

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

INFORME DE CONCLUSIÓN DEL SERVICIO SOCIAL
POR ACTIVIDADES RELACIONADAS CON LA PROFESIÓN

PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

ENTRENAMIENTO BÁSICO EN TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR
Y CULTIVO CELULAR EMPLEADAS EN INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
DE LA SALUD.

QUE PRESENTA LA ALUMNA
Alison Denise Sandoval Alonso
2193072107

ASESORES

Dra. Adriana Contreras Paredes
Laboratorio de Epidemiología y Biología Molecular de Virus Oncogénicos.
Instituto Nacional de Cancerología

Dra. María del Carmen Monroy Dosta
Laboratorio de Análisis Químico del Alimento Vivo
Universidad Autónoma Metropolitana

Resumen

El presente trabajo, realizado en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) dentro del laboratorio de Epidemiología y Biología Molecular de Virus Oncogénicos, sobre técnicas básicas de biología molecular y de cultivo celular pretende apoyar y dar bases en investigación sobre ciencias de la salud. Se cubrieron actividades relacionadas con experimentos de cultivo celular y de biología molecular, así como técnicas que permiten el desarrollo de investigaciones y la misma mejora de estas.

Se evaluó la expresión de la proteína actina, en las líneas celulares HeLa, CaSki y C-33A relacionadas a Cáncer Cervicouterino (CaCu), las cuales presentan características relacionadas con el Virus de Papiloma Humano (VPH). Se encontró que la proliferación celular y viabilidad varió en cada una de las células, como lo fue el caso de la línea celular HeLa que se ha encontrado que tiene una alta tasa de duplicación. El análisis de proteínas por Western Blot detectó la expresión de actina como proteína constitutiva en todas las líneas, mientras que la expresión del gen 18s se confirmó en las técnicas de PCR y qPCR. Se confirmó, además, que en todas las técnicas utilizadas que la viabilidad del material genético y de las proteínas en todas las líneas celulares resultaron optimas y eficientes.

Palabras clave

Cultivo celular, Western BloT, PCR, qPCR, líneas celulares, viabilidad celular, proliferación, VPH, Cáncer Cervicouterino, proteínas, genes.

I. INDICE

Resumen	2
Palabras clave	2
Introducción	4
Características generales del servicio social	5
Ubicación geográfica	5
Marco institucional	5
Antecedentes.....	6
Objetivos	7
Especificación y fundamento de las actividades realizadas	8
Metodología	8
Cultivo celular	8
Ensayos de proliferación celular	9
Western Blot	10
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	11
Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (qPCR)	12
Análisis estadístico	13
Resultados	13
Cultivo celular	13
Ensayos de proliferación celular	14
Western Blot	17
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	18
Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (qPCR)	19
Impacto de las actividades realizadas.....	20
Descripción de las actividades desarrolladas con los objetivos de formación del plan de estudios	21
REFERENCIAS.....	22

I. Introducción

El CaCu representa uno de los principales problemas a nivel mundial al presentar una alta incidencia y mortalidad, tan solo en México en el 2022 se reportaron 4,335 defunciones por esta enfermedad. Este tipo de cáncer se encuentra mayormente asociado al VPH el cual, además, es la infección de transmisión sexual más frecuente, se estima que el 80% de la población ha presentado o presentará a lo largo de su vida una infección por este virus. En este contexto, el estudio de líneas celulares derivadas de cáncer cervical, como HeLa, CaSki y C33-A, constituye una herramienta fundamental para comprender los mecanismos moleculares implicados en la progresión tumoral (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2022; Secretaría de Salud, 2015; Puga, O., 2024).

Ante esta problemática se han propuesto técnicas de detección viral que permitan un diagnóstico oportuno que evite el incremento de casos de VPH y CaCu. Las técnicas básicas de biología molecular y de cultivo celular apoyan la investigación biomédica al permitir implementar la expresión de proteínas relacionadas con vías de señalización clave en cáncer, generando a su vez grandes avances en tratamientos y diagnósticos (Alberts et al., 2015; Hanahan, D., y Weinberg, R., 2011).

En el presente trabajo de investigación se realizó un entrenamiento práctico mediante el cultivo celular y el análisis de distintas líneas celulares asociadas al VPH con el objetivo de estudiar y comprender las bases teóricas e implementar las técnicas de cultivo celular, así como de biología molecular empleadas en investigación básica en salud.

Dominar estas técnicas contribuye ante la solución de problemas actuales y emergentes, como lo es el cáncer cervicouterino (CaCu), las infecciones virales causadas por el Virus de Papiloma Humano (VPH) y otras enfermedades que afecten a la sociedad. Este conocimiento de metodologías, por lo tanto, no solo ayuda ante la formación profesional ya que contribuye ante la generación de soluciones que tengan impactos sobre el bienestar social.

II. Características generales del servicio social

Ubicación geográfica

La presente investigación de servicio social se llevó a cabo del 02 de mayo de 2024 al 06 de noviembre de 2024 dentro de las instalaciones del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) se ubican al sur de la Ciudad de México, dentro de Zona de Hospitales en la alcaldía Tlalpan, específicamente en Avenida San Fernando en la colonia Sección XVI, C.P. 14080 (INCan, 2024). Para una mejor referencia visual, se adjunta la Figura 1 sobre la ubicación del Instituto Nacional de Cancerología.

