTTGTGGA
TCTGGATACC GGGAAAACGC TGGGCGTTAA TCAAAGAGGC GAACTGTGTG TGAGAGGTCC
TATGATTATG TCCGGTTATG TAAACAATCC GGAAGCGACC AACGCCTTGA TTGACAAGGA
TGGATGGCTA CATTCTGGAG ACATAGCTTA CTGGGACGAA GACGAACACT TCTTCATCGT
TGACCGCCTG AAGTCTCTGA TTAAGTACAA AGGCTATCAG GTGGCTCCCG CTGAATTGGA
ATCCATCTTG CTCCAACACC CCAACATCTT CGACGCAGGT GTCGCAGGTC TTCCCGACGA
TGACGCCGGT GAACTTCCCG CCGCCGTTGT TGTTTTGGAG CACGGAAAGA CGATGACGGA
AAAAGAGATC GTGGATTACG TCGCCAGTCA AGTAACAACC GCGAAAAAGT TGCGCGGAGG
AGTTGTGTTT GTGGACGAAG TACCGAAAGG TCTTACCGGA AAACTCGACG CAAGAAAAAT
CAGAGAGATC CTCATAAAGG CCAAGAAGGG CGGAAAGATC GCCGTGTAAT TCTAGAGTCG
GGGCGGCCGG CCGCTTCGAG CAGACATGAT AAGATACATT GATGAGTTTG GACAAACCAC
AACTAGAATG CAGTGAAAAA AATGCTTTAT TTGTGAAATT TGTGATGCTA TTGCTTTATT
TGTAACCATT ATAAGCTGCA ATAAACAAGT TAACAACAAC AATTGCATTC ATTTTATGTT
TCAGGTTCAG GGGGAGGTGT GGGAGGTTTT TTAAAGCAAG TAAAACCTCT ACAAATGTGG
TAAAATCGAT AAGGATCCGT CGACCGATGC CCTTGAGAGC CTTCAACCCA GTCAGCTCCT
TCCGGTGGGC GCGGGGCATG ACTATCGTCG CCGCACTTAT GACTGTCTTC TTTATCATGC
AACTCGTAGG ACAGGTGCCG GCAGCGCTCT TCCGCTTCCT CGCTCACTGA CTCGCTGCGC
TCGGTCGTTC GGCTGCGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTTATCC
ACAGAATCAG GGGATAACGC AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG
AACCGTAAAA AGGCCGCGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCCC TGACGAGCAT
CACAAAAATC GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATACCAG
GCGTTTCCCC CTGGAAGCTC CCTCGTGCGC TCTCCTGTTC CGACCCTGCC GCTTACCGGA
TACCTGTCCG CCTTTCTCCC TTCGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCATAGCTC ACGCTGTAGG
TATCTCAGTT CGGTGTAGGT CGTTCGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT
CAGCCCGACC GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC
GACTTATCGC CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC
GGTGCTACAG AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT ACACTAGAAG GACAGTATTT
GGTATCTGCG CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC
GGCAAACAAA CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTTGTTT GCAAGCAGCA GATTACGCGC
AGAAAAAAAG GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG
AACGAAAACT CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTCACCTAG
ATCCTTTTAA ATTAAAAATG AAGTTTTAAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG
TCTGACAGTT ACCAATGCTT AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCGT
TCATCCATAG TTGCCTGACT CCCCGTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA
TCTGGCCCCA GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA
GCAATAAACC AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCCTGCAAC TTTATCCGCC
TCCATCCAGT CTATTAATTG TTGCCGGGAA GCTAGAGTAA GTAGTTCGCC AGTTAATAGT
TTGCGCAACG TTGTTGCCAT TGCTACAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG
GCTTCATTCA GCTCCGGTTC CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC
AAAAAAGCGG TTAGCTCCTT CGGTCCTCCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCGCAGTG
TTATCACTCA TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTCATGCC ATCCGTAAGA
TGCTTTTCTG TGACTGGTGA GTACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGCGA
CCGAGTTGCT CTTGCCCGGC GTCAATACGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA
AAAGTGCTCA TCATTGGAAA ACGTTCTTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG
TTGAGATCCA GTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT
TTCACCAGCG TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGAATA
