



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

REPORTE DEL SERVICIO SOCIAL
POR ACTIVIDADES RELACIONADAS CON LA PROFESIÓN

**Implicaciones funcionales de la inhibición
de RANKL en la regulación de la población troncal
de cáncer de mama LGR4+ y/ RANK+.**

QUE PRESENTA EL ALUMNO (A)

ROBLEDO BECERRIL BRYAN EMANUEL

2183069750

ASESORES

Jaime Amadeo Bustos Martínez

Karla Itzel Vázquez Santillán

México, D.F.

Fecha 11/12/2022

Introducción

El cáncer engloba un conjunto de al menos 100 trastornos diferentes entre sí; de los cuales dos tienen una mayor incidencia en la población mexicana siendo estos el cáncer de mama y el cáncer de próstata. Por lo que es necesario cada vez más, la presencia de profesionales en este ámbito de la salud para poder hacerle frente a este tipo de afecciones que afectan a más pobladores cada día. En este reporte de servicio social revisaremos cómo es ese proceso de formación que permiten tanto el desarrollo de una mente como actitud crítica, una concepción científica, creativa, e interdisciplinaria entre otras cualidades las cuales lograron su desarrollo a través de las actividades que se desempeñaron en el laboratorio de epigenética, en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

Objetivos Generales

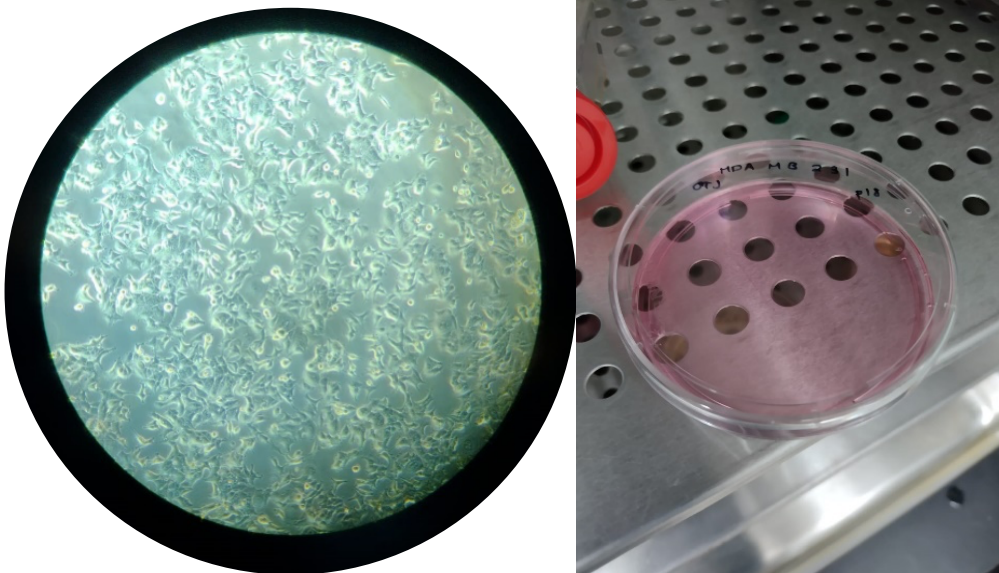
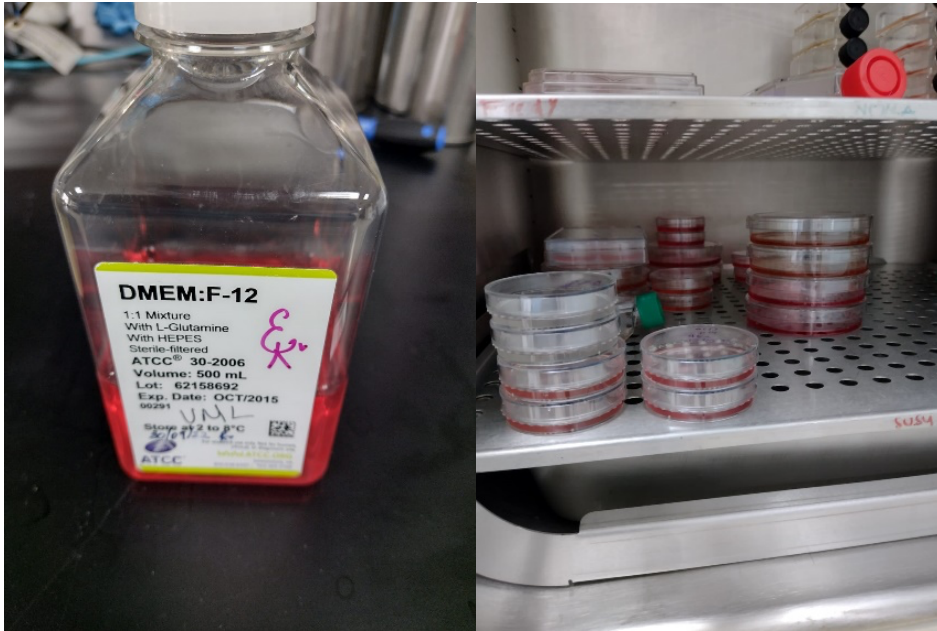
- Aprender técnicas de cultivo y mantenimiento de líneas celulares.
- Desarrollo de células de cáncer de mama (MCF7, LUMINAL A) estables, transfectadas con LGR4, PCDNA Y RANK.
- Aprender técnicas moleculares, así como su interpretación de los resultados.
- Evaluación de primers R y F.
- Evaluar la expresión del receptor LGR4+ en células transfectadas