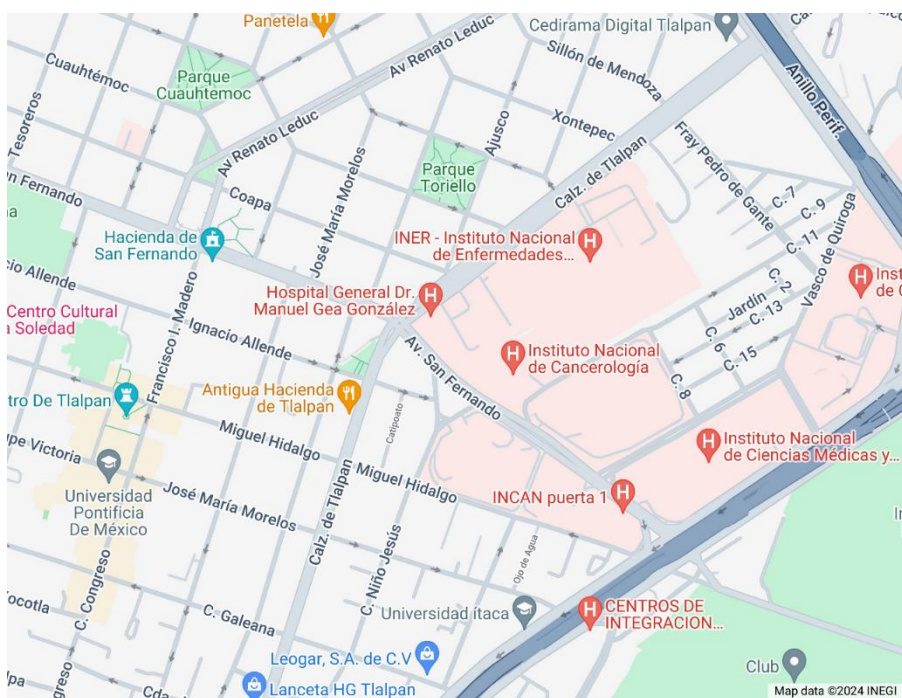


Figura 1. Ubicación del Instituto Nacional de Cancerología (Google MAPS, 2024).

Marco institucional

El Instituto Nacional de Cancerología es un organismo dependiente de la Secretaría de Salud, en el que se brinda atención médica especializada a pacientes oncológicos. Aunado a los servicios de enfoque multidisciplinario en los procesos de diagnóstico, tratamiento, rehabilitación y seguimiento, se toman funciones como centro de enseñanza médica e investigación (INCan, 2024).

La visión del INCan busca formar a líderes en la generación de estrategias para controlar el cáncer y disminuir su impacto como problema de salud pública en

México, tomando como misión el desarrollar la atención médica, educación e investigación oncológica de excelencia en el país (INCan, 2024).

III. Antecedentes

Actualmente, la infección de Virus de Papiloma Humano (VPH) es la infección de transmisión sexual más común. De acuerdo a la Secretaría de Salud (2015), el VPH afecta a ocho de cada diez personas además de ser el agente etiológico del CaCu y otros cánceres anogenitales. La infección persistente por VPH de alto riesgo induce a la transformación celular alterando diversos procesos biológicos, entre ellos la proliferación celular, lo cual ocasiona que, una vez infectadas, las células puedan duplicarse de manera incontrolada, generando lesiones premalignas que, de no ser atendidas, pueden derivar en el desarrollo de CaCu (Toro-Montoya y Tapia-Vela 2021).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó en el año 2022 una incidencia de 660,000 nuevos casos a nivel mundial, lo que coloca al CaCu como el segundo tipo de cáncer más común diagnosticado en mujeres. En México, este cáncer ocupa el segundo lugar, solo después del cáncer de mama, y representa el país con una de las tasas de mortalidad más alta a nivel global (Bray, *et al.*, 2024; Ferlay, *et al.*, 2022).

Mackay (2004) menciona que las técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa punto final (PCR, por sus siglas en inglés) y PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR) son de gran relevancia en la investigación del cáncer al permitir la detección y cuantificación de mutaciones génicas y de niveles de expresión de oncogenes, así como en la evaluación eficaz de distintos tratamientos. Innis, *et al.* (1990) señalan que la PCR permite replicar un segmento específico de ADN de interés para su análisis detallado, mientras que Dymond (2023) destaca que la técnica de qPCR realiza esta misma amplificación, pero con la ventaja de cuantificar la concentración de las secuencias de ADN en cada ciclo de la reacción.

Por su parte, Meftahi, *et al.* (2021) indican que la técnica de Western Blot, si bien facilita el diagnóstico de enfermedades, no es una técnica cuantitativa sino más de

aplicación rutinaria en la que solo se detectan directamente proteínas. Estas moléculas se encuentran en el interior celular, donde cumplen con diversas funciones, por lo que su análisis es útil para el diagnóstico de enfermedades asociadas a mutaciones proteicas (Lozano, et al., 2005).

Por otra parte, el trabajo realizado por Martínez-Carpio, y Navarro en el 2003 señalan que gran parte del conocimiento sobre el comportamiento de las células tumorales ha sido obtenido a través del estudio con cultivos celulares, sobre los cuales es posible aplicar una amplia variedad de técnicas de laboratorio. Si bien el uso de cultivos celulares permite evaluar el comportamiento de las células en condiciones controladas, como lo señalan Castaño y Zapata (2000), se requiere de condiciones controladas de asepsia y de proporcionar los nutrientes adecuados que simulen sus condiciones naturales.

Por lo anterior, es de suma importancia que la alumna se entrene en el manejo de las técnicas ya descritas, las cuales serán herramientas esenciales para el desarrollo de su trabajo en el laboratorio cuyos resultados que permitirán enfrentar y resolver problemas experimentales en la investigación en el área biológica. Esta formación busca fomentar la capacidad de análisis e interpretación de distintos fenómenos biológicos desde un nivel molecular y celular, así como el uso de distintas metodologías experimentales en ciencias de la salud. Además, las técnicas utilizadas en la presente investigación permiten a la alumna integrar habilidades técnicas y teóricas para la resolución de problemas actuales en la investigación de ciencias de la salud.

IV. Objetivos

Objetivo general

Comprender las bases teóricas e implementar las técnicas de cultivo celular y de biología molecular empleadas en investigación básica en salud.

Objetivos específicos

1. Manejar las técnicas de cultivo celular como: descongelación, mantenimiento y preservación de líneas celulares derivadas de CaCu (HeLa, CaSKi, C33-A).
2. Implementar las principales técnicas de análisis de ácidos nucleicos: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR).
3. Aplicar las técnicas de Western Blot para la detección de proteínas totales y nucleares de líneas celulares derivadas de CaCu (HeLa, CaSKi, C33-A).