AGGGCGACAC GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT
TATCAGGGTT ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA
ATAGGGGTTC CGCGCACATT TCCCCGAAAA GTGCCACCTG ACGCGCCCTG TAGCGGCGCA
TTAAGCGCGG CGGGTGTGGT GGTTACGCGC AGCGTGACCG CTACACTTGC CAGCGCCCTA
GCGCCCGCTC CTTTCGCTTT CTTCCCTTCC TTTCTCGCCA CGTTCGCCGG CTTTCCCCGT
CAAGCTCTAA ATCGGGGGCT CCCTTTAGGG TTCCGATTTA GTGCTTTACG GCACCTCGAC
CCCAAAAAAC TTGATTAGGG TGATGGTTCA CGTAGTGGGC CATCGCCCTG ATAGACGGTT
TTTCGCCCTT TGACGTTGGA GTCCACGTTC TTTAATAGTG GACTCTTGTT CCAAACTGGA
ACAACACTCA ACCCTATCTC GGTCTATTCT TTTGATTTAT AAGGGATTTT GCCGATTTCG
GCCTATTGGT TAAAAAATGA GCTGATTTAA CAAAAATTTA ACGCGAATTT TAACAAAATA
TTAACGTTTA CAATTTCCCA TTCGCCATTC AGGCTGCGCA ACTGTTGGGA AGGGCGATCG
GTGCGGGCCT CTTCGCTATT ACGCCAGCCC AAGCTACCAT GATAAGTAAG TAATATTAAG
GTACGGGAGG TACTTGGAGC GGCCGCAATA AAATATCTTT ATTTTCATTA CATCTGTGTG
TTGGTTTTTT GTGTGAATCG ATAGTACTAA CATACGCTCT CCATCAAAAC AAAACGAAAC
AAAACAAACT AGCAAAATAG GCTGTCCCCA GTGCAAGTGC AGGTGCCAGA ACATTTCTCT
                                  ATCGATA
```

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

6.1.2 Preparación de células competentes

1.- De un cultivo de *Escherichia coli* DH5α se tomó una asada y se inoculó un tubo cónico conteniendo 15 ml de medio LB sin antibiótico. Se incubó durante 24 horas a 37°C.

2.- Al siguiente día se toma 1 ml de la suspensión bacteriana y se agregó en 30 ml de medio LB también sin antibiótico y se mantuvo el crecimiento hasta la fase log a 37°C a 280 rpm por 2-3 horas. Luego se distribuyó a tubos cónicos estériles de 15 ml.

3.- Posteriormente se centrifuga a 7000 rpm por 10 minutos.

4.- Se eliminó el sobrenadante y se agregó al paquete celular 6 ml de $CaCl_2$ 0.1 M y se resuspendió y se mantuvo en baño de hielo por 30 minutos.

5.- Después se centrifugó a 7000 rpm por 10 minutos y se elimina el sobrenadante.

6.- El paquete celular obtenido se resuspendió con 1 ml de $CaCl_2$ 0.1 M y se mantienen las células a 4°C por toda la noche.

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

1.- De la suspensión de células competentes obtenida se tomaron 100 μL y se mezclaron con 1μL del plásmido pNFKB-luc y posteriormente se mantuvo en hielo por 30 minutos.

2.- Después se expusó la suspensión a un choque térmico de 42 °C por exactamente 1 minuto.

3.- Luego se volvió a colocar el vial con la suspensión en hielo por 1 minuto.

4.- Después se agregaron 500 μL de medio LB sin antibiótico y se incubaron a 37°C por 1 hora. En agitación (500 rpm en el Thermomixer 5436).

5.- Luego se extrajeron 200 μL de la suspensión celular conteniendo el plásmido y se agregaron en 5 ml de agar o caldo LB adicionado con penicilina (50 μg/ml).

6.- Se incuban a 37°C por 24 horas.

6.1.4 Obtención de plásmidos de colonias múltiples por miniprep

1.- En tubos conteniendo 5 ml de caldo LB adicionado con ampicilina se inocularon con *Escherichia coli* DH5α conteniendo el vector pNFKB-luc; posteriormente se incubaron a 37°C por toda la noche.

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

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

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

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

6.- Se corrió la muestra a 100 V hasta ¾ partes, para finalmente revelar el gel sumergiéndolo en bromuro de etidio.