Metodología utilizada

Cultivo celular.

Esta técnica es empleada para la obtención de células individuales en suspensión a partir de un tejido, ya sea empleando métodos mecánicos o enzimáticos y su posterior incubación en un medio de cultivo líquido o sólido (Freshney, 2000).

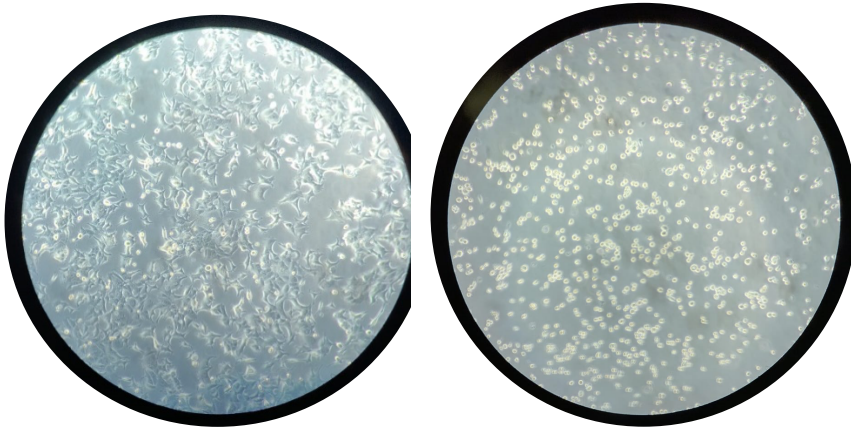
En los primeros meses se utilizó el medio DMEM como medio basal para favorecer el crecimiento de las células y su adecuado desarrollo. Este medio contiene una concentración alta de aminoácidos y vitaminas, así como la adición de antibióticos y la suplementación con suero fetal bovino.



Medio DEMEM, incubadora, toma al microscopio de Línea celular MCF7 de cáncer de mama y cultivo de células MCF7

Tripsinización.

Es un proceso utilizado en cultivos celulares para separar las células adherentes del sustrato de cultivo usando tripsina, una enzima serina proteasa que degrada las proteínas de adhesión.



Células MCF7 Antes de tripsimizar y después de tripsimizar.

Cuantificación de células.

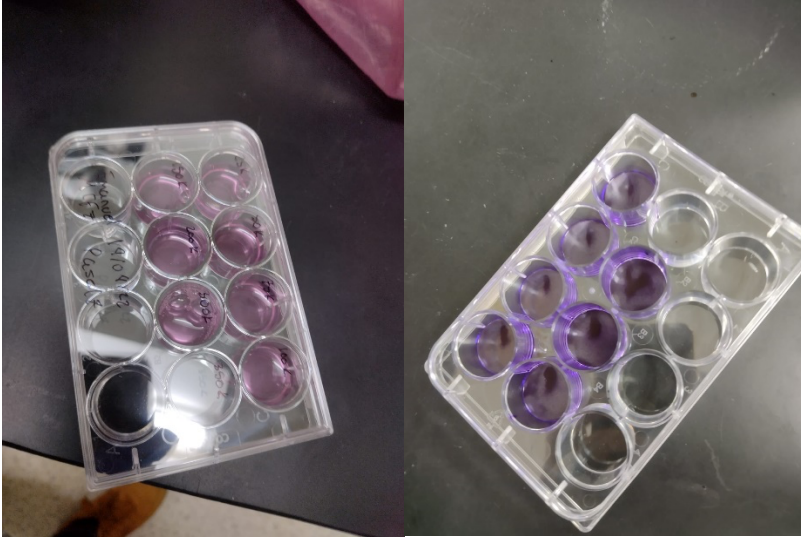
Esta técnica se emplea principalmente para el recuento de cualquier tipo de célula en 1 ml. La cámara de Neubauer o hemocitómetro es un aparato principalmente de vidrio el cual cuenta con dos superficies reticuladas (retículos) para el conteo de las células y dos columnas laterales de una altura de 0,1 mm por encima del retículo (Gomes, 2019).