V. Especificación y fundamento de las actividades realizadas

Metodología

Para comprender las bases teóricas sobre las diferentes técnicas se llevó a cabo la revisión bibliográfica y discusión sobre los temas relacionados con las técnicas a implementar en el laboratorio: cultivo celular, técnicas de análisis de ácidos nucleicos (PCR, qPCR), así como las técnicas de análisis de proteínas (Western Blot).

Cultivo celular

En esta parte del servicio social se implementaron las técnicas de cultivo celular: descongelación, propagación y preservación de diferentes líneas celulares derivadas de CaCu. Las líneas celulares se obtuvieron de la empresa American Type Culture Collection (ATCC).

En este trabajo se emplearon las líneas celulares: HeLa (adenocarcinoma de cérvix con secuencias de VPH-18), CaSki (carcinoma de cuello uterino positiva para el genoma de VPH-16 y VPH-18) y C-33A (carcinoma de cérvix negativo a VPH).

La línea celular C33-A se cultivó en Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con Suero Bovino Fetal (SBF). Para la línea celular HeLa se utilizó DMEM adicionado con la mezcla de nutrientes F-12 de Ham (DMEM F12) suplementado con SBF y se utilizó medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) con SBF para CaSKi a 37°C, en un ambiente húmedo al 5% de CO₂. Al llegar a

confluencia del 90%, las células se tripsinizaron para propagarse y evitar su muerte por anoikis y por falta de nutrientes.

Para permitir la propagación celular, se eliminó el sobrenadante del cultivo celular por aspiración o decantación, este se lavó con 3 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés), para despegar el monocapa celular, se adicionaron 3 ml de tripsina al 2.5%. Después, se observó en el microscopio que las células se encontraran despegadas y se detuvo la reacción con 6 ml del medio correspondiente al 10% de SBF, se recuperó la suspensión en un tubo de 15 ml y se centrifugó a 1,500 rpm durante cinco minutos. El sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron con 1 ml de medio y se sembraron en cajas de cultivo celular para su proliferación.

La congelación de las líneas celulares se realizó con el fin de su preservación a largo plazo. Las células se colectaron con el mismo procedimiento de propagación antes descrito y el botón celular obtenido se resuspendió en 950 µl de medio con 10% de SBF y dimetilsulfóxido (DMSO) al 5%, el cual deshidrata a las células previniendo la formación de cristales de hielo en estas durante su criopreservación. La suspensión se pasó a un criotubo y se congeló a -20°C por 1 hr, después se pasó a -80°C y finalmente después de 24 hrs el criotubo se cambió a nitrógeno líquido para su preservación a largo plazo.

Para utilizar las células preservadas, estas se descongelaron pasando el vial del nitrógeno líquido a -80°C para que la disminución de la temperatura fuese paulatina y no de forma abrupta. El contenido del vial se diluyó en 10 ml del medio correspondiente con 10% de SBF. El cultivo se incubó a 37°C, en un ambiente húmedo al 5% de CO₂.

Ensayos de proliferación celular

Para determinar la proliferación de cada una de las líneas celulares, se empleó la técnica de cristal violeta, el cual es un colorante que interactúa con las proteínas y el ADN celular, penetrando a las células vivas fijadas en la placa, las células muertas

pierden su adherencia y por lo tanto se eliminan durante los lavados, por lo que la cantidad de colorante es directamente proporcional a las células vivas.

En placas de 96 pozos se sembró una densidad de 5×10^6 células/pozo en medio suplementado al 10% de SBF. Se cultivaron durante 24, 48 y 72 hrs, al finalizar este periodo, se lavó las placas con PBS y posteriormente se fijaron con 100 μ l de formol al 10% en PBS durante 20 min en agitación continua a temperatura ambiente. Posteriormente, se tiñó a las células con 100 μ l de cristal violeta al 0.1% en PBS, por 15 min a temperatura ambiente. El exceso de colorante se enjuagó al chorro de agua. Se eluyó el colorante con 100 μ l de ácido acético al 10% en H₂O en agitación continua a temperatura ambiente por 5 min lo que permitió la salida del cristal violeta contenido en el interior de las células. El colorante eluído se cuantificó a 570 nm en un espectrofotómetro (GloMax, PROMEGA).

Western Blot

Las células HeLa, CaSki y C33-A se sembraron a una densidad de 3×10^6 células en cajas de cultivo de 10 cm³. Pasadas 24 h. la monocapa se tripsinizó (como se describió previamente) y se centrifugó a 1500 rpm para obtener el botón celular. Se agregó buffer de extracción de radioinmunoprecipitación (RIPA) que contiene detergentes iónicos, no iónicos e inhibidores de proteasas para permitir la lisis celular y evitar la degradación de las proteínas. El contenido resultante se pasó por una jeringa de insulina para lisar las células y obtener las proteínas totales y se colocaron en hielo durante 30 min, después se centrifugaron a 12,000 rpm, recuperando únicamente el sobrenadante, ya que en el fondo quedó todas las membranas celulares.

La cuantificación de las proteínas totales se realizó mediante el método de Bradford, el cual se basa en el uso del colorante azul brillante de coomasie G-250 (CB G-250, BioRAD, México). En este el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 se une a las proteínas, lo que provoca un cambio en su absorbancia máxima de 465 nm a 595 nm (Kielkopf, *et al.*, 2020). Se separó las proteínas en geles de acrilamida-SDS y se realizó una electroforesis, posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, se bloqueó los sitios no específicos de la membrana con una solución

de leche al 10% en PBS o con albúmina humana. Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavó a las membranas con una solución de TBS-Tween 0.1% para eliminar el anticuerpo unido inespecíficamente por 30 min en agitación continua, pasado este tiempo, la membrana se incubó con los anticuerpos secundarios correspondientes durante una hr y se reveló la membrana en el equipo iBright FL1500 Imaging System.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la extracción de RNA se utilizará el RNeasy Mini Kit marca 50. Las células se sembraron a una densidad de 2×10^6 en placas de 60 cm³, la monocapa se lisó con el buffer 350 µl RLT. Este lisado se colectó en un tubo de 1.5 ml y se conservó en hielo. La muestra se pasó 15 veces a través de una jeringa de insulina para romper las membranas de las células y se agregaron 350 µl de etanol al 70%. Esta mezcla se transfirió a una columna con una membrana de sílice que se centrifugó a 12,000 rpm, durante 15 seg. Se eliminó el líquido eluído de la jeringa. Se agregó 700 µl de buffer RW1 y se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 seg, nuevamente se desechó el sobrenadante. En la columna se agregaron 500 µl de buffer RPE y se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm durante 15 seg finalmente, se agregó 500 µl de buffer RPE y se centrifugó nuevamente por 2 min. La columna se cambió a un tubo de 1.5 ml y se adicionó al centro de la columna 30 µl de agua destilada estéril para obtener el RNA. La muestra se incubó durante cinco min a temperatura ambiente, se centrifugó por 15 seg y se cuantificó el RNA.

