



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Proyecto de servicio social

**“Análisis de la expresión del receptor CX3CR1 y su
ligando, y de la migración celular en células de cáncer
pulmonar”**

Alumna: Andrea Macedo Medina

Asesor externo: Dra. Selma Celina Rivas Fuentes *SR*

Asesor interno: Dr. Felipe Mendoza Pérez *Felipe*



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Proyecto de servicio social

**“Análisis de la expresión del receptor CX3CR1 y su
ligando, y de la migración celular en células de cáncer
pulmonar”**

Alumna: Andrea Macedo Medina

Asesor externo: Dra. Selma Celina Rivas Fuentes

Asesor interno: Dr. Felipe Mendoza Pérez

28 de octubre de 2023

Contenido

Introducción	3
Planteamiento del problema y justificación	4
Objetivo.....	5
Objetivo específico	5
Marco teórico.....	5
Materiales y método	10
Materiales	11
Tabla de anticuerpos utilizados	12
Metodología	12
Máximos de excitación y de emisión de los fluorocromos	14
• Cy3.....	14
• AF-647	15
Resultados.....	15
PARTE I	15
Procesamiento de las muestras.....	15
Control CX3CL1 y CX3CR1 en cerebro de ratón	16
Optimización de la recuperación de antígenos	16
Tinciones sencillas	17
Tinciones dobles.....	17
PARTE II. Trabajo documental	18
II.1. Revisión de expedientes clínicos	18
II. 2. Revisión de los reportes de patología.....	18
Discusión	18
Conclusiones	20
Referencias.....	21
Glosario	23
Fuentes de consulta	24

Introducción

En los últimos años el cáncer ha sido de las principales causas de muerte a nivel mundial, Ferlay y colaboradores (2021) publicaron datos estadísticos que predecían el comportamiento del cáncer para el año 2020. Se encontró que el riesgo de padecer cualquier tipo de cáncer antes de cumplir 75 años era del 20% (uno de cada cinco personas). De este 20%, el 10% fallecerá a causa de la misma. Está claro que estas cifras son alarmantes tanto para el gobierno, por los gastos de salud, como para la sociedad en general (Ferlay J. et al, 2021), si bien esto fue lo estimado para el año 2020 es probable que las cifras aumentaron para el año 2023.

El cáncer es una enfermedad que se desarrolla por etapas, es progresiva y atraviesa por cambios moleculares, genéticos y celulares que evolucionan según sea el grado de malignidad que esté atravesando la enfermedad (Tan, D., & Lynch, H.T., 2013). Las células se vuelven capaces de dividirse y multiplicarse de una forma incontrolable. Esta habilidad adquirida se debe a mutaciones generadas en el ADN que desarrollan un proceso evolutivo resultando en la formación de tumores (Bunz, F., 2008). Estos tumores crecen con el tiempo y como son masas extrañas que no debería de estar en el cuerpo, empiezan a impedir en las tareas habituales de órganos y tejidos. Los mecanismos del cáncer se describirán de forma más detallada en el apartado del marco teórico.

Si bien el cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, la falta de un diagnóstico oportuno y preciso impide que se trate a tiempo e incrementa el porcentaje de mortalidad de la enfermedad. Una de las consecuencias de no tener un diagnóstico temprano es la formación de metástasis (Ferlay et al., 2021), esta sucede cuando las células llegan a proliferar en grandes cantidades y comienzan a distribuirse a lo largo del cuerpo humano buscando nuevos tejidos que invadir (Miller M. E., 2018). La metástasis es la principal causa de muerte en pacientes que tienen cáncer.

Se ha visto que el cáncer de pulmón es el segundo tipo de cáncer con más incidencia y mortalidad, convirtiéndose en el principal causante de la muerte en varones (Wangmi et al., 2018). En la actualidad es elevado el número de casos de cáncer de pulmón, su registro

de mortalidad es el más alto en el mundo. Por lo anterior, es importante la búsqueda de nuevas técnicas para su diagnóstico y su tratamiento, así como identificar moléculas que estén asociadas al pronóstico de la evolución de la enfermedad.

Las quimiocinas desarrollan un papel importante en el sistema inmune al inducir células T, o atraer células del sistema inmune innato al sitio de infección (Revisado en Rivas-Fuentes et al., 2015). Hay interés por la quimiocina CX3CL1, la cual ha sido relacionada en estudios previos con diversas respuestas celulares que son relevantes en cáncer, así como con la formación de metástasis.

Las quimiocinas son citocinas quimioatrayentes importantes que regulan la angiogénesis. La angiogénesis es el proceso de formación de vasos sanguíneos, y permite que la masa tumoral incremente su tamaño. Los tumores tienen la capacidad de estimular células cercanas para que produzcan este tipo de señalización (*Inhibidores de la angiogénesis* publicada originalmente por el Instituto Nacional del Cáncer, 2018). Las quimiocinas están divididas en cuatro subfamilias, CX3C es una de esas subfamilias y hasta ahora se sabe que solo se encuentra a CX3CL1 dentro de ella y se conoce solo un receptor para este ligando, el CX3CR1 (Revisado en Rivas-Fuentes et al., 2015). El conjunto CX3CL1 / CX3CR1 es complejo porque puede tener funciones tanto pro-tumorales como antitumorales, pero el significado clínico de la quimiocina CX3 ligando 1 (CX3CL1).

Planteamiento del problema y justificación

Existe evidencia experimental de que el eje conformado por CX3CL1 y su receptor CX3CR1 tienen relevancia en las neoplasias.

En algunos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer pulmonar, este eje parece estar relacionado con la metástasis, a pesar de ello existen pocos reportes directos sobre la expresión de este eje molecular en tejido tumoral pulmonar de pacientes con cáncer. De tal forma que este trabajo contribuirá en el estudio de la expresión de este eje molecular en el tejido tumoral pulmonar.

Objetivo

Analizar por el método de inmunofluorescencia la expresión de CX3CL1 junto con su receptor CX3CR1 en muestras de tejido pulmonar.

Objetivo específico

- Titulación de los anticuerpos requeridos
- Realización de la técnica de inmunofluorescencia
- Foto documentación
- Análisis y discusión de resultados
- Recuperación de cortes nuevos del departamento de patología para incrementar las muestras de biopsias de interés.

Marco teórico

El cáncer es un sistema tan complejo que resulta complicado identificar el gen que mutó y la función que modificó.

Una mutación es lo que desencadena a esta enfermedad, son modificaciones que interrumpen las funciones cotidianas como la movilidad celular, apoptosis, o la regulación de la división celular. Estas mutaciones ocurren en genes que regulan la proliferación y/o crecimiento celular llamados protooncogenes, y en los genes supresores de tumores encargados de regular y ralentizar la división celular (Miller M.,2018). De tal forma que, el cáncer es un descontrol anormal del crecimiento celular causada por las alteraciones en el genoma.

