

PROYECTO FINAL DE INGENIERIA

EFECTO DE LA RIGIDEZ DE LA MATRIZ EXTRACELULAR SOBRE LA EXPRESION DE LA ENZIMA CICLOOXIGENASA-2 EN CELULAS TUMORALES DE CANCER DE MAMA

Sanchez, María Belén – LU: 1036903

Veigas, Florencia – LU: 1029476

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Güttlein, Leandro. Fundación UADE

Co-tutor:

Prada, Federico. Fundación UADE

Diciembre 21, 2017



**FUNDACION UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERIA Y CIENCIAS EXACTAS**

CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
FINANCIAMIENTO	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 Generalidades acerca del cáncer	8
1.1.1 El cáncer como concepto	8
1.1.2 Progresión tumoral	10
1.1.2.1 Características biológicas de las células neoplásicas seleccionadas durante la progresión tumoral	10
1.1.2.2 Invasión y metástasis	12
1.1.2.3 Angiogénesis	13
1.1.2.4 Evasión del sistema inmune	14
1.2 Cáncer de mama	14
1.2.1 Glándula mamaria	15
1.2.2 Clasificación del cáncer de mama	16
1.3 La célula y su entorno	19
1.3.1 Matriz Extracelular	19
1.3.2 Mecanotransducción	20
1.3.2.1 Mecanotransducción en el contexto de la glándula mamaria normal y patológica	22
1.3.2.2 Métodos para el estudio de mecanotransducción	25
1.4 La enzima Ciclooxygenasa	30
1.4.1 Rol de COX-2 en cáncer de mama	31
1.4.2 Regulación de la expresión de COX-2 y funciones biológicas en la progresión tumoral.	33
1.5 Modelo biológico utilizado: cultivos celulares	36
2. HIPOTESIS	38
3. OBJETIVOS	39
4. MATERIALES Y MÉTODOS	40
4.1. Lugar de trabajo	40
4.1.1. Cuarto de cultivo celular	40
4.1.2. Laboratorio de Microbiología y Biotecnología	42
4.1.3. Sala de revelado	42
4.2. Materiales	44
4.2.1. Cultivos celulares: línea celular y reactivos	44
4.2.2. Hidrogeles de acrilamida de rigidez variable	45
4.2.3. Colorantes de fluorescencia, anticuerpos y cebadores de ADN	46
4.3. Métodos	47
4.3.1. Mantenimiento de la línea celular	47
4.3.1.1. Generación del stock celular	47

4.3.1.2.	Descongelado	47
4.3.1.3.	Cambio de medio y repique en monocapa	48
4.3.1.4.	Congelado	48
4.3.1.5.	Recuento de células	48
4.3.1.6.	Determinación de contaminación por micoplasma	49
4.3.1.7.	Determinación de viabilidad celular por MTS	49
4.3.2.	Cultivo de células sobre soportes de rigidez variable: hidrogeles de acrilamida	50
4.3.5.	Retrotranscripción seguida de PCR punto final (RT-PCR)	53
4.3.6.	SDS-PAGE y Western Blot	54
4.3.7.	Obtención y análisis de datos	56
5.	RESULTADOS	57
5.1.	Preparación del stock celular necesario para el diseño propuesto	57
5.2.	Puesta a punto del modelo experimental	58
5.2.1.	Protocolo de preparación de Hidrogeles de Acrilamida de Rigidez Variable	58
5.2.1.1.	Mayor adhesión de las células plaqueadas sobre el fondo del pocillo que sobre el hidrogel independientemente de su rigidez.	59
5.2.1.2.	Alto número de células en suspensión tras el plaqueo.	59
5.2.1.3.	Poca adhesión de células en geles de 0,03 y 0,06%.	60
5.2.1.4.	Formación de precipitado luego del bloqueo con la solución de BSA.	60
5.2.1.5.	Solución de colágeno de concentración desconocida.	61
5.2.1.6.	Polimerización del hidrogel	62
5.2.1.7.	Solución de NHS	65
5.2.2.	Selección de puntos de rigidez	65
5.2.3.	Determinación de tiempo de cultivo y optimización de toma de muestra	67
5.3.	Caracterización de la rigidez de los hidrogeles: medición del Modulo de Young	69
5.4.1.	Evaluación de la morfología celular	73
5.4.2.	Evaluación de la expresión de COX-2 a nivel de ARN: RT-PCR	75
5.4.3.	Evaluación de la expresión de COX-2 a nivel proteico: Western Blot	76
5.5.	Análisis estadístico de la expresión de COX-2 a nivel proteico	77
5.6.	Producción final	79
6.	DISCUSIÓN	80
7.	CONCLUSION	87
8.	BIBLIOGRAFÍA	88
9.	ANEXOS	94
9.1.	Anexo I: Técnica aséptica	94
9.2.	Anexo II: POEs	98
9.2.1.	TÉCNICAS DE CULTIVOS CELULARES PARA EL TRABAJO CON LA LÍNEA CELULAR 4T1	98
9.2.2.	FABRICACIÓN DE SOPORTES DE CULTIVO DE RIGIDEZ VARIABLE	112
9.2.3.	EXTRACCIÓN DE ARN Y/O PROTEINAS DE CÉLULAS CRECIDAS SOBRE SOPORTE DE RIGIDEZ VARIABLE	120
9.2.4.	TINCION CELULAR CON FALOIDINA Y REACTIVO DE HÖESCHT	128