Con el kit Nitrogen DNA-Free Kit DNase treatment and removal se eliminó el DNA contenido durante la extracción de RNA. Se agregó 3 µl de buffer 10X de la enzima y 1 µl de la DNasa 1. La muestra se incubó a 37°C durante una hr. Se detuvo la actividad de la enzima con 3 µl de buffer inactivador y se incubó la muestra durante dos min. Posteriormente, la muestra se centrifugó 15 seg a 12,000 rpm. Se recuperaron 20 µl del sobrenadante en un tubo de 1.5 ml. La muestra se cuantificó y se guardó a -80°C.

Se realizó la retrotranscripción de RNA obtenido para obtener cDNA, mediante el uso del Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se preparó un Master Mix (2 µl de 10X buffer RT, 0.8 µl de 25X dNTPs Mix, 2 µl de 10X RT Random Primers, 1 µl de Mutt Sample Reverso Transcriptase y 4.2 µl de agua destilada estéril). En tubos de 0.2 ml se añadió 10 µl de RNA obtenido y 10 µl de Master Mix (MM). La muestra se sometió a PCR durante tres ciclos y al finalizar se refrigeró a -20°C para su posterior uso.

Se realizó electroforesis de PCR punto final con 5 µl de la muestra de cDNA para comprobar la integridad del ensayo antes de realizar la técnica de qPCR. Este cDNA se combinó con 1 ml de Gel Red para teñir la muestra que permitió su visualización y se corrió durante una hr en geles de agarosa. Posteriormente se visualizó en el equipo iBright1500 Imaging System.

Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (qPCR)

El método de qPCR es utilizado para medir el nivel y el cambio relativo de una expresión genotípica, por lo que ofrece la posibilidad de cuantificar diversos números de genes al ser más sensibles, por lo que deben ser diseñados debido a su alta sensibilidad (Postollec, F., *et al.*, 2011). Esta técnica, que utiliza fluorescencia para la detección y cuantificación del gen de interés, se realizó a partir de la transcripción inversa para obtener cDNA en caso de tener muestras de RNA.

La técnica se realizó con SYBR Green como colorante fluorescente para la visualización del producto del qPCR. Se realizó el Master Mix (8.6 µl de H₂O estéril, 10 µl de SYBR, 0.2 µl de Primer Forward y Reverse respectivamente y 1 µl de cDNA estándar). Se tomó 66.5 µl de los primers para los genes que se amplificaron y se añadió 3.5 µl de la muestra de cDNA. Se colocó 20 µl de Master Mix por triplicación para cada muestra de gen. Al terminar se cubrió cada tubo con papel seda para evitar que las muestras se evaporen. Los tubos se colocaron en una placa y esta se centrifugó a 1200 rpm por 2 min y se colocó en el equipo CFX 96 Real-Time PCR System durante una hora y 20 min.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la proliferación celular se analizaron en base a graficas realizadas en Excel.

Los hyper films obtenidos del western blot fueron analizados en el programa ImageJ para obtener la cantidad de proteína presente en las células y posteriormente los datos fueron analizados en el programa Sigma en el cual se realizó una prueba ANOVA de una vía y prueba de Tukey para obtener una comparación entre los niveles de las proteínas evaluadas en las líneas celulares.

VI. Resultados

Cultivo celular

Los resultados obtenidos sobre las líneas celulares empleadas mostraron una confluencia del 40% desde su descongelación con características morfológicas propias de cada línea. Las células alcanzaron una confluencia del 80% después de 48 hrs en el caso de la línea celular HeLa, la cual durante todos los experimentos realizados mostró la mayor tasa de proliferación. En el caso de C33-A mostró una confluencia del 90% después de 72 hrs. La línea celular CaSki resultó tener una tasa de replicación celular menor que las células Hela y C33-A, lo que puede relacionarse a su alto contenido de células troncales, ya que esta línea celular es producto de una metástasis a CaCu. La preservación de las líneas celulares mediante criopreservación en nitrógeno líquido permitió que la viabilidad celular fuera adecuada para el uso de las células a largo plazo.

Los resultados obtenidos mostraron que las técnicas de cultivo celular: descongelación, propagación y congelación fueron adecuadas para mantener a las líneas HeLa, CaSki y C33-A como se puede observar en Fig 1. a, b y c.