La enfermedad se desarrolla a partir de la *iniciación* donde el gen encargado del control de alguna función importante para el desarrollo celular se ve afectado por una mutación, pasa a ser un oncogén y empieza a funcionar incorrectamente permitiendo que el ciclo celular continúe cuando debería de detenerse (Hosick, H. et al, 2022). La *propagación* es la siguiente etapa donde los genes supresores de tumores, encargados de inhibir el crecimiento, mutan provocando una desorganización en el ciclo celular. Cabe destacar que ambos procesos surgen de forma inesperada, sin razón aparente y no todas las células

mutadas logran convertirse en tumores. Como último paso, las células afectadas crecen hasta formar una masa ajena al cuerpo llamada tumor. Los tumores pueden llegar a ser malignos, que proceden a desarrollar cáncer, o simplemente a ser tejido extra que no causa daño alguno al cuerpo, a estos se le llama tumores benignos (Hosick, H. et al, 2022).

El cáncer pulmonar se divide en cáncer de pulmón de células no pequeñas (por sus siglas en inglés NSCLC) y cáncer de pulmón de células pequeñas (en inglés SCLC). El 90% de los diagnósticos son identificados como NSCLC, un cáncer de origen epitelial en el que el paciente corre más riesgo por propagarse a mayor velocidad (Revisado en Rivas-Fuentes et al., 2015).

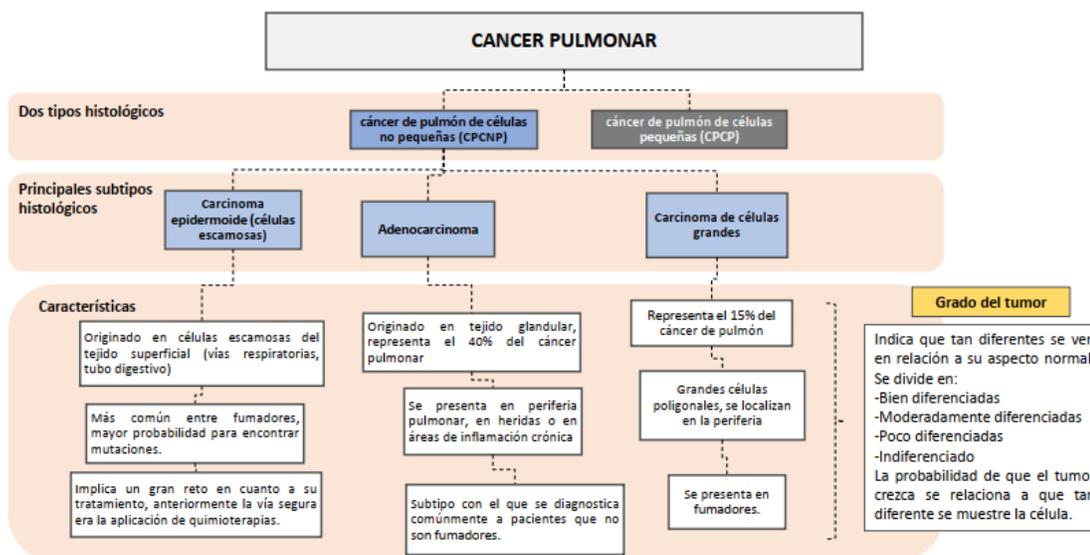


Tabla 1. Clasificación del cáncer pulmonar

El cáncer de pulmón es uno de los cánceres más prevenibles, el 80 % de casos se debe al consumo de tabaco, acción que puede ser evitada por el paciente. Sin embargo, hay pacientes que desarrollaron esta enfermedad por situaciones externas como el estar expuesto a sustancias cancerígenas como el asbesto, diesel o a sustancias radiactivas; pero también la edad resulta ser un factor importante, en personas con edad avanzada la probabilidad de desarrollar cáncer de pulmón es mayor por la naturaleza de las mutaciones de acumularse y modificar genes importantes (Miller M.,2018).

Las células cancerígenas tienen la capacidad de desarrollar tumores en otras partes del cuerpo a partir del tumor original como resultado de la migración a sitios secundarios por medio del flujo sanguíneo, el desarrollo de metástasis aumenta el riesgo del cáncer y disminuye la esperanza de supervivencia. A pesar de ser la principal causa de muerte en pacientes con cáncer, el desarrollo de metástasis es complejo; estas células deben de circular por sangre, soportar la presión venosa, adaptarse al nuevo ambiente y sobre todo librar el ataque del sistema inmune (Fares J. et al, 2020).

La formación de metástasis se divide en cinco fases empezando por la *diseminación e invasión* fase desencadenada por errores dentro de la mitosis que conllevan a la inestabilidad cromosomal y dan pie a la diseminación de células cancerosas. En la *intravasación* continua la diseminación de las células hacia los tejidos por medio del sistema circulatorio, específicamente por el lumen. La *circulación* es la fase más compleja del proceso teniendo en cuenta que la supervivencia (y futura extravación en sitios lejanos al origen) de las células tumorales en circulación dependerá de su interacción con el microambiente venoso por donde se distribuyen (Fares J. et al, 2020).

La cuarta fase es llamada *extravasación* y sucede cuando las células tumorales que viajan por las venas se topan con pequeños capilares del órgano diana donde quedarán retenidos y posteriormente resultar en una ruptura microvascular o lo más común, en la extravasación de las células cancerígenas (Fares J. et al, 2020); la extravasación es la acción que sigue la célula tumoral encontrada en el lecho vascular para pasar al parénquima de los órganos, puede llevarse a cabo por migración activa o a través de la pared vascular modificada por la proliferación tumoral ocurrida dentro de ellas (Román, C. & Armijo, M., 1999).

La *colonización* es la última fase de este proceso, pero sin duda el reto de supervivencia sigue siendo grande, las células cancerosas deben de superar las condiciones complejas encontradas en el sitio diana para finalmente proliferar. A estas alturas del proceso, los factores tumorales se hacen presente junto con células derivadas de la médula ósea para dar origen a las PMN (neutrófilos polimorfonucleares) donde se dará el crecimiento de

células cancerosas. Importante mencionar que para establecer una colonización metastásica propia es imprescindible la formación de una red vascular (Fares J. et al, 2020)

Las quimiocinas son una subpoblación de las citocinas, moléculas encargadas de la comunicación de las células del sistema inmune. Una característica que hace complicado la investigación del gran potencial terapéutico de las moléculas es que sus receptores son promiscuos, es decir, un receptor une a varias quimiocinas y una quimiocinas se puede unir a varios receptores (Revisado en Selma Rivas et al. 2015).