9.2.5.	ELECTROFORESIS EN GELES DESNATURALIZANTES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	134
9.2.6.	CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS POR SDS-PAGE	143
9.2.8.	RT-PCR PARA LA DETECCIÓN DE COX-2 Y HPRT	166
9.3.	Anexo III: Esquemas de trabajo	174
9.3.1.	Esquema del procedimiento de descongelado	174
9.3.2.	Esquema del procedimiento del repique en monocapa	174
9.3.3.	Esquema del procedimiento de congelado	174
9.3.4.	Esquema del protocolo de tinción con colorante Hoescht y faloidina	175
9.3.5.	Esquema del protocolo de toma de muestra de ARN	175
9.3.6.	Esquema del protocolo de toma de muestra de proteínas	176

AGRADECIMIENTOS

A nuestras familias y amigos que nos acompañaron a lo largo de este camino. Cada uno de ellos nos dieron la contención y el amor que necesitábamos para afrontar todo lo que implica el cursar una carrera universitaria...y el entrometerse en la ciencia. Sin su apoyo incondicional hubiera sido más difícil. Este logro, como todo lo que hacemos en nuestra vida, es compartido y es parte de ellos.

A nuestros compañeros del trabajo y jefes que nos dieron el tiempo que necesitábamos para terminar la tesis manifestando siempre apoyo y dándonos energía incluso en los malos días.

A nuestro tutor Dr. Leandro Güttlein, quien nos guió y acompañó muy de cerca pero al mismo tiempo también confió en nosotras y nos dio el espacio para pensar y desarrollar el criterio y pensamiento crítico necesarios para encarar nuestra vida profesional. Aprendimos mucho a su lado y haber desarrollado este trabajo bajo su dirección es un lindo cierre para la carrera que elegimos y amamos.

A Nacho y Guillu, que todas las mañanas, tardes y noches nos dieron no sólo los insumos que necesitábamos sino también la palabra justa para hacer más ameno el trabajo y reírnos aun cuando las cosas no iban como queríamos. Hicieron que durante estos años el ir al laboratorio, incluso en el verano, incontables horas sea divertido.

Al Dr. Leonardo Lizarraga y la Lic. Antonela Colonnella, investigador y becaria respectivamente del Grupo de Biopolímeros del Centro de Investigaciones en Bionanociencias del CONICET por su buena predisposición, brindándonos su tiempo y recursos para establecer la colaboración.

A la Universidad por habernos dado el espacio y los recursos para desarrollar este trabajo. Durante estos años fue nuestro lugar, nuestro mundo..uadelandia.

Y por último, al director de carrera y docente, Dr. Federico Prada por habernos apoyado, escuchado, alentado y ayudado en todo momento.

GRACIAS

RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad alrededor del mundo, siendo el cáncer de mama el de mayor incidencia en mujeres. La influencia de la rigidez de la matriz extracelular (MEC) es un parámetro clave en su desarrollo y progresión. El tejido mamario denso es un factor de riesgo para cáncer de mama, aumentando la probabilidad de padecerlo entre 4 a 6 veces.

La enzima Ciclooxigenasa (COX) cataliza la conversión del ácido araquidónico en prostanoïdes, una familia de mediadores lipídicos con una amplia variedad de funciones biológicas. Su isoforma COX-2 se encuentra ausente en la mayoría de los tejidos y sobre-expresada en sitios de inflamación y/o durante la progresión tumoral. Una gran proporción de tumores de mama sobre-expresan COX-2 y esto se asocia a un alto grado de indiferenciación histológica, alto riesgo de metástasis, efectos pro-angiogénicos e inmunosupresores y menor supervivencia. La expresión de COX-2 se induce, entre otras cosas, por cambios en la rigidez de la matriz. Sin embargo, no existe hasta el momento ninguna evidencia de este tipo de regulación en cáncer de mama, contexto patológico en el cual esta alteración tiene un rol fundamental.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la influencia de la rigidez de la matriz extracelular sobre la expresión de COX-2 en un modelo de cáncer de mama 4T1, línea celular derivada de adenocarcinoma mamario murino. Para ello se utilizaron geles de poliacrilamida funcionalizados con colágeno para cultivar las células en soportes de rigidez creciente, y así evaluar los cambios en la morfología celular y la expresión de COX-2 a nivel transcripcional y proteico.