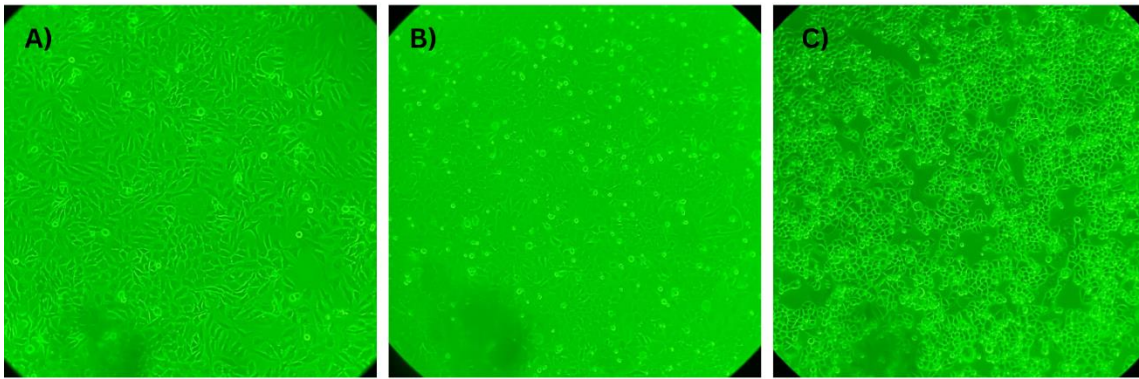
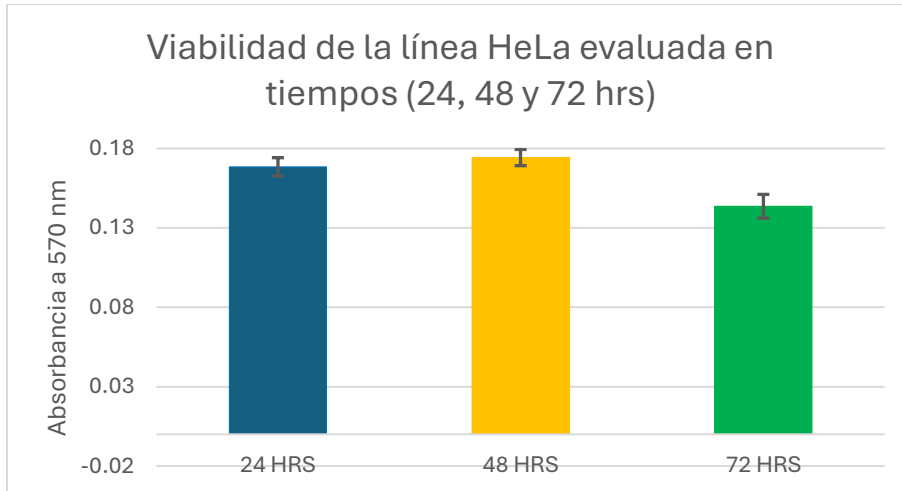


Figura 1. Células en cultivo. A) Línea celular HeLa en 90-100% de confluencia, mostrando una monocapa distribuida correctamente, con mínimas células en suspensión y con pocos espacios sin crecimiento. B) Línea celular CaSki en confluencia de 70-80%, células presentes y con agrupamientos, pero sin una monocapa uniforme y con células sin adherencia. C) Confluencia de la línea celular C-33A en 90% de confluencia, distribución densa, pero con espacios aún visibles.

Ensayos de proliferación celular

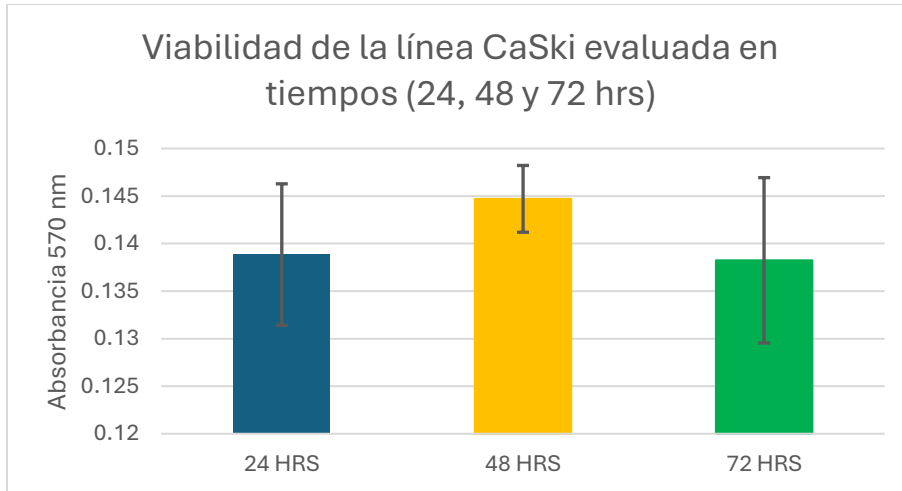
Las células adherentes en un cultivo se desprenden del fondo de la placa durante la muerte celular por lo que los ensayos de cristal violeta permiten la cuantificación de las células sobrevivientes y fijadas al sustrato debido a esa característica.

En la línea celular HeLa se registró la mayor absorbancia a 48 hrs (0.1743), que el observado a 24 hrs, lo cual es de esperarse ya que estas células se duplican cada 24 hrs, sin embargo, a las 72 hrs se detectó una disminución en la proliferación celular (0.1436) con respecto a las 48 hrs (Grafica 1). Los resultados obtenidos podrían indicar que esta línea celular no se encontraba en óptimas condiciones para continuar su proliferación por distintas razones: la confluencia era demasiado alta lo que impidió continuar el crecimiento celular debido al espacio o que al momento de realizar la siembra de las células en la caja de cultivo evaluada a las 72 hrs hubo menor densidad, por lo que aunque la proliferación continuó, no se detectó aumento en la proliferación porque el ensayo inicio con menos células que las que se sembraron en las cajas de cultivo que se evaluaron a las 24 y 48 hrs.



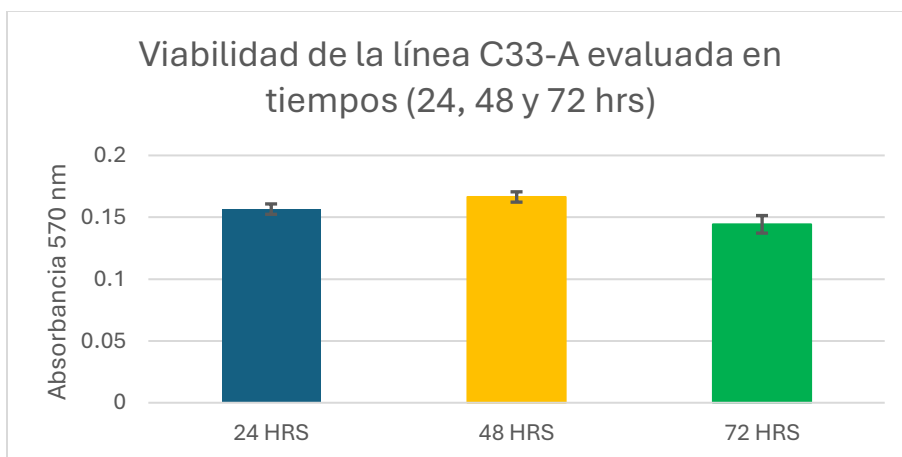
Grafica 1. Proliferación celular de la línea HeLa a las 24, 48 y 72 hr.