Las quimiocinas son proteínas solubles con la capacidad de regular el tráfico celular, por ejemplo, al presentarse síntomas de inflamación o de infección las quimiocinas tienen la función de direccionar la migración de leucocitos al tejido problema. Son de bajo peso molecular, su estructura se compone por sitios capaces de unirse a los receptores acoplados a proteína G (GPCR) y por residuos de cisteína. Según la posición en donde se encuentre el residuo de cisteína será a la familia que pertenece, son cuatro las familias que actualmente se conocen: CC, CXC, XC y CX3C (Vicari P. A. & Caux, C., 2002). Tienen una gran importancia biológica: responsables de la reparación de tejido cuando sufre alguna herida, participa en la formación y desarrollo del embrión, en la angiogénesis (mencionado anteriormente), en la respuesta inmune Th1/Th2, pero su función más importante que interesa en esta investigación es en las enfermedades inflamatorias y en las respuestas pro y antitumorales (Raman, D. et al, 2007) que se estará tratando con mayor profundidad más adelante.

Como se mencionaba anteriormente, la unión quimiocina-receptor no es selectiva, sino que una quimiocina puede unirse a diferentes receptores y un receptor puede estimular a varias quimiocinas. Esta diversidad hace que existan múltiples combinaciones con una respuesta biológica diferente (Vicari, A. P. & Caux, C., 2002).

Las células tumorales tienen la habilidad de expresar y responder a las quimiocinas facilitando el desarrollo y crecimiento de la masa tumoral. Este desarrollo se logra con el incremento de células endoteliales, perturbación de la inmunovigilancia, manifestación de la inmuoedición (compuesta por tres fases: eliminación, equilibrio y escape). Este proceso

también ayuda a la distribución de células metastásicas a sitios distantes del tumor original (Raman, D. et al, 2007).

Las quimiocinas tienen la característica de producir efectos tanto anti tumorales como pro tumorales dentro del microambiente. El tejido tumoral libera quimiocinas quienes reclutaran a los leucocitos, este acto puede causar una respuesta anti tumoral y provocar que los macrófagos eliminen a estas células, así como la activación de la respuesta inmune tanto adaptativa como la innata (Raman, D. et al, 2007). Pero la presencia de estas células inmunitarias también puede desencadenar una respuesta pro tumoral, los leucocitos resultan ser una fuente de factores de crecimiento que permiten la supervivencia de las células y la vascularización del tumor con mediadores angiogénicos, y facilita la presencia y la propagación de la enfermedad al dejar ver un sistema inmune ineficaz (Appiani, C. E., 2006).

En resumen, una respuesta pro tumoral se relaciona con la proliferación, adhesión, migración, resistencia apoptótica, y la aparición de metástasis. Mientras que su rol antitumoral recluta células inmunes antitumorales como los macrófagos, las células NK (natural killers) y las células CD8⁺ T que controlan el crecimiento tumoral (Revisado en Rivas-Fuentes et al., 2021).

La subfamilia CX3C tiene un único componente clasificado en ella, el ligando CX3CL1 con su receptor CX3CR1. Esta subfamilia es de gran importancia en las investigaciones oncológicas (Wangmi et al., 2018). CX3CL1 tiene una estructura que difiere de las demás quimiocinas, son 3 los aminoácidos que separan a las dos cisteínas, de ahí el "X3" del nombre en medio de las "CC". La forma soluble de esta quimiocina mejora la unión y adhesión celular por medio de las células T y los monocitos, esto se logra por medio de su receptor CX3CR1 (Zhou B. et al, 2016). La expresión del eje molecular CX3CL1/CX3CR1 podría ser de utilidad para evaluar la evolución de la enfermedad en un paciente.

Un estudio realizado por Liu Q. y colaboradores (2010) llegó a la conclusión de que la tasa de supervivencia de pacientes con expresión débil de CX3CL1 es mayor que aquellos pacientes que presentaron incremento en la cantidad de CX3CL1.

Un estudio realizado por Wangmi Liu y colaboradores (2018) sugirió la participación de la quimiocina CX3CL1 en la migración e invasión en el cáncer de pulmón. Se midió el nivel de expresión de esta quimiocina en seis líneas celulares de cáncer de pulmón y una línea celular bronquial epitelial humana. El experimento llegó a la conclusión que los resultados obtenidos en estos 7 tipos diferentes de líneas celulares se deben a la heterogeneidad tumoral, es decir cuando se tienen tumores de diferentes orígenes o características (Wangmi et al., 2018).

En general, se coincide con que expresión de la quimiocina CX3CL1 está ligada con la presencia de cáncer, entre mayor expresión haya de quimiocina más avanzado será el estadio del cáncer pulmonar (Zhou, B. et al, 2016). Concluyendo que el comportamiento del ligando CX3CL1 va a estar dictado por el tipo de tumor, el microambiente en donde se encuentre y el contexto patológico del que se esté hablando (Rivas-Fuentes et al., 2021)

Materiales y método

En la realización de este trabajo se utilizaron cortes provenientes de biopsias de cáncer pulmonar, de las cuales se cuenta con el consentimiento informado correspondiente.

Los cortes fueron procesados con la técnica de inmunofluorescencia usando anticuerpos primarios dirigidos contra las moléculas de interés. La inmunofluorescencia se basa en utilizar anticuerpos unidos a una marca fluorescente para detectar antígenos específicos, este sistema es rentable y existe la ventaja de poder detectar muchos posibles anticuerpos primarios con pocos anticuerpos marcados (Ian D. Odell, I. & Cook, D., 2013). Los anticuerpos son proteínas producidas por las células B capaces de unirse a un antígeno de forma específica, en el caso de los anticuerpos de la clase IgG como los que se utilizaron en este trabajo su estructura asemeja a una letra "Y", se compone por la región Fab (variable) encargada de unir antígenos y por la región Fc (constante) responsable de la función efectora del anticuerpo (Gallastegui, C. et al, 2017).

Hay varios tipos de inmunofluorescencia. En este protocolo se utilizó la inmunofluorescencia indirecta junto con la doble inmunofluorescencia indirecta, el ser indirecta quiere decir que requiere de un anticuerpo primario que se une a la célula de interés seguido del anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo. Estos fluoróforos muestran la interacción primaria anticuerpo-antígeno, se evalúan en un microscopio de fluorescencia que permite visualizar cada componente a diferentes longitudes de onda (Hernández Ramírez D. & Cabiede J., 2009). La doble inmunofluorescencia permite emplear dos anticuerpos primarios distintos y dos secundarios con fluoróforos diferentes para la identificación de dos antígenos en el tejido de interés, esta técnica resulta tener una sensibilidad muy alta (Betterle C. & Zanchetta B., 2012). En general, la inmunofluorescencia es una técnica relativamente económica, sencilla y fácil de estandarizar pero que requiere de una amplia experiencia para la lectura e interpretación de los resultados (Hernández Ramírez D. & Cabiede J., 2009).