Cámara de Neubaver para el conteo celular y Microscopio.

Tinción celular con cristal violeta.

La tinción con cristal violeta es un ensayo rápido para evaluar la viabilidad celular bajo diversas condiciones de estimulación (Geserick, 2009).

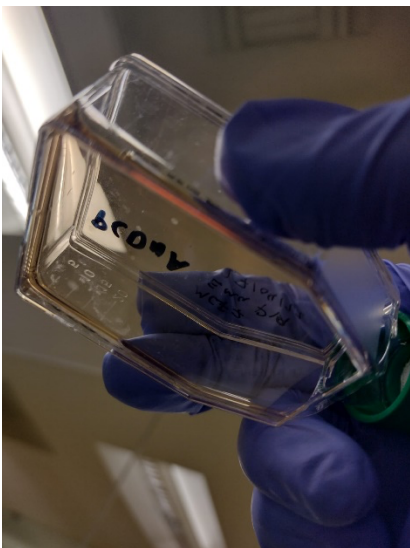


Placas de cultivo con diferente concentración de células MCF7.

Transfección.

La transfección es un proceso que consiste en introducir moléculas de DNA en una célula, cuyo producto final es la transcripción o traducción (Iglesias et al., 2015).

En el laboratorio se utilizó DNA o plásmido provenientes de bacterias de una cepa de *Escherichia coli* llamada XL1-Blue en las cuales se clono el marco de lectura abierta de RANK y LGR4.



Células MCF7 transfectadas con pCDNA.

Criopreservación celular.

Es una técnica mediante la cual células o tejidos son conservados a muy bajas temperaturas -70 , para poder mantener su fisiología intacta por un largo periodo de tiempo (Pérez et al., 2016). En el laboratorio se utiliza DMSO junto con suero fetal bovino para criogenizar las células en alícuotas de 1.5 ml.

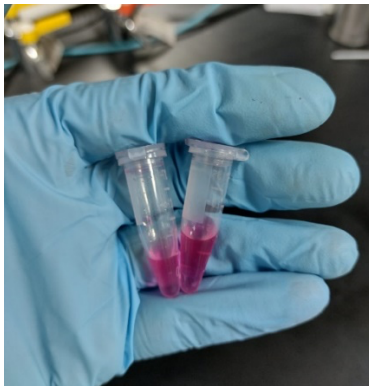


Alícuotas de células MCF7 (transfectadas: LGR4 y PCDNA) y Equipo de red fría ultra congelador (-40°C a -80°C).

Extracción de RNA.

Consiste en la separación de RNA del DNA entre otras moléculas con el fin de cuantificarlo, manipularlo o hacer el análisis de la expresión génica.

En esta técnica el procedimiento de extracción de ARN consiste en el lisado de las células y la homogenización de la muestra para liberar el ARN, obtención del ARN por separación de fases utilizando Trizol y cloroformo, precipitación con isopropanol, lavados en alcohol, y re suspensión en agua libre de nucleasas (Dávila et al., 2020).