6.1.5 Purificación de plásmidos mediante miniprep de acetato de potasio

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6.1.6 Maxiprep con acetato de amonio

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

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

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

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

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

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

5.- Se centrifugó por 5 minutos hasta que todo el líquido pasó a través del filtro. Después fue vacíada.

6.- Se agregaron 500 µl de solución de lavado.

7.- Se volvió a centrifugar por 5 segundos y se vació el tubo.

8. Se centrifugó el turbo cartucho por cuatro minutos mas para remover la solución de lavado.

9. Se removió el turbo cartucho del tubo y se puso en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml.

10. Se agregaron 30 µl de solución de elusión de turbo geneclean directamente sobre la resina embebida en la membrana y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos.

11. Se centrifugó por 1 minuto para transferir el ADN eluido para el tubo receptor. Se descartó el turbo cartucho y se cerro el tubo receptor de elusión.

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

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

11. El precipitado se lavó después con 1 ml de etanol al 70%.

12. La pastilla fue secada por 20 minutos a 60°C y se resuspende con TE 1X.

13. Se observó el ADN en gel de agarosa al 0.85%.

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

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

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

Reactivo	Volumen (µl)
H_2O PCR	72.6
Amortiguador	10.0
$Mgcl_2$	3
dNTPs	1
Oligo 1	2
Oligo 2	2
ADN	4
TOTAL	**100**

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

Oligo 1 (5′-3′)

ctg gcc tct gat tgg tcc cga tcg

Oligo 2 (5′-3′)

gct agc cgc cat gga gac caa cac cc

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

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

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

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

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

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

7.- Se centrifugó por 5 segundos y se vació el tubo.

8. Se centrifugó el turbo cartucho por cuatro minutos mas para remover la solución de lavado.

9. Se removió el turbo cartucho del tubo y se puso en un nuevo tuvo eppendorf de 1.5 ml.

10. Se agregaron 30 µl de solución de elusión de turbo geneclean directamente sobre la resina embebida en la membrana y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos.

11. Se centrifugó por 1 minuto para transferir el ADN fluido para el tubo receptor. Se descartó el turbo cartucho y se cerro el tubo receptor de elusión.

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

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

ng de inserto= ((ng Vector)(Kb inserto))/Kb Vector

ng de inserto de promotor de hsp70= ((50 ng)(0.28 Kb hsp70))/3.0 Kb Vector

ng de inserto de promotor de hsp70=4.66

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

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

Reactivo	**Reactivo**
pGEM T	**1**
Mezcla de PCR	**4**
Ligasa	**1**

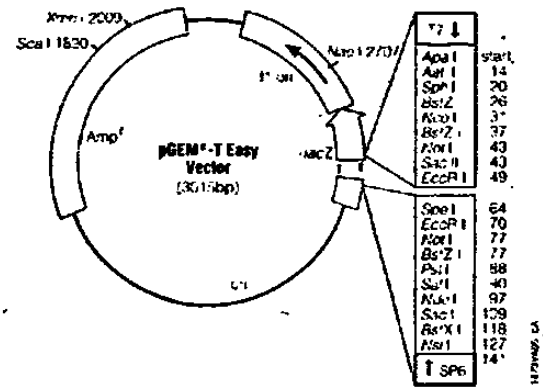

Figura 3. Mapa con sitios de restricción del vector pGEMT-easy (No Cat A1360)

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

1.- De la suspensión de células competentes obtenida se tomaron 100 µl y se mezclaron con 1µl del producto de ligación conteniendo pCEM, posteriormente se mantuvo en hielo por 30 minutos.

2.- Después se expone la suspensión a un choque térmico de 42 °C por exactamente 1 minuto.

3.- Luego se vuelve a colocar el vial con la suspensión en hielo por 1 minuto.

4.- Después se agregan 500 µL de medio LB sin antibiótico y se incuba a 37°C por 1 hora en agitación (500 rpm en el Thermomixer 5436).

5.- Luego se extraen 200 µL de la suspensión celular conteniendo el plásmido y se agregan en 5 ml de agar o caldo LB adicionado con penicilina (50 µg/ml).