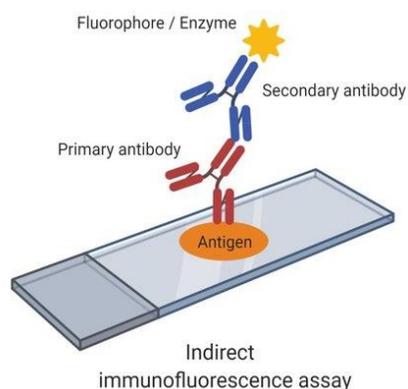


Figura 1. Esquema de una inmunofluorescencia indirecta. Obtenido de Lager, M. (2020). *Molecular and serological tools for clinical diagnostics of Lyme borreliosis- can the laboratory analysis be improved?* [Figura]

Materiales

Soluciones y reactivos	Anticuerpos
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 10x Casein solution SP-5020 Lot. ZD12227A ▪ Vector TrueVIEW (autofluorescence Quenching Kit) SP-8400 ▪ VECTASHIELD (mounting medium for fluorescence) H-100 ▪ Plumón de cera marca Pappen ▪ Antigen Unmasking Solution Citrate-Based H-3300 marca Vector laboratories ▪ PBS 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Human anti goat CX3CL1 (Ab193935) Abcam ▪ Human anti rabbit CX3CR1 (Ab8021) Abcam ▪ Human anti rabbit CX3CR1 (Ab8020) Abcam ▪ Anti goat Cy3 (705-165-147) Jackson immunoresearch ▪ Anti rabbit AF 647 (711-605-152) Jackson immunoresearch ▪ Anti mouse AF 555 ▪ Anti actina

Tabla 2. Anticuerpos utilizados y sus especificaciones técnicas

Tabla de anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Características
Human anti goat CX3CL1 (Ab193935) Marca Abcam	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Péptido sintético correspondiente al CX3CL1 aa 200-300 humano ▪ Purificado del suero de cabra ▪ Concentración de 200 µl a 0.5 mg/ml
Human anti rabbit CX3CR1 (Ab8021) Marca Abcam	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Péptido sintético correspondiente a CX3CR1 aa 2-21 (N terminal) humano ▪ Receptor de la quimiocina fractacina CX3C, regula las funciones adhesivas y migratorias ▪ Anticuerpo purificado en conejo
Human anti rabbit CX3CR1 (Ab8020) Marca Abcam	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Péptido sintético, correspondiente a los aminoácidos 175-189 de Human CX3CR 1. ▪ Concentración: 100 µl a 1 mg/ml ▪ Receptor para la quimioquina CX3C fractacina, controla funciones tanto adhesivas como migratorias. ▪ Anticuerpo purificado en conejo
Anti goat Cy3 (705-165-147) Jackson immunoresearch	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sólido liofilizado, rehidratar con 0.4 ml de agua ▪ Concentración: 1.5 mg/ml ▪ Fluoroforo Cy3, absorbancia de A552/A280 = 2.3 ▪ El anticuerpo se purificó a partir de antisuero de cabra
Anti rabbit AF 647 (711-605-152) Jackson immunoresearch	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sólido liofilizado, rehidratar con 0.4 ml de agua ▪ Concentración: 1.5 mg/ml ▪ Fluoroforo Alexa Fluor®647 ácido carboxílico, rango de absorbancia de A651/A280 = 5.2 ▪ El anticuerpo se purificó a partir de antisueros
Anti beta actina (GTX629630) GeneTex	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Péptido sintético conjugado con proteína acarreadora que abarca una secuencia de la región C-terminal de la beta actina humana. ▪ Concentración: 1 mg/ml ▪ Purificado en conejo
Anti rabbit AF 555 (A21428) Life technologies	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Concentración 2 mg/ml ▪ Almacenar a 4°C en la oscuridad ▪ Excitación/Emission Max: 553/568 nm ▪ Purificado en conejo

Tabla 3. Especificaciones técnicas de los anticuerpos utilizados.

Metodología

El proceso se divide en dos días, en el día uno se lleva a cabo el desparafinado y la rehidratación de las muestras junto con la recuperación antigénica, el bloqueo y la aplicación de los anticuerpos primarios. En el día dos, se añaden los anticuerpos secundarios y se hace el montaje de la laminilla para finalmente poder guardarla a 4°C protegido de la luz.

DIA 1	
Desparafinado y rehidratación	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Incubar las laminillas en homo seco a 60°C durante 20 minutos 2. Pasar las laminillas por el carrusel de alcoholes: <ul style="list-style-type: none"> -Xilol (x2) → 5 minutos cada uno -Etanol absoluto (x2) } Baños rápidos (sumergir 3 -Etanol al 96% (x2) } veces cada uno -Colocar la muestra en agua bidestilada 	
Recuperación antigénica	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Colocar las laminillas con el tejido desparafinado y rehidratado en una jarra Copplin con 50 mL de buffer de citratos 1x*, colocar la jarra en la olla express y agregar agua hasta la mitad, colocarla dentro del homo de microondas cerciorándose que haya quedado bien sellada. Marcar 20 min en el microondas, cuidando escuchar que la olla comience a liberar vapor (a partir de los 10-11 minutos) cuando comience a escucharse, contar 5 minutos para después detener el tiempo. Sacar y dejar enfriar. 2. Lavar la muestra en un baño de PBS 1x <ul style="list-style-type: none"> *Buffer de citratos 50 mL - citrato de sodio dihidratado 4.05 mL - ácido cítrico anhidrido 0.95 mL - agua 45 mL 	
Bloqueo y tinción	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Delimitar el área del tejido con el plumón de cera, cuidando que el área delimitada sea lo más reducida posible para evitar desperdicio de reactivos. De preferencia mantener el plumón frío dentro de hielo para una mejor aplicación. Dejar secar por unos segundos cuidando que el tejido nunca este completamente seco. 2. Bloquear y permeabilizar las muestras colocando sobre el corte solución de bloqueo 1x* con tritón 0.5%. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente 3. Realizar 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS en jarra Copplin. 4. En 100 µL de solución de bloqueo añadir 1 µL de cada anticuerpo primario, human anti goat CX3CL1 y human anti rabbit CX3CR1. Incubar toda la noche a 4°C o 1 h a temperatura ambiente. <p>*De la solución de bloqueo 1x se preparará 1 mL (900 µL agua/ 100 µL caseína 10x) que se dividirá, 500 µL quedaran con tritón 2.5 µL y 500 µL restarán para la preparación de los anticuerpos primarios y para las laminillas que no llevaran anticuerpo primario en el día 1.</p>	