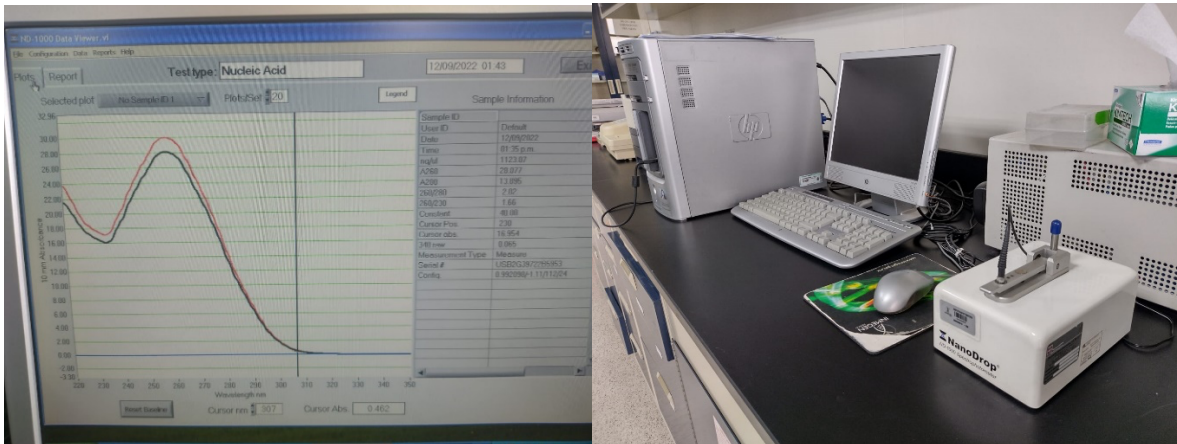
Muestra tratada con trizol/cloroformo

Tratamiento con DNasa

La DNasa libre de RNasa RQ1 (calificada para ARN) es una DNasa I (endonucleasa) que degrada tanto el ADN monocatenario como el bicatenario, produciendo oligonucleótidos 3'-OH. (La DNasa libre de RNasa RQ1 se puede usar en aplicaciones en las que mantener la integridad del ARN es fundamental). Esta DNasa es adecuada para aplicaciones como la producción de fragmentos aleatorios, la escisión del ADN genómico, eliminación de la plantilla de ADN después de la transcripción in vitro y eliminación de ADN de muestras de ARN antes de aplicaciones como RT-PCR (Protocolo 9PIM610, 2018).

Cuantificación RNA/cDNA.

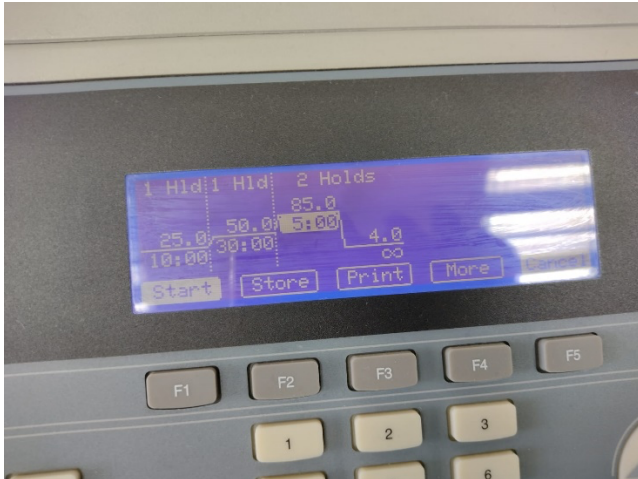
Técnica utilizada con ayuda de un espectrofotómetro de bajo volumen que cuantifica la concentración y pureza del RNA midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm.



Resultados de un análisis cuantitativo de RNA y equipo para llevar a cabo la cuantificación.

RTPCR.

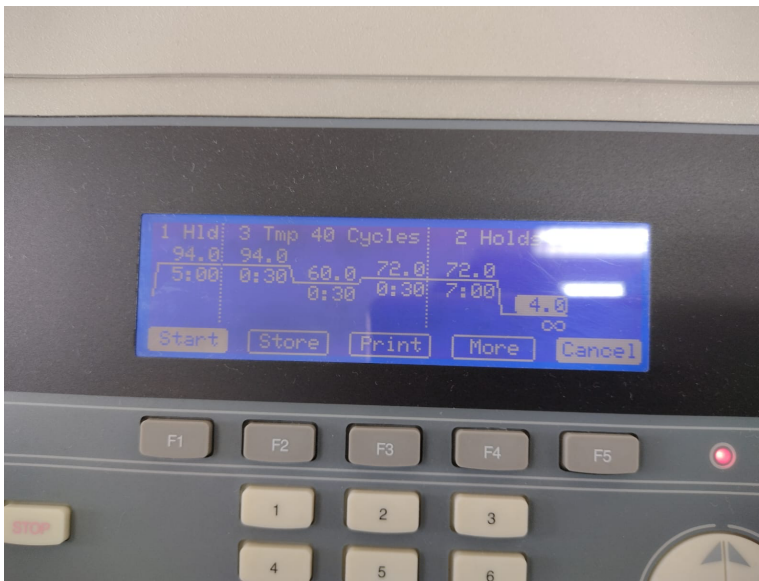
Se utiliza para generar una gran cantidad de copias de ADN proceso llamado amplificación. En la RT-PCR se retrotranscribe una hebra, cadena o banda de ARN en ADN complementario (cDNA), usando una enzima llamada transcriptasa inversa (Protocolo K1641, 2012).



Programa en el termociclador para la RTPCR.

PCR.