6.- Se incuban a 37°C por 24 horas para posteriormente determinar presencia de plásmidos en transformantes mediante miniprep múltiple.

6.1.14 Obtención de plásmidos de colonias múltiples por miniprep

1.- En tubos conteniendo 5 ml de caldo LB adicionado con ampicilina se inocularon con *Escherichia coli* DH5α conteniendo el vector pCEM; posteriormente se incubaron a 37°C por toda la noche.

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

3.- Transcurrido dicho tiempo se elimina el sobrenadante y el paquete celular se resuspende con 70 μl de colorante Dye.

4.- Posteriormente se agregan 40 μl de fenol saturado y se mezcla vigorosamente en el vortex por aproximadamente 1 minuto.

5.- Después se centrifuga a 13000 rpm por 3 minutos y se elimina el precipitado, al sobrenadante se le agregan 12 μl y se coloca en un carril de un gel de agarosa al 0.8%.

6.- Se corre la muestra a 100 V hasta ¾ partes, para finalmente revelar el gel sumergiéndolo en bromuro de etidio.

6.1.15 Purificación de plásmidos mediante el miniprep con Acetato de Potasio

1.- Se inoculan 20 μL de *Escherichia coli* conteniendo el vector pCEM en un tubo cónico con 15 ml de medio LB adicionado con ampicilina a una concentración de 50 μg/ml y se incuba por 24 horas bajo agitación a 37 °C.

2.- Transcurrido dicho periodo, las células se centrifugaron a 2500 rpm por 20 minutos.

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

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

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

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

7.- El sobrenadante obtenido fue transferido a un tubo eppendorf estéril y se agregaron 350 µl de PG 8000 y se incuba en hielo por 30 minutos.

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

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

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

11.- El botón final con el plásmido fue secado a 60 °C por 10 minutos y se resuspendió con 20 µL de agua para PCR, para posteriormente llevar la inserción de hsp70 en pNFKB-luc sin su promotor y obtener pCEM.

6.1.16 Clonación del promotor de hsp70 en pNFKB-luc

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

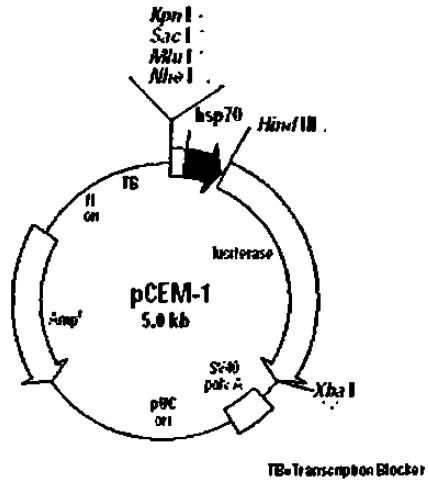

Figura 4 Mapa con sitios de restricción del vector pCEM

6.1.17 Digestión parcial de pCEM mediante las enzimas NheI y HindIII

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

6.1.18 PCR para detección del promotor de hsp70

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

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

Reactivo	Volumen (µl)
H_2O PCR	72.6
Amortiguador	10.0
$Mgcl_2$	3
dNTPs	1
Oligo 1	2
Oligo 2	2
ADN de vector	4
TOTAL	100

Después de haber hecho la mezcla los tubos de reacción fueron puestos en el termociclador con el programa que se presenta en la tabla 5.

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

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

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

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

Antes de la transfección, se agregaron $6x10^4$ células por ml en placas para transfección de 6 pozos de 35 mm, y se incubaron las células a 37 °C en una atmósfera de CO_2 hasta obtener una confluencia celular de un 70-80%. Después se agregaron 0.4 μg de ADN en 100 μl de medio D-MEM libre de suero con 0.1 mM NEAA. La mezcla obtenida se incubó

a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente se diluyeron 10 μl de Lipofectin en 100 μl un medio libre de suero en un segundo tubo. La mezcla obtenida se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Después mientras se formaron los complejos, se sustituyó el medio de las células con 200 μl de medio libre de suero. Realizado esto se obtuvo el complejo ADN-mezcla de lípidos contenido en medio fresco y se incubó a 37 °C al 5% de CO_2 por 3 horas. Transcurrido este tiempo fueron agregados 1 ml de medio con 10% de FBS (Suero fetal bovino). Posteriormente a las 24 horas después de la transfección se cosecharon las células.