La línea celular CaSki mostró un patrón diferente de crecimiento celular, si bien obtuvo un valor promedio máximo a las 48 hrs (0.1447) seguido de una disminución promedio bastante notable a las 72 hrs (0.1382). Los resultados muestran que la proliferación de CaSki es menor en comparación con HeLa o C33-A lo que puede relacionarse a que las condiciones para el montaje del experimento aún no eran las adecuadas por lo que pudo existir una incorrecta distribución al momento de montar el ensayo, otra de las razones por las que se pudo haber obtenido estos resultados es a que la siembra no tuvo un número exacto en cada uno de los pozos o en las placas, sugiriendo que las células no habían alcanzado la confluencia total encontrándose aún en fase de crecimiento, por otra parte, esta respuesta también pudo deberse a factores como lo es la falta de suficientes nutrientes dentro del cultivo.



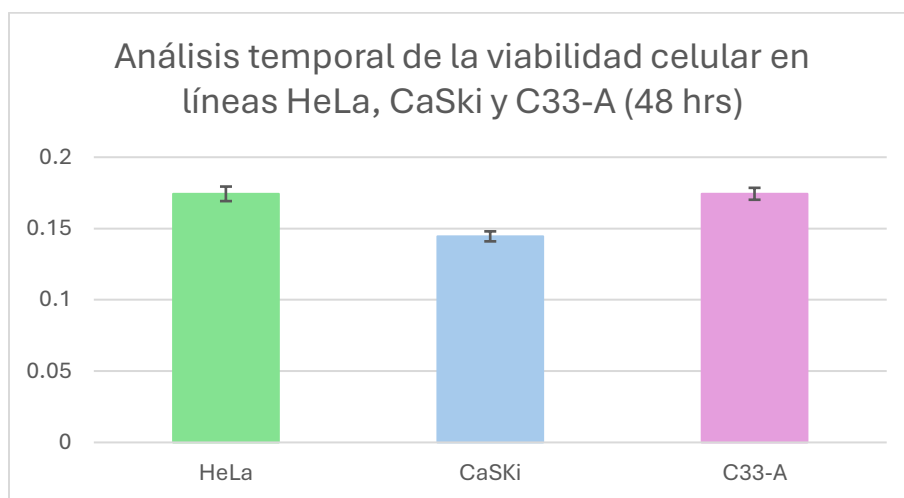
Grafica 2. Viabilidad celular promedio de CaSki evaluada a las 24, 48 y 72 hrs.

Al igual que en las anteriores líneas celulares C33-A registró su mayor promedio de absorbancia a 48 (0.1663) y a las 72 hrs no se observó una reducción tan pronunciada como en las otras líneas (0.1442) lo que podría significar la presencia de factores limitantes en el medio de cultivo que impedían su crecimiento después de las 48 hrs. Al igual que en los anteriores experimentos, la placa de 72 hrs pudo sembrarse con un menor número de células por lo que se enmascaró el aumento en la proliferación celular al compararla con las placas de 24 y 48 hrs que se sembraron con un mayor número de células. El descenso sobre la densidad de células en las placas, en lugar del crecimiento de proliferación celular en el presente trabajo muestra la importancia de tener un número exacto en cada una de las cajas del experimento.



Grafica 3. Promedio de viabilidad celular de C33-A evaluado a 24, 48 y 72 hrs.

Los datos obtenidos muestran que las líneas con mayor viabilidad celular se presentan en HeLa y C33-A a las 48 hrs (Gráfica 3), mientras que CaSki muestra una menor proliferación celular. La disminución en la absorbancia a 72 hrs en todas las líneas se puede relacionar a factores como el agotamiento de nutrientes o la confluencia celular además de que las diferencias de tasa de crecimiento y muerte celular entre las líneas podrían derivarse a sus características biológicas y a su respuesta al entorno de cultivo. Además, los resultados sugieren que las líneas no estaban en condiciones óptimas para mantener su crecimiento, lo cual podría deberse a que la confluencia era mayor que la esperada lo que limitó el crecimiento celular por falta de espacio o que al momento de sembrar las células dentro de los pozos evaluados a las 72 horas la concentración fue baja, de modo que no se alcanzó la densidad celular esperada para ese punto del experimento.



Grafica 4. Viabilidad celular promedio de las líneas celulares HeLa, CaSki y C33-A evaluado a 48hrs.

Western Blot

Se determinó la presencia de la proteína constitutiva actina, la cual forma parte del citoesqueleto celular. En todas las líneas celulares derivadas de CaCu se observó esta presencia, sin embargo, en la línea de HeLa se mostró en mayores niveles, sin embargo, la expresión se mostró ligeramente menor en las células CaSki y C33-A. Esto nos muestra que la carga de proteínas en los carriles no fue completamente

homogénea, por lo que se necesita equilibrar la cantidad de proteína que se coloca en cada carril, revisando el pipeteo o la cuantificación de la proteína que se realizó.