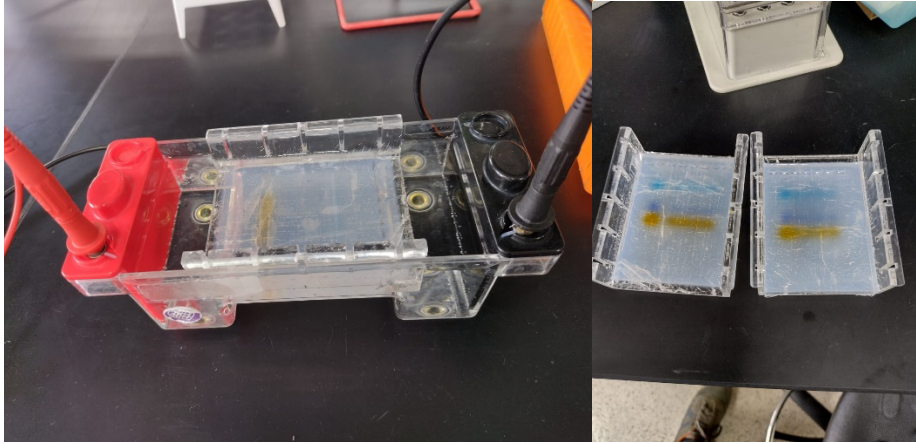
La reacción en cadena de la polimerasa, permite obtener in vitro millones de copias de un fragmento de DNA a partir de una sola molécula. Inicia con la desnaturalización de la doble hélice de DNA cuando se eleva la temperatura a 94° u 96° C. Una vez separadas las cadenas se alinean los iniciadores a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar para ello se baja la temperatura a 40° y 60° C. Finalmente se sintetiza una nueva cadena en sentido 5' a 3' para lo cual se incrementa la temperatura a 72°C, ya que es la temperatura optima a la cual la DNA polimerasa se une a los iniciadores y comienza la extensión. Estas 3 etapas (Desnaturalización, alineamiento y extensión) se repiten sucesivamente en cada nuevo ciclo amplificando la región de interés (Serrato et al., 2014).



Programa en de PCR en termociclador.

Electroforesis.

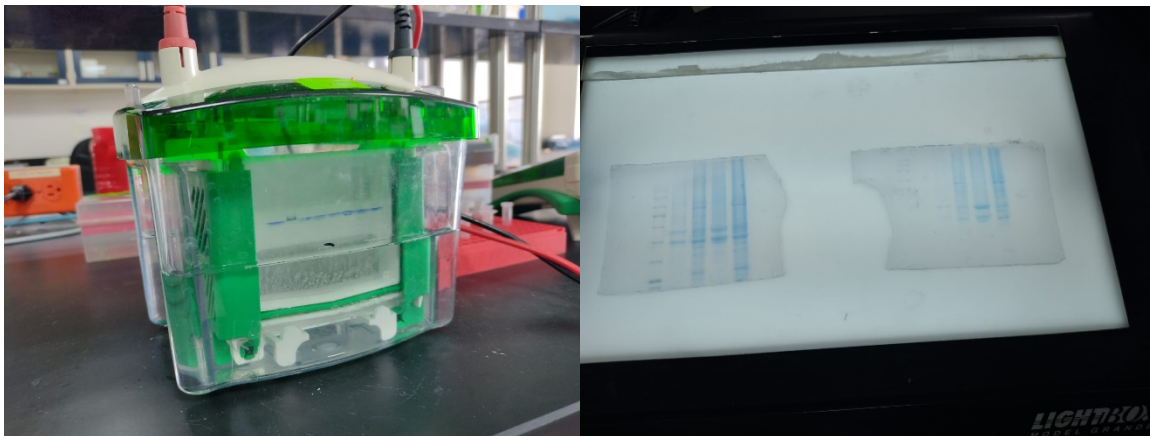
Es una técnica para separación de biomoléculas (ácidos nucleicos o proteínas) según su movilidad y naturaleza en un campo eléctrico sobre una matriz porosa cuya composición depende de la biomasa a analizar. Para la separación de ácidos nucleicos se utilizan matrices de agarosa y para la separación de proteínas se utiliza matrices de poliacrilamida (Fierro, 2014).



Electroforesis en gel de agarosa

Técnica de transferencia blotting (Western blot).

Se utiliza para detectar proteínas utilizando anticuerpos; también llamada inmunoblotting. Detecta determinantes antigénicos en moléculas proteínicas utilizando anticuerpos, también detecta modificaciones postraduccionales, como la fosforilación o glucosilación (Milton, 2015).

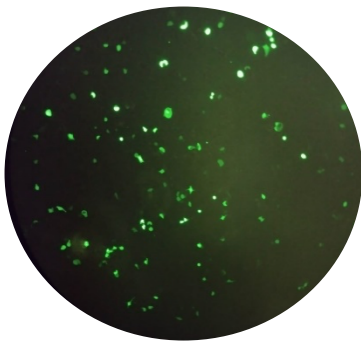


Matriz de Western blot.