Tabla 4. Protocolo utilizado

DIA 2

Bloqueo y tinción

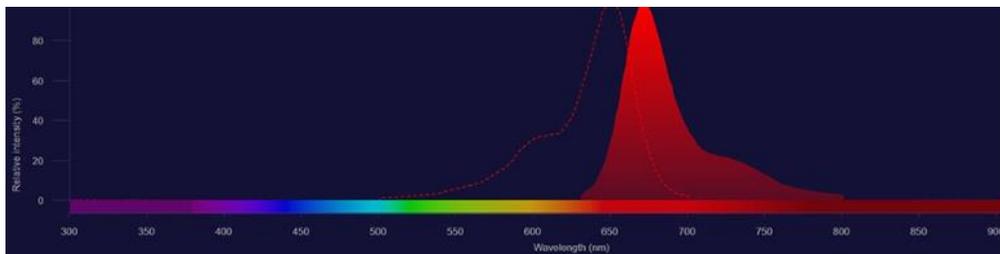
5. Realizar 3 lavados de 5 minutos con la solución PBS – Tween 20 (0.1 %) en agitación y lavado rápido
6. Agregar los anticuerpos secundarios anti goat Cy3 y anti rabbit AF647 1 μ L de cada uno en 300 μ L del buffer de bloqueo, incubar 1h a temperatura ambiente en la oscuridad.
7. Realizar 3 lavados de 5 minutos con la solución PBS – Tween 20 (0.1 %) en agitación y 1 lavado rápido en jarra Coplin
8. Preparar la solución del True view kit con una relación 1:1:1 de los reactivos A, B y C de la siguiente manera: agregar A y B, mezclar 10 segundos para después adicionar el reactivo C, al final agitar vigorosamente hasta incorporar y quede un tono azul de forma uniforme. Incubar de 2 a 5 minutos
9. Lavado con PBS en agitación durante 5 minutos. Secar exceso de buffer
10. Diluir el Dapi ,1 μ L en 400 μ L de PBS y agregar al tejido para dejar incubando por 5 minutos en la oscuridad
11. Enjuagar en PBS nuevamente, esta vez solo baño rápido.

Montaje y almacenamiento

1. Limpiar los cubre objetos con alcohol y papel, evitando que tenga cualquier mancha o pelusa.
2. Con la laminilla parcialmente seca se agrega una gota aproximadamente a cada tejido del medio de montaje *Vectashield* colocar el cubre objeto de tal forma que no quede ninguna burbuja, cuando el medio de montaje se distribuya por todo el cubre objeto colocar una capa de esmalte de uñas para sellar y evitar que esté en contacto con el oxígeno. Cuidar que el esmalte no interfiera con la visualización del tejido.
3. Esperar a que se seque para después guardarlo en refrigeración a 4°C protegido de la luz.

Máximos de excitación y de emisión de los fluorocromos

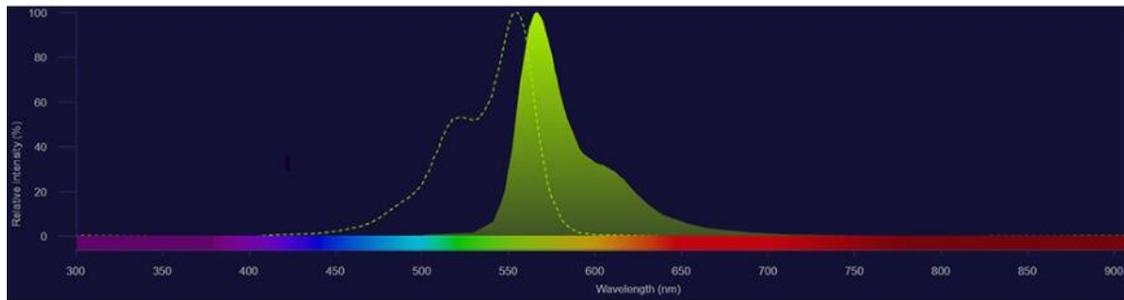
- **Cy3**



Brightness	Laser line (nm)	Common filter set	Excitation (nm)	Emission (nm)	Photostability	Instrument platform
☀	⚡	⊙	→	→	☀	📷
5	594/633	660/20	650	671	(in buffer) 3 (in antifade) 5	microscopy; flow cytometry; fluorescence microplate reader

Figura 2. Muestra de los picos de excitación y de emisión de los fluorocromos CY3

- **AF-647**



Brightness	Laser line (nm)	Common filter set	Excitation (nm)	Emission (nm)	Photostability	Instrument platform
						
3	488/532	593/40	554	566	(in buffer) 4 (in antifade) 4	microscopy; flow cytometry; fluorescence microplate reader

Figura 3. Muestra de los picos de excitación y de emisión de los fluorocromos AF-647

Resultados

PARTE I

Procesamiento de las muestras

Se empleó el anticuerpo primario anti actina y el secundario AF 555 para visualizar el comportamiento de las muestras, pues la anti actina resulta tener señales muy claras. Hubo un cambio en la recuperación antigénica, reemplazando el buffer de citratos “*Antigen Unmasking Solution, Citrate-Based*” marca *Vector laboratories* por un buffer preparado desde cero con citrato de sodio y ácido cítrico. Las primeras muestras se llevaron a ebullición en parrilla a baño María, posteriormente se implementó el uso de una olla exprés que necesita ser calentada en microondas.

Laminillas se procesaron con la técnica de inmunofluorescencia descrita en este trabajo. Los anticuerpos utilizados fueron anti actina y anti CX3CR1, se trató de una inmunofluorescencia doble, con sus respectivos secundarios AF 555 y AF 647, en una concentración correspondiente a 1/100 para anti actina, 1/50 para anti CX3CR1 y para ambos secundarios 1/300.

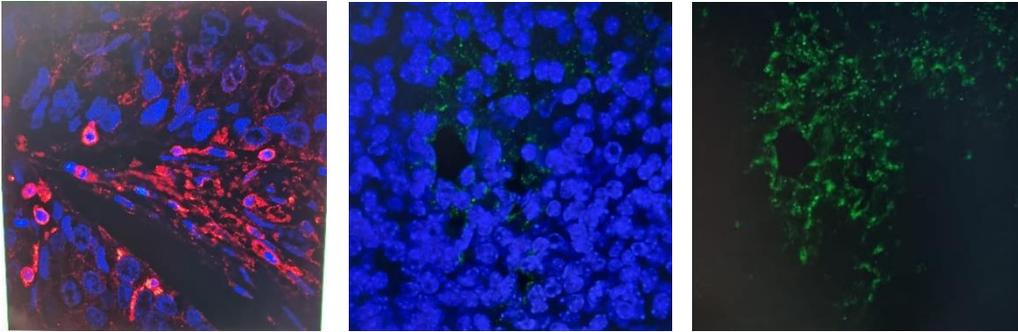


Figura 4. A) De pseudocolor rojo se muestra la actina, y en azul los núcleos de las células. B) En azul los núcleos teñidos con DAPI y en verde anti CX3CR1. C) Se muestra únicamente anti CX3CR1.

Control CX3CL1 y CX3CR1 en cerebro de ratón

Se validó como control positivo el anticuerpo anti CX3CR1, indica que a este tejido se le añadió anticuerpo primario y secundario. En cada procesamiento de las muestras de interés se añadía una laminilla con tejido de cerebro de ratón para evaluar que ambos anticuerpos no dieran reacciones inespecíficas.