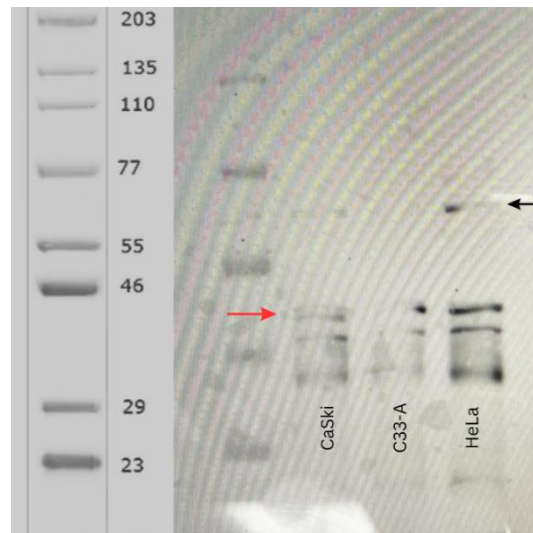


Figura 2. Niveles de la proteína actina (42 kDa) en las líneas celulares CaSki, C33-A y HeLa por western blot, la flecha roja indica el peso esperado para la actina.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizó la amplificación del gen 18S, por PCR punto final, para verificar la integridad del RNA en todas las muestras de las líneas celulares estudiadas. La intensidad de las bandas resultó homogénea entre las muestras, aunque con una leve variación en la intensidad de cada una. No se detectó algún patrón de amplificación anormal, lo que indica que las condiciones de PCR fueron adecuadas, sugiriendo que la eficiencia del PCR fue optima lo que permite su uso como control de expresión en estudios posteriores.

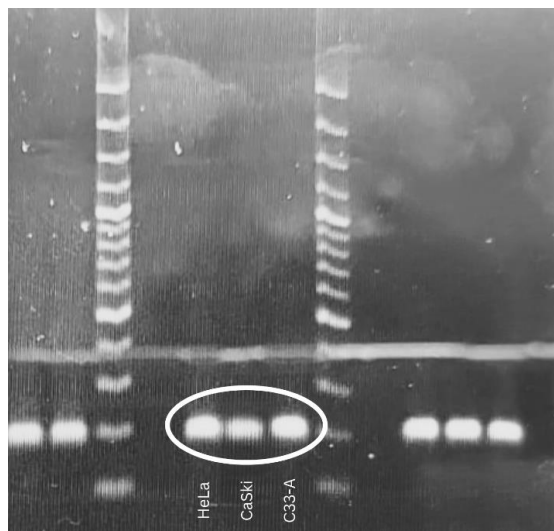


Figura e. Amplificación del gen 18S de las líneas celulares CaSki, C33-A y HeLa por PCR punto final.

Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (qPCR)

La curva de ampliación obtenida comienza a mostrar la expresión del gen 18S a partir del ciclo 25, lo que indica una expresión relativamente baja del gen en las muestras analizadas que podría deberse a una baja concentración de las muestras de cDNA o a la baja expresión del gen analizado. El umbral de las muestras llega en el ciclo 40 en donde la escala vuelve a ser lineal en todas las muestras, siendo la muestra de HeLa la que se encuentra con mayor expresión del gen en cada ciclo y CaSki con menor expresión.

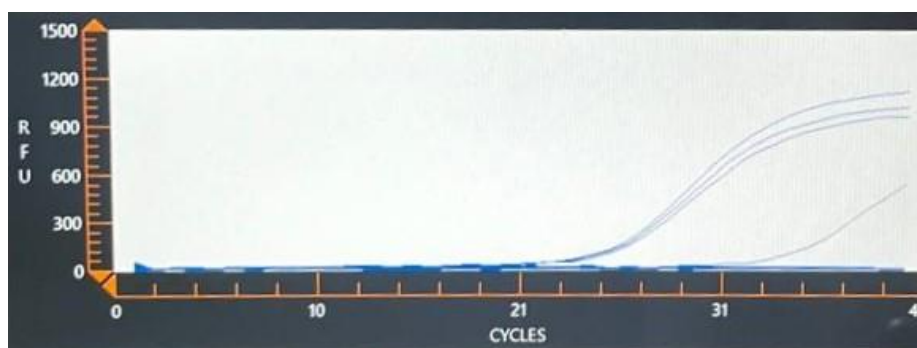


Figura 3. Amplificación del gen 18S en qPCR del cDNA de las líneas celulares CaSki, C33-A y HeLa.

VII. Impacto de las actividades realizadas

Se observó que los cultivos celulares mostraron diferencias en la tasa de proliferación de las líneas estudiadas, siendo HeLa la que mostró un crecimiento más rápido, mientras que CaSki tuvo una menor tasa de proliferación, lo que pudo deberse al rápido crecimiento y resistencia a la apoptosis de la línea celular HeLa, por lo que usualmente es utilizada en investigación de cáncer o como línea de control debido a su facilidad de proliferación mientras que el crecimiento celular puede variar según las condiciones del medio en el que se encuentren.

En el Western Blot, la detección de la proteína de carga fue consistente en todas las muestras, aunque con leves variaciones en la intensidad de las bandas por lo que es necesario que la carga de proteína en futuros experimentos se uniforme para mejores resultados. En los análisis de PCR y qPCR, se logró detectar la expresión del gen 18S, demostrando así la viabilidad de estas técnicas para la detección de expresión del gen mencionado en las líneas celulares estudiadas.

Para la optimización de viabilidad celular se recomienda mejorar el sembrado, realizar más cálculos y eluciones para que queden a una misma la densidad, además de realizar cambios de medio a las 48 horas para proveer a las células los nutrientes necesarios para su proliferación y prevenir la disminución en la viabilidad celular que pueda estar ocasionada por el agotamiento de nutrientes. Para determinar qué factores influyen sobre la viabilidad celular se pueden realizar más pruebas con distintas condiciones de cultivo que permitan observar las diferencias de viabilidad celular entre líneas.

En el caso de Western Blot la cantidad de la proteína cargada en los geles tendrá que estandarizarse mejorando el pipeteo para colocar la misma cantidad de proteína en cada pozo. Se sugiere la realización de más ensayos sobre cada una de las técnicas utilizadas lo que permitirá la confiabilidad de los datos obtenidos, como es el caso de proliferación celular. Sería interesante de igual manera la ampliación del estudio que incluyan efecto de tratamientos específicos para evaluar la respuesta de las líneas o implementar experimentos adicionales para evaluar la respuesta de

cada línea celular, siendo que los ensayos obtenidos contribuirán al entendimiento de técnicas de biología molecular, sirviendo como base para futuras investigaciones dentro del área.