En nuestro estudio no se obtuvieron evidencias significativas que permitan concluir que la rigidez de soporte afecta la expresión de COX-2 en el modelo de cáncer de mama utilizado. Sin embargo, no se descarta que puedan hallarse otros resultados variando las condiciones de estudio como el tipo de proteína de la MEC utilizada, tiempo de incubación y porcentaje de rigidez. Con propósitos académicos, se ha logrado la puesta a punto de metodologías para el estudio del comportamiento celular en materia de mecanotransducción, lo cual significa un trabajo sin precedentes en los laboratorios de UADE, quedando a disposición del alumnado.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of morbidity and mortality around the world, with breast cancer being the most prevalent in women. The influence of extracellular matrix (ECM) stiffness is a key parameter in cancer development and progression. Dense breast tissue is an important risk factor for breast cancer and represents a 4 to 6 times higher risk of developing the disease.

Cyclooxygenase (COX) catalyzes the conversion of arachidonic acid to prostanoids, a family of lipid mediators with a wide variety of biological functions. The COX-2 isoform is absent in most tissues and usually overexpressed at sites of inflammation and/or during tumor progression. A large proportion of breast tumors overexpress COX-2 and this is associated with a higher degree of histological dedifferentiation, higher risk of metastasis, increased angiogenesis, induction of an immunosuppressive microenvironment and lower survival. COX-2 expression has been shown to be induced by changes in matrix stiffness in other cancer types. However, there is no evidence to date of this type of regulation in breast cancer, pathological context in which this plays a fundamental role.

The aim of this work was to study the influence of the rigidity (stiffness) of the extracellular matrix on the regulation of the expression of COX-2 in the 4T1 breast cancer mouse model, a cell line derived from murine mammary adenocarcinoma. We used collagen-polyacrylamide gels to culture the cells in substrates with increasing degree of stiffness in order to evaluate changes in cell morphology and COX-2 expression at the transcriptional and protein levels.

Our study shows there was no significant evidence to conclude that extracellular matrix stiffness affects COX-2 expression in the breast cancer model under study. However, we hypothesized that varying the conditions of the study such as the type of ECM proteins used or the time of incubation and the percentage of stiffness can yield different results. For academic purposes, we want to highlight that our work has been the basis for the development of new methodologies for the study of cell behavior in the field of mechanotransduction. This represents an unprecedented undertaking at UADE Laboratories and will be made available to the upcoming students' generations.

FINANCIAMIENTO

El presente proyecto, fue reconocido por un subsidio de la UADE (ACyT A15T19), el cual fue otorgado luego de una evaluación por parte de un jurado competente. Mediante dicho subsidio se realizó la compra de un total de 8 ítems entre reactivos y materiales, los cuales se detallan en la tabla que se presenta a continuación.

Reactivo	Cantidad
281778-100ML. 3-AMINOPROPYLTRIMETHOXYSILANE, 97% (Sigma)	2
A8060-1G ACRYLIC ACID N-HYDROXYSUCCINIMIDE ESTER (Sigma)	1
31800022 RPMI 1640 (Invitrogen)	1
CUBREOBJETOS CIRCULARES DE 25 MM Ø, x 100 UNID, PM- 0111650 (Marienfeld)	2
TS-42801 SURFASIL SILICONIZING FLUID (Thermo Scientific)	1
PIERCE ECL WESTERN BLOTTING SUBSTRATE, cod: 32109 (Thermo Scientific)	1

Tabla 1. Reactivos comprados con la ACyT otorgada por UADE para el desarrollo del presente proyecto

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades acerca del cáncer

1.1.1 El cáncer como concepto

El **cáncer** es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad alrededor del mundo. En el último informe de la Organización Mundial de la Salud, correspondiente al año 2012, se registraron 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer (I.A.R.C. 2014). Asimismo, el 20% del total de las defunciones que se producen anualmente en Argentina se deben a esta enfermedad, representando aproximadamente 60.000 muertes por año. Frente a este preocupante panorama, es fundamental comprender los mecanismos moleculares de la enfermedad para promover la prevención, optimizar el diagnóstico temprano, desarrollar nuevas estrategias terapéuticas y perfeccionar las existentes contribuyendo de esta manera a una mejor calidad de vida de los pacientes.

Ante todo es primordial comprender que cáncer, tumor o neoplasia, son términos genéricos que designan un amplio grupo de enfermedades. Johannes Müller en el año 1838, por primera vez dijo que “el cáncer estaba hecho de células y la forma celular se asemeja a la del tejido original, pero las mismas no venían de células normales” (Haggard and Smith, 1938). Un siglo más tarde, Rupert A. Willis en 1953 postuló que un tumor es una masa anormal de tejido, que presenta crecimiento excesivo, no coordinado con el de los tejidos normales, independiente del patrón funcional y estructural del organismo, indefinidamente progresivo, y que persiste aun cuando hayan finalizado