Actividades Realizadas

-Familiarización con el equipo, protocolos y observaciones al microscopio.

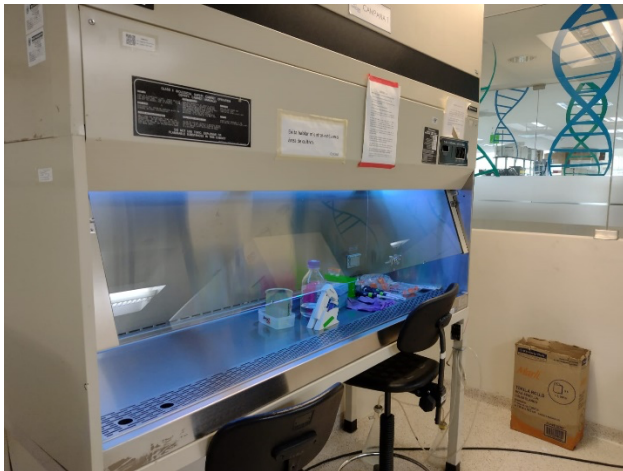
Al principio del servicio social mi primera actividad fue relacionarme y familiarizarme con todo el equipo del laboratorio para saber su utilidad, así como sus debidos cuidados y atenciones. Conforme avanzaron los días pase de hacer observaciones de las técnicas y sus principios a él ¿por qué? se utiliza y realizar yo mismo dichas técnicas con ayuda de protocolos y la doctora Karla Vázquez. También me familiarice realizando observaciones en el microscopio de diferentes metodologías y células.



Inmunofluorescencia

-Cultivo celular y mantenimiento de líneas celulares.

Durante toda mi instancia tuve en cuidado células de cáncer de mama de la línea celular MCF7 de tipo luminal A, donde hacia cambios de medio, tripsinización, conteo celular y siembra en varias cajas Petri. Al inicio empecé utilizando medio DMEM para las células, después en la transfección comencé a utilizar medio RPMI. Para el cuidado de estas células es indispensable realizar cambios de medio al menos dos veces por semana, ya que son muy sensibles y tienen un rápido crecimiento. Estas mismas células las utilice para realizar otro tipo de técnicas como la extracción de RNA, Tinción y transfecciones.



Campana de cultivo.

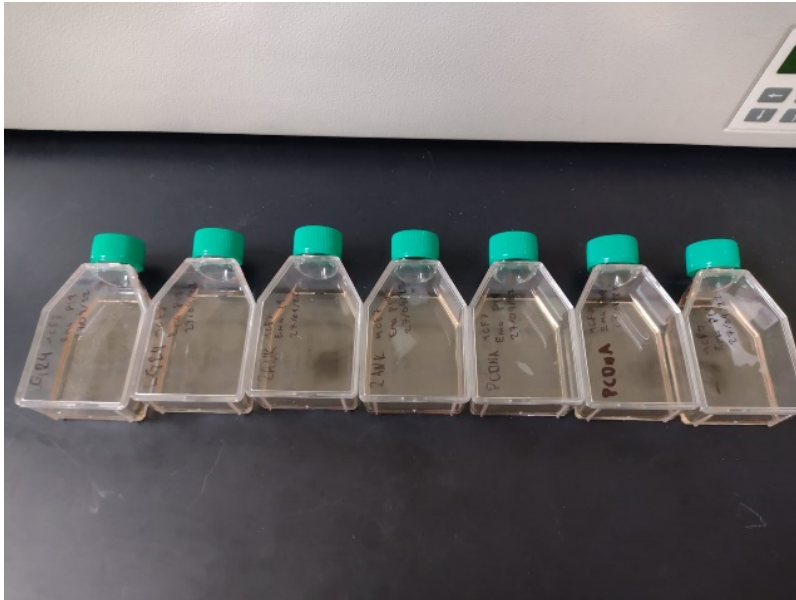
-Transfecciones en células MCF7 con LGR4, RANK, PCDNA

Una vez había dominado el cultivo celular, se me dio la tarea de realizar en dos placas de 6 pozos, 7 siembras con la misma concentración de células para realizar la transfección de: 2 siembras con LGR4, 2 siembras con RANK, 2 siembras con PCDNA y 1 siembra como control.