VIII. Descripción de las actividades desarrolladas con los objetivos de formación del plan de estudios

En mi estancia de servicio social en el INCan participé en actividades de laboratorio que ayudaron a fortalecer mis conocimientos teóricos y prácticos con distintas técnicas de biología molecular y cultivo celular de líneas celulares derivadas de cáncer cervicouterino: HeLa, CaSki y C33-A, con las que realicé ensayos de cristal violeta, Western Blot, PCR y qPCR, los cuales me ayudaron a profundizar en conocimientos sobre los procesos de los seres vivos desde nivel molecular hasta el celular.

El conocimiento práctico que adquirí contribuye al desarrollo sobre mis habilidades técnicas fundamentales para el diagnóstico y manejo de la diversidad biológica adquiriendo conocimientos que ayuden a realizar actividades que ayuden en actividades e investigaciones científicas para desarrollar nuevas estrategias de manejo de recursos bióticos permitiéndome, con la elaboración de distintos experimentos, abordar problemas desde una perspectiva científica de fenómenos biológicos.

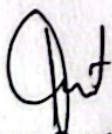
La estancia del presente trabajo en un ámbito de salud pública me sensibilizó sobre la importancia de aplicar los conocimientos biológicos en beneficio de la sociedad al tratarse sobre una investigación sobre una enfermedad con alta incidencia en México reforzando el compromiso social y ético lo cual me permitió comprender la relevancia de la biología en la prevención y en el tratamiento de enfermedades.

REFERENCIAS

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular Biology of the Cell* (6ª ed.). Garland Science. ISBN: 978-0815344643.
- American Cancer Society. (s.f.). *¿Qué es el cáncer de cuello uterino?* <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-cuello-uterino/acerca/que-es-cancer-de-cuello-uterino.html>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Castaño, M., & Zapata, J. (2000). Cultivos celulares. En *Principios de virología* (3.ª ed., pp. 49–64). Ediciones Universidad de Antioquia. ISBN 978-958-8790-15-2
- Dymond, J. (2013). Explanatory chapter: Quantitative PCR. *Methods in Enzymology*, 529, 279–289. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00023-9>
- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Laversanne, M., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Znaor, A., Soerjomataram, I., & Bray, F. (2024). *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. International Agency for Research on Cancer. Recuperado el 14 de mayo de 2024 de <https://gco.iarc.who.int/today>
- Fernández-Martínez, A. D., Hernández-Vázquez, F. J., & Ramírez-Torres, M. A. (2024). Cáncer cervicouterino: Avances y desafíos en la prevención y el tratamiento. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 35(3), 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2024.03.003>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

- Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., & White, T. J. (1990). Optimization of PCRs. En *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 3–12). Academic Press.
- Instituto Nacional del Cáncer. (2023). *HPV and Cancer*. Recuperado el 14 de mayo de 2024, de <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/infectious-agents/hpv-and-cancer>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2023). *Tratamiento del cáncer de cuello uterino según el estadio*. Recuperado el 14 de mayo de 2024, de <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cuello-uterino/tratamiento/segundo-estadio>
- Instituto Nacional de Cancerología. (2024). *Historia. Misión y Visión*. Secretaría de Salud. Recuperado el 26 de abril de 2024, de <http://www.incan.salud.gob.mx/>
- Instituto Mexicano del Seguro Social. (2022, 3 de marzo). *Epidemiología del cáncer cervicouterino*. <https://www.gob.mx/imss/articulos/epidemiologia-del-cancer-cervicouterino?idiom=es>
- Instituto Mexicano del Seguro Social. (s.f.). *Cáncer cérvico-uterino*. <https://imss.gob.mx/salud-en-linea/cancer-cervico-uterino>
- Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. (2020). Bradford assay for determining protein concentration. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020(4), prot102269. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot102269>
- Koskas, M., Amant, F., Mirza, M. R., & Creutzberg, C. L. (2021). Cancer of the corpus uteri: 2021 update. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 155(Suppl. 1), 45–60. <https://doi.org/10.1002/ijgo.13866>
- Lozano, J., Galindo, J., García-Borrón, J., Martínez-Liarte, J., Peñafiel, R., & Solano, F. (2005). *Bioquímica y biología molecular para ciencias de la salud* (3.^a ed.). McGraw-Hill Interamericana.
- Mackay, I. M. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(3), 190–212. <https://doi.org/10.1111/j.1198-743x.2004.00722.x>

- Martínez-Carpio, P., & Navarro, M. (2003). El cultivo celular en la investigación básica del cáncer de mama. *Clinical & Translational Oncology*, 5(4), 181–188.
- Meftahi, G. H., Bahari, Z., Zarei Mahmoudabadi, A., Iman, M., & Jangravi, Z. (2021). Applications of western blot technique: From bench to bedside. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 49(5), 509–517. <https://doi.org/10.1002/bmb.21516>
- Organización Mundial de la Salud. (2023). *Cáncer de cuello uterino*. Recuperado el 4 de mayo de 2024, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer>
- Puga, O., Belmar, F., & Pertossi, E. (2024). Prevención y detección precoz del cáncer cervicouterino. *Revista médica clínica Las Condes*, 35(2), 95–105.
- Secretaría de Salud. (2015). *Cáncer de cuello uterino*. Recuperado el 4 de mayo de 2024, de <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/cancer-de-cuello-uterino#:~:text=Panorama%20Mundial.pa%C3%ADses%20en%20v%C3%ADas%20de%20desarrollo>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Toro-Montoya, A., & Tapia-Vela, L. (2021). Virus del papiloma humano (VPH) y cáncer. *Medicina & Laboratorio*, 25, 467–483. <https://doi.org/10.36384/01232576.431>



Dra. Adriana Contreras Paredes
Asesor externo Ced. Profesional: 2382510
Laboratorio de Epidemiología y Biología Molecular de
Virus Oncogénicos.
Instituto Nacional de Cancerología

Vo. Bo.



Dra. María del Carmen Monroy Dosta
Asesora interna (28906)
Laboratorio de Análisis Químico del Alimento Vivo
Universidad Autónoma Metropolitana-X