Optimización de la recuperación de antígenos

Para la recuperación antigénica de los procedimientos iniciales, se utilizó el buffer de citratos comercial (H-3300) de la marca *Vector laboratories*. Las muestras se llevaban a ebullición en baño María en la parrilla de calentamiento durante 30 minutos, el resultado se muestra en la figura 5 donde se aprecia que la fluorescencia verde se observó solamente en los márgenes de la célula. En la siguiente inmunofluorescencia se cambió el buffer comercial por un buffer de citratos preparado a partir de ácido cítrico y citrato de sodio, sustitución de la parrilla de calentamiento por una olla de presión en microondas a 15 minutos aproximadamente (10 minutos para llegar a ebullición y 5 en ebullición) y también el título del DAPI pasando de 1/800 a 1/400. Ambas muestras tratadas con Anti actina (1/100) y anti mouse AF 555 (1/300).

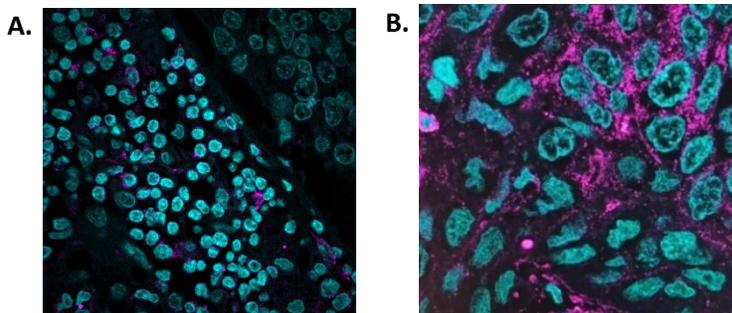


Figura 5. A) Anti actina (1/100) y anti mouse AF 555 (1/300). Buffer de citratos vector + olla de presión/microondas. DAPI (1/400). 60X Aumentos. En pseudocolor, cian DAPI y en magenta actina. B) Anti actina (1/100) y anti mouse AF 555 (1/300). Buffer de citratos preparado + olla de presión/microondas. DAPI (1/400). En pseudocolor, cian DAPI y en magenta actina

Tinciones sencillas

La figura 6 corresponde a una biopsia pulmonar de cáncer epidermoide, se empleó el mismo método de inmunofluorescencia descrito en este reporte. Por ser una tinción simple se aplicó un solo anticuerpo primario CX3CL1 junto con su secundario correspondiente Cy3. La dilución de DAPI fue de 1/400, y los anticuerpos CX3CL1, Cy3 se preparan en una dilución 1/300.

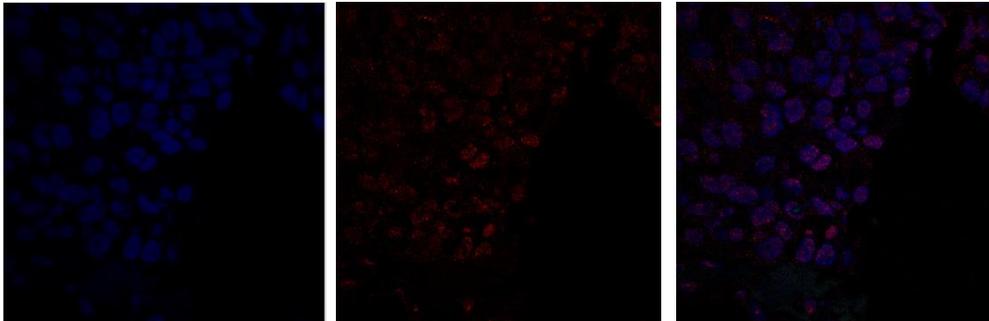


Figura 6. Aumento a 20X A) Núcleos teñidos con DAPI B) Señal de Cy3 secundario de CX3CL1 C) Muestra ambas señales, los núcleos y el anticuerpo Cy3

Tinciones dobles

La laminilla procesada posee dos tejidos diferentes, a ambos se les dio el mismo tratamiento siguiendo el protocolo de este trabajo. Los anticuerpos primarios anti CX3CR1 y anti CX3CL1 se emplearon en una dilución 1/100 y los anticuerpos secundarios Cy3 y AF 647 a 1/300.

También se procesó cortes de cerebro de ratón y una laminilla para observar el fondo, es decir solo con anticuerpo secundario.

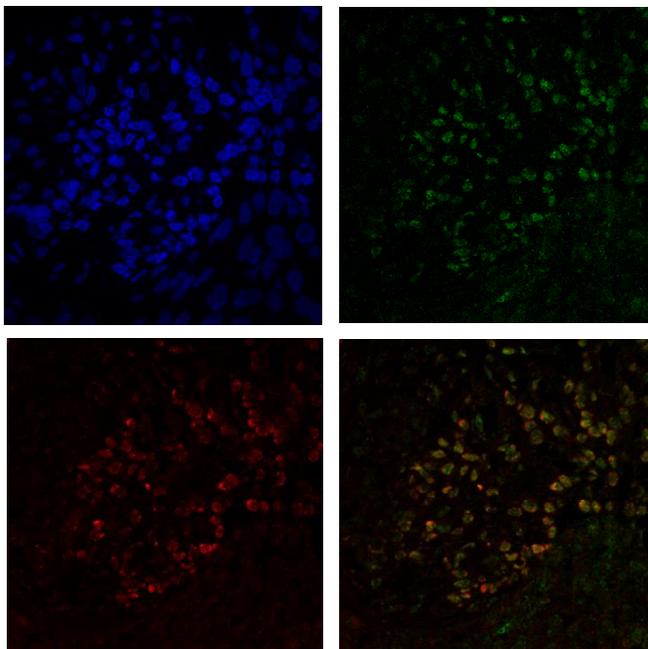


Figura 7. A) Núcleos teñidos con DAPI B) En color verde el anticuerpo Cy3 C) En color rojo el anticuerpo AF 647 D) Se muestra la señal de ambos anticuerpos.

PARTE II. Trabajo documental

II.1. Revisión de expedientes clínicos

Las muestras utilizadas fueron cortes con los que ya se contaban dentro del laboratorio. Corresponden a biopsias de pacientes con cáncer epidermoide realizadas entre los años 2016-2017 aproximadamente. Según el diccionario especializado del Instituto Nacional del Cáncer, el cáncer epidermoide comienza con células de apariencia delgada y plana encontradas comúnmente en la superficie de la piel; el revestimiento de órganos como la vagina, el ano, el tubo digestivo y las vías respiratorias, siendo este último el de mayor importancia por el enfoque de la investigación.

A partir de datos provenientes del expediente clínico, previamente codificados y sin datos de identificación personal; se consultó información clínica relevante para el protocolo de investigación, del cual se desprende este trabajo de servicio social. Esta información se recabó y organizó en tablas de datos.