6.2.1 Sistema de exposición a CEM

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

Después de la exposición las células se mantuvieron en reposo a 37 °C al 5% de CO_2 durante 30 minutos.

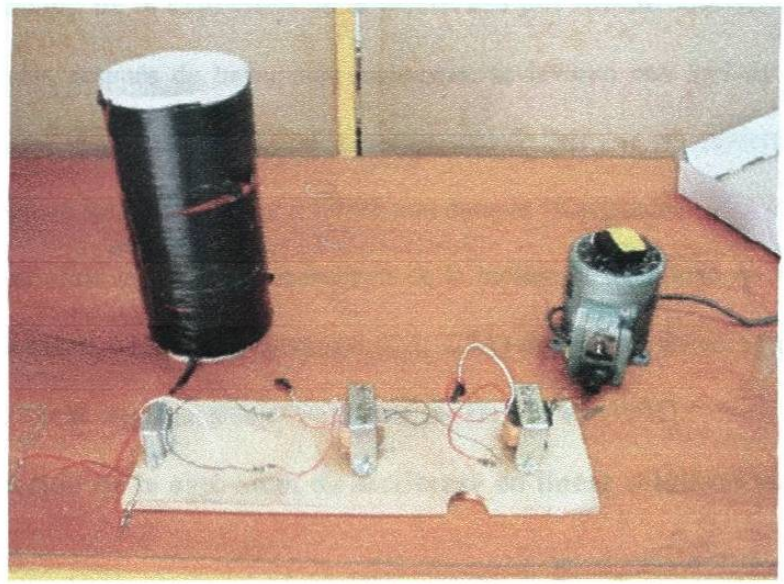

Figura 5. Sistema de exposición a CEM para producir intensidades de 8 y 80 μT

6.2.2 Exposición de líneas celulares a choque térmico

Las líneas celulares después de 48 h de haber sido transfectadas se incubaron a 43°C por 20 min. Posteriormente se dejaron reposar las células por 30 minutos a 37°C con 5% de CO_2.

6.2.3 Exposición del efecto combinado de choque térmico y CEM

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

6.2.4 Detección de la expresión de la luciferasa por luminometría

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

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

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

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

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

Preparación de las muestras de líneas celulares

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

Preparación del Gel

Poliacrilamida 12 % (5 ml)

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

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

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

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

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

2.- bloquear la membrana con Tween 20/PBS al 2 % mas leche de vaca en polvo al 1 %, por 60 min.

3.- lavar la membrana con PBS 1X, hasta eliminar el Tween.

4.- adicionar el primer anticuerpo, preparándolo a la dilución deseada, los sueros utilizados a una dilución de 1:1000. Estas diluciones son preparadas con PBS 1X. El primer anticuerpo contra luciferasa se deja 3 horas con agitación suave.

5.- Después se eliminó el anticuerpo.

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

7.- Eliminar el Tween, con PBS.