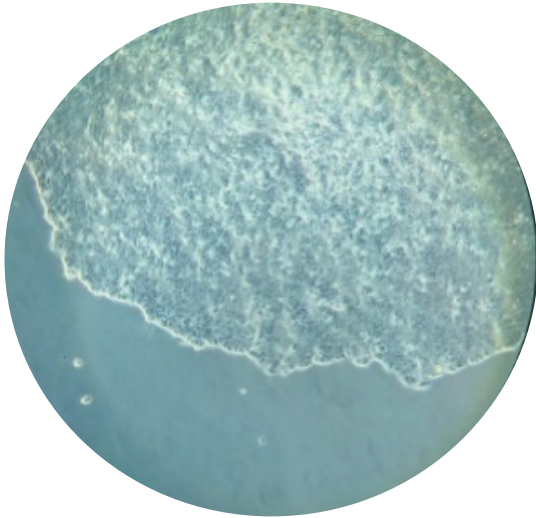
Una vez realizada la siembra, días después fueron tratadas con G418 (Geneticina), para hacer las células estables y solo permanecieran las células transfectadas con LGR4, RANK y PCDNA.

-Células estables.

Estas células tardaron en ser “estables” alrededor de 3 meses, dado el medio donde estaban creciendo. Al principio de la transfección conforme iba su concentración celular en las cajas en aumento, se iban trypsinizando, tratando con Geneticina y haciendo cambio de placa según se viera requerido. Al final dado la complejidad de cultivo para las células MCF7 tranfectadas con RANK, estas perecieron y solo llegaron a expandirse las transfectadas con LGR4 y PCDNA.



Células MFC7 transfectadas después del primer cambio a una placa más grande.



Vista al microscopio de colonia de células MCF7 transfectadas.

-Evaluación de primers R y F.

A la par de cuidar las células transfectadas, realizaba otras técnicas las cuales incluían extracción de RNA, cuantificación de RNA, RT-PCR, PCR en punto final, electroforesis en gel de agarosa y PCR cuantitativa. Con el fin de corroborar el funcionamiento y correcto alineamiento de los primers Forward y Reverse.

Primer	Tem	Longitud del producto
Twist	61	224
Nanog	57	155
Fibronectin	60	147
VIM	63	281
Relb	56	160
RBBP7	59	192
SUB1	56	199
CCT7	57	181
EIF4A3	57	147
IL2	57	148

-Seminarios y cursos

Dada la complejidad de la teoría, fue requerido prepararse y estudiar temas como líneas germinales del cáncer, diagnóstico del cáncer de mama, ciclo celular, técnicas como RT-PCR, PCR cuantitativa, entre otras actividades que involucraban mi participación como la asistencia a cursos como el curso de RNAs no codificantes, introducción a la medicina genómica, Linux. Entre estas actividades también discutíamos artículos científicos relacionados con el sistema RANK/RANKL para adoptar una mejor postura sobre el análisis de resultados e interpretación.

Objetivos y metas alcanzadas

El tiempo de prestación de servicio es relativamente corto para ver la finalización del proyecto en el que estoy participando, sin embargo, en lo personal me siento muy satisfecho con las labores que desempeñe en el instituto.

Uno de los objetivos logrados es familiarizarme con todo el equipo del laboratorio, así como reactivos, protocolos y conocer mas acerca de la genómica del cáncer, así como una nueva forma de ver la medicina genómica e involucrarme en el problema que hoy en día significa esta enfermedad.

Entender tanto los protocolos, como el porqué de la realización de las técnicas moleculares y comprender los resultados es uno de los objetivos logrados. Así como el correcto cuidado de células de cáncer de mama (MCF7, luminal A), tranfecciones de marcadores de troncalidad LGR4, RANK, PCDNA en células MCDF, la creación de células estables Tratadas con Geneticina (G418).

Resultados y Conclusiones

El correcto funcionamiento de los primers depende de la TM necesaria para su alineamiento, ya que con la temperatura optima se minimiza la formación de dímeros de cebadores. Estos dímeros se forman cuando hay complementariedad de bases en el extremo 3'. En los primer evaluados únicamente Twist presento dímeros utilizando la TM que marcan los diseñadores del primer, por lo que tendría que diseñarse un nuevo primer Twist para su utilización en las PCR.

Análisis de PCR.

Para evaluar la expresión de los receptores LGR4 y PCDNA en las células transfectadas, se realizó 2 PCR cuantitativas (Tabla 1) utilizando los primers GAPDH y LGR4. Los resultados arrojaron que se inhibe la expresión de LGR4 hasta en un 80% (Grafico 1), por lo que es necesario realizar más pruebas para corroborar la veracidad de estos resultados.

Tabla 1. Resultados de la PCR cuantitativa

	GAPDH	LGR4	dct	ddct	Fold change
PCDNA	30.406	32.639	2.233	0.000	1.000
LGR4	24.898	29.428	4.530	2.297	0.204

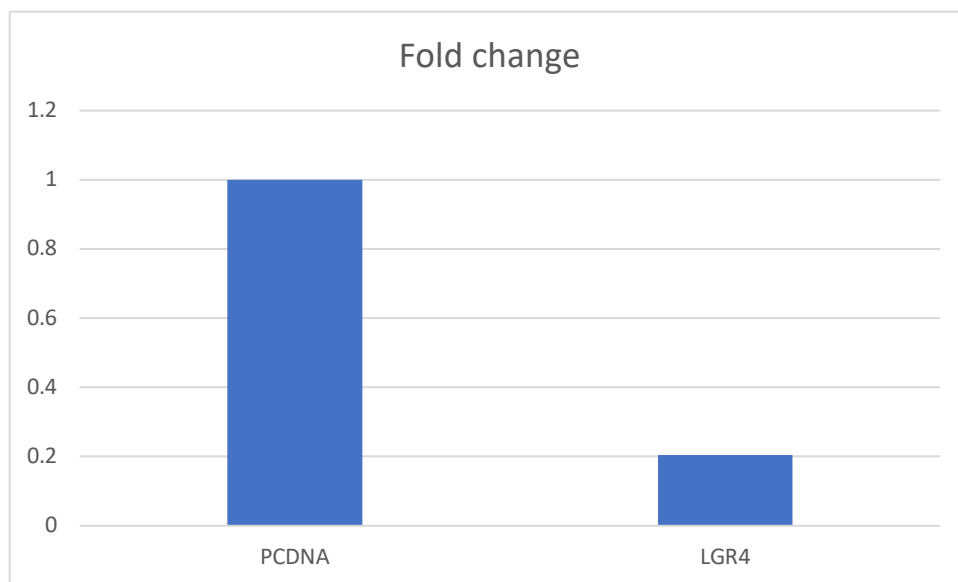


Grafico 1. Tasa de cambio. Esta tasa es el cambio de acuerdo a la expresión, si el cambio es positivo se refiere que el gen se encuentra sobre expresado, por otra parte, si el cambio es negativo significa que el gen se está inhibiendo.

Referencias

Serrato Díaz Alejandra, Lluvia Flores Rentería, Jaime Aportela Cortez y Edgar Sierra Palacios, 2014. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Pag 53-73. ISBN: 978-607-8246-72-4

Dávila Carlín Oscar, Sánchez Pinto Francisco 2020. Guía de Procedimiento Extracción de ARN a partir de Sangre Periférica y Médula Ósea. Código:GP-007/INSN-SB/USDT/SUSD-GE-V.01

Fierro Fierro Francisco, 2014. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Pag 27-51. ISBN: 978-607-8246-72-4

Freshney R. Ian. 2000. Culture of animal cells a manual of basic technique; 4^a Ed. New York Wiley-Liss. 1-6, 105-120.

Geserick P, Hupe M, Moulin M, Wong WW, Feoktistova M, Kellert B, Gollnick H, Silke J, Leverkus M. 2009. Cellular IAPs inhibit a cryptic CD95-induced cell death by limiting RIP1 kinase recruitment. J Cell Biol 187: 1037–1054

Gomes Raimundo, 2019. Hemograma Cómo Hacer e Interpretar. Cap 7. Errores en los hemogramas automatizados: los interferentes y sus correcciones. N^o Edición: 2^a, 684 páginas.

Iglesias Artola Juan M., Gianfranco Villamonte & H. Mauricio Gonzales Molfino, 2015. Transfección de ADN a células de animales como herramientas utilizadas en biotecnología animal. *The Biologist* (Lima), 13(1), jan-jun: 125-142.

Milton Laskibar Iñaki, 2015. Manejo de la técnica Western Blot. Determinaciones relacionadas con obesidad y diabetes. Disponible en: <https://addi.ehu.es/handle/10810/15183>

Pérez Castillo Anisleidy, Arsenio Betancourt Bravo, Arianna Duque OrtizI, Evelyn Lobo Rivero, 2006. Criopreservación y almacenamiento de *Mycoplasma* spp. *Rev. Salud Anim.* Vol. 38 No. 2 (Mayo.-ago. 2016): 105-111.

Protocolo 9PIM610, 2018. RQ1 RNase-Free DNase. Disponible en: https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/rq1-rnase-free-dnase-protocol.pdf?rev=e52d482142fb48a68771a17c7dc458f4&sc_lang=en

Protocolo K1641, 2012. Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR. Disponible en: https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012718_50rxns_Maxima_FirstStrand_cDNA_Syn_RTqPCR_UG.pdf

Firmas



Asesor Interno
Jaime Amadeo Bustos Martínez



Asesor externo
Karla Itzel Vázquez Santillán