De forma general se recabaron los parámetros clínicos que se utilizan para evaluar la gravedad de la enfermedad de acuerdo a la escala APACHE II, sistema diseñado para medir la severidad del padecimiento entre pacientes críticos, y la escala CURB65 sistema de puntuación para estratificar el riesgo de mortalidad entre los pacientes con neumonía.

II. 2. Revisión de los reportes de patología

A partir de datos provenientes del de los reportes de patología, previamente codificados y sin datos de identificación personal; se consultó información patológica relevante relativa a las características histopatológicas de las muestras incluidas en el estudio.

Discusión

Para probar el procedimiento de inmunofluorescencia se procesaron cortes de cerebro de ratón donados por la Dra. Blanca Espinosa del INER. Dichos cortes se trataron con un anticuerpo primario contra actina. En los primeros procesamientos no se obtuvo la señal con la intensidad esperada. Por lo anterior se decidió preparar un buffer de citratos fresco.

Se sabe que las soluciones de citratos frescas mejoran la recuperación antigénica., utilizando un buffer de citratos preparado a partir de ácido cítrico y citrato de sodio. A este cambio de buffer se sumó la sustitución de la parrilla de calentamiento por una olla de presión en microondas a 15 minutos aproximadamente, 10 minutos para llegar a ebullición y 5 en ebullición. También se cambió el título del DAPI por baja visualización en el procesamiento pasado, se deja 1/400. En primera instancia se cambió la forma de calentar el buffer, el resultado obtenido se observa en la imagen 2A donde la recuperación se hace aún con el buffer comercial, pero utilizando olla de presión calentado dentro de microondas.

En los procesamientos posteriores se mejoró la intensidad de la señal considerablemente, los resultados se observan en la figura 5 y se aprecia la diferencia en la señal entre las muestras procesadas con el buffer de la marca *Vector laboratories* (lado izquierdo) y las procesadas con el buffer de citratos preparado, se observa mejor resolución de los núcleos. Es importante destacar que las imágenes se encuentran a diferentes aumentos digitales, pero ambos están tratados con anti actina como primer anticuerpo seguido por AF 555 como anticuerpo secundario. Esta ronda de procesamiento ayudó a identificar la forma de obtener una mejor recuperación antigénica, logrando mejorar el protocolo de inmunofluorescencia que en un principio se estableció.

Analizando los resultados anteriores se llegó a la conclusión que el problema estaba en la recuperación antigénica, ya fuera por el reactivo utilizado o por la forma en la que se llevaban a ebullición las laminillas. Se decidió cambiar los anticuerpos y hacer una prueba con anti actina como anticuerpo primario y AF 555 como secundario. Con esta ronda de procesamiento se cambia la recuperación antigénica, reemplazando el buffer de citratos “Antigen Unmasking Solution, Citrate-Based” marca Vector laboratories y llegar a ebullición en parrilla a baño maría, por la preparación de un buffer de citratos fresco (preparado cada semana) y llevado a ebullición en una olla exprés que se calienta en microondas.

En cada procesamiento de las muestras de interés se añadió una laminilla con tejido de cerebro de ratón para evaluar que la recuperación antigénica se llevara a cabo a la

perfección y en caso de que el resultado obtenido sea incorrecto poder descartar o no la posibilidad de que el fallo sea ajeno al procesamiento y más relacionado al tejido.

El anticuerpo Human anti rabbit CX3CR1 con número de catálogo Ab8021 Marca Abcam es el producto que se estuvo utilizando en el protocolo sin embargo fue descontinuado al ser evaluado mediante líneas celulares knockout. Se observó que dicho anticuerpo reaccionaba de forma inespecífica. El anticuerpo Ab8021 ya había sido utilizado en el laboratorio en protocolos anteriores, por lo que fue imposible probarlo en estos tejidos y después compararlo con el anticuerpo Ab8020 que es el que recomienda el proveedor para reemplazarlo.

Las muestras que se tenían ya resguardadas dentro del refrigerador fueron con las que se empezó a trabajar la parte experimental del protocolo, y gracias a ellas se logró comprobar la efectividad de los anticuerpos, establecer cantidades y tiempos exactos, y poder estandarizar el protocolo de inmunofluorescencia. Sin embargo, el refrigerador en el que estaban guardadas las muestras en algún momento se siniestró y las muestras se sobrecalentaron. Quizá es debido a esto que la señal que observamos en las muestras de cáncer de pulmón para los anticuerpos probados en este trabajo fue relativamente baja para las moléculas CX3CL1 y CX3CR1.

Conclusiones

En el presente trabajo de servicio social se optimizó la técnica de inmunofluorescencia, lo que implica el ajuste de diversas variables experimentales. También se validó la técnica de inmunofluorescencia con la detección de actina en el tejido control, y se valida el funcionamiento de los anticuerpos con el tejido control

En cuanto a los especímenes histológicos de interés, se logró observar la expresión de las moléculas CX3CL1 y CX3CR1 en tejido neoplásico pulmonar en al menos dos especímenes histológicos.

Se generó una tabla con diversos parámetros clínicos que tienen correspondencia con al menos 20 muestras histológicas; y se recabó información histopatológica de al menos 10 especímenes

Se logró optimizar el protocolo para que, en un futuro proyecto, este protocolo sea ideal para utilizarse como las bases para proyectos más extensos con un número de pacientes más elevado.

La técnica de inmunofluorescencia logró mostrar presencia del ligando CX3CL1 y receptor CX3CR1, la señal obtenida fue suficiente para mostrar su presencia en biopsias de pulmón de pacientes con carcinoma epidermoide. Sin embargo, continúa siendo una señal débil, aspecto a tomar en cuenta para futuros trabajos de investigación.

En cuanto a los análisis de la migración celular, estos no se realizaron porque se priorizó a las actividades arriba mencionadas.

Referencias

- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*. <https://doi:10.1002/ijc.33588>
- Rivas-Fuentes, S., Salgado-Aguayo, A., Pertuz Belloso, S., Gorocica Rosete, P., Alvarado-Vásquez, N., & Aquino-Jarquín, G. (2015). Role of Chemokines in Non-Small Cell Lung Cancer: Angiogenesis and Inflammation. *Journal of Cancer*, 6(10), 938–952. <https://doi.org/10.7150/jca.12286>
- Liu, Y., Ma, H., Dong, T., Yan, Y., Sun, L., & Wang, W. (2021). Clinical significance of expression level of CX3CL1-CX3CR1 axis in bone metastasis of lung cancer. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 23(2), 378–388. <https://doi.org/10.1007/s12094-020-02431-6>
- Liu, W., Liang, Y., Chan, Q., Jiang, L., & Dong, J. (2019). CX3CL1 promotes lung cancer cell migration and invasion via the Src/focal adhesion kinase signaling pathway. *Oncology reports*, 41(3), 1911–1917. <https://doi.org/10.3892/or.2019.6957>
- Rivas-Fuentes, S., Salgado-Aguayo, A., Arratia-Quijada, J., & Gorocica-Rosete, P. (2021). Regulation and biological functions of the CX3CL1-CX3CR1 axis and its relevance in solid cancer: A mini-review. *Journal of Cancer*, 12(2), 571–583. <https://doi.org/10.7150/jca.47022>
- Raman, D., Baugher, P. J., Thu, Y. M., & Richmond, A. (2007). Role of chemokines in tumor growth. *Cancer letters*, 256(2), 137-165. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.05.013>