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

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

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

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

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

6.3 Activación del promotor por CEM *in vivo*

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

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

6.3.1 Maxiprep con acetato de amonio para obtener pCEM

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

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

6.3.2 Inyección de pCEM en *Mus musculus*

Los ratones utilizados en este trabajo, fueron inyectados en el músculo de la pierna de la tibia anterior con 50 µg de vector diluído en NaCl al 0.85%, después de 30 segundos de haber inyectado se sometió el ratón a descarga de pulsos eléctricos. (Tabla 6)

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

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

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

6.3.3 Sistema de exposición *in vivo*

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

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

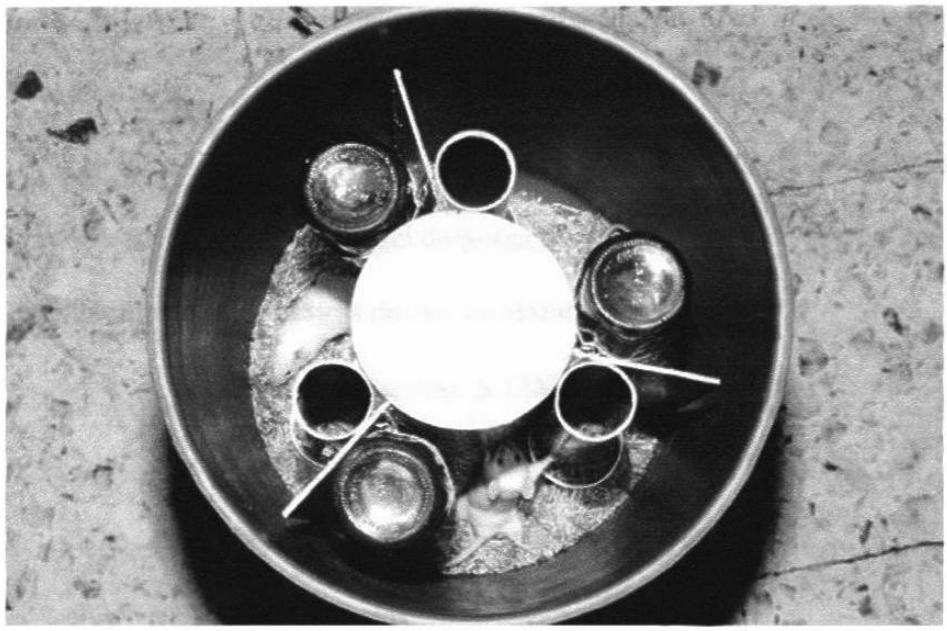

Figura 6. Fotografía que ilustra una vista superior del solenoide utilizado para exposición *in vivo* a CEM de 60 Hz. Se aprecian los tres compartimentos equidistantes donde se colocan los animales para ser sometidos al tratamiento magnético.

6.3.4 Homogenizado de tejido y medición de unidades relativas de luciferasa

Concluído el tiempo de la exposición al CEM, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Posteriormente se extrajo mediante la utilización de un equipo de disección el músculo y se introdujo en 1 tubo de 80X100 estéril, después en baño de hielo se agregó 1 ml de amortiguador de lisis 1X y se homogenizó completamente utilizando homogenizador (Biospec Products, Tearor Tissue, Model 985-370). Después se centrifugo a $14X10^3$ rpm durante dos minutos; para luego pasar el sobrenadante a otro tubo y se mantuvo en baño de hielo. Posteriormente se tomaron 50µl de sobrenadante y se mezclaron con 100µl de D-luciferina para después de 15 segundos leer un luminómetro Turner modelo 20e (Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA).

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

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

Preparación de las muestras de homogenizados.

- Centrifugar las muestras a $12X10^3$ revoluciones por 5 min.
- Descartar el sobrenadante
- Añadir 100 µl de amortiguador de lisis SDS gel 2X
- Mezclar en el vortex
- Calentar en agua a punto de ebullición por 10 min.
- Pasar a hielo (congelar si las muestras no se van a utilizar inmediatamente).

Preparación del Gel

Poliacrilamida 12 % (5 ml)

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

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

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

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

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

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

3.- Lavar la membrana con PBS 1X, hasta eliminar el Tween.

4.- Adicionar el primer anticuerpo, preparándolo a la dilución deseada, los sueros utilizados a una dilución de 1:1000. Estas diluciones fueron preparadas con PBS 1X, el primer anticuerpo contra luciferasa se dejó 3 horas con agitación suave.

5.- Después se eliminó el anticuerpo.

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

7.- Eliminar el Tween, con PBS.

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

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

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

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

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

6.4 Diseño experimental

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

Grupo 1= Control negativo sin transfectar.

Grupo 2= Control positivo transfectado con pCEM

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

Grupo 4= Expuesto a CEM durante 20 minutos.

Cada grupo constó de 3 repeticiones.

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

Grupo 1= Control negativo sin transfectar.

Grupo 2= Control positivo transfectado con pCEM

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

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

Cada grupo constó de 3 repeticiones.

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

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

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

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

Se utilizaron 3 ratones por cada grupo.

6.5 Procesamiento Estadístico

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

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

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

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

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