- Zhou, B., Xu, H., Ni, K., Ni, X., & Shen, J. (2016). Expression of chemokine XCL2 and CX3CL1 in lung cancer. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 22, 1560.
- Liu, Q., Yang, H., & Zhang, S. F. (2010). Expression and significance of MIF and CD147 in non-small cell lung cancer. *Sichuan da xue xue bao. Yi xue ban= Journal of Sichuan University. Medical Science Edition*, 41(1), 85-90.
- Vicari, A. P., & Caux, C. (2002). Chemokines in cancer. *Cytokine & growth factor reviews*, 13(2), 143-154. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(01\)00033-8](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(01)00033-8)
- Tan, D., & Lynch, H. T. (2013). *Principles of molecular diagnostics and personalized cancer medicine*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Bunz, F. (2008). The Genetic Basis of Cancer. *Principles of Cancer Genetics*, 1-47.
- Hosick, H. L., Rizzo, C., Campanella, J. J., & Alder, R. (2022). Cancer. Magill's Medical Guide [Online Edition].
- Odell, I. D., & Cook, D. (2013). Immunofluorescence techniques. *The Journal of investigative dermatology*, 133(1), e4.
- Gallastegui, C., Bernárdez, B., Regueira, A., Dávila, C., Leboeiro, B., & Gamundi-Planas, M. C. (2017). Farmacia Hospitalaria Capítulo 11 [Online Edition].
- Hernández Ramírez, D. F., & Cabiedes, J. (2010). Técnicas inmunológicas que apoyan el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes [Immunological Techniques that Support the Diagnosis of the Autoimmune Diseases]. *Reumatología clinica*, 6(3), 173–177. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2009.10.003>
- Betterle, C., & Zanchetta, R. (2012). The immunofluorescence techniques in the diagnosis of endocrine autoimmune diseases. *Auto- immunity highlights*, 3(2), 67–78. <https://doi.org/10.1007/s13317-012-0034-3>
- Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 28. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>
- Román Curto, C., & Armijo Moreno, M. (1999). El proceso metastásico. III: extravasación y proliferación en el órgano diana. *Actas dermo-sifiliográficas*, 90(7), 343-357.
- Lager, M. (2020). Molecular and serological tools for clinical diagnostics of Lyme borreliosis- can the laboratory analysis be improved? (Vol. 1744). Linköping University Electronic Press. figura 1

Glosario

- Microscopio epifluorescente: la muestra se ilumina con luz incidente, la luz reflejada es la que forma la imagen de forma amplificada caracterizan por la formación de imágenes amplificadas, donde la muestra ser analizada es iluminada con y la imagen. Su fuente de luz blanca son lámparas halógenas de alta potencia, su emisión pasará a través de un primer filtro para elegir a que longitud de onda se estará excitando el fluorocromo. El segundo filtro selecciona las emisiones para solo dejar pasar la longitud de emisión del fluorocromo (Ormachea, O. & Villazón, A., 2017)
- APACHE: es un sistema basado en anomalías fisiológicas creado para medir la gravedad de la enfermedad, principalmente es utilizada en pacientes con enfermedades críticas. Este sistema donde la gravedad se ve cuantificada es útil dentro de la investigación clínica para poder comparar pacientes del estudio y pacientes control (Zimmerman, J. et al., 2006). También resulta de utilidad para evitar costos excesivos en cuidados intensivos a pacientes que realmente no necesitaban de dichos cuidados (Lee, K. et al., 1993)
- CURB-65: escala de predicción de mortalidad a 30 días en pacientes. Herramienta originalmente diseñada para agrupar a los pacientes que eran hospitalizados por “neumonía adquirida por la comunidad” y así poder ofrecer diferentes opciones de manejo según el riesgo de mortalidad. Sus siglas representan las categorías que este sistema evalúa siendo: confusión, urea, frecuencia respiratoria y presión arterial baja, edad ≥ 65 años (Lim, W. S. et al, 2003).
- Protooncogenes: genes de apoyo para que una célula pueda multiplicarse. Cuando el gen comienza a comportarse de forma anormal y permite que la célula entre en una proliferación incontrolada, se dice que mutó y se convirtió en un oncogén (Alemañ, M. ,2015).
- Supresor tumoral: protagonizan parte del proceso de división celular relacionado con el control y la regulación de este. Una falla en estos genes indicaría que la división celular jamás se detenga, de modo que se produce una proliferación más o

menos incontrolada de la célula resultando en neoplasias o el desarrollo de tumores peligrosos (López, M. et al., 2001).

- Oncogén: es un gen que sufrió una mutación y que tiene el potencial de causar cáncer (National Human Genome Research Institute, 2023).
- Neutrófilos leucocitos polimorfonucleares (PMN): son componentes esenciales del Sistema Inmune. Son la primera línea de defensa contra infecciones, es decir que son los primeros en llegar al tejido afectado, y se originan en la médula ósea a partir de células madre mieloides (Barbieri, P. et al., 2005).

Fuentes de consulta

- Lim, W. S., Van der Eerden, M. M., Laing, R., Boersma, W. G., Karalus, N., Town, G. I., & Macfarlane, J. (2003). Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: an international derivation and validation study. *Thorax*, 58(5), 377-382.
- Ormachea, O., & Villazón, A. (2017). Desarrollo de un microscopio de epifluorescencia de bajo costo. *Investigación & desarrollo*, 1(17), 5-14.
- Barbieri Petrelli, G., Flores Guillén, J., & Vignoletti, F. (2005). El neutrófilo y su importancia en la enfermedad periodontal. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, 17(1), 11-16.
- Zimmerman, J. E., Kramer, A. A., McNair, D. S., & Malila, F. M. (2006). Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) IV: hospital mortality assessment for today's critically ill patients. *Critical care medicine*, 34(5), 1297-1310.
- Lee, K. H., Hui, K. P., Lim, T. K., & Tan, W. C. (1993). Acute physiology and chronic health evaluation (APACHE II) scoring in the medical intensive care unit, national university hospital, Singapore. *Singapore Med J*, 34(1), 41-44.
- Alemañ, M. (2015). Qué son los protooncogenes y genes supresores de tumores. Centro de Fertilidad y Genética (CFG).
- López, M., Anzola, M., Cuevas-Salazar, N., Aguirre, J. M., & Martínez de Pancorbo, M. (2001). p53, un gen supresor tumoral. *Gaceta Médica de Bilbao*, 98(1), 21-27. doi:10.1016/s0304-4858(01)74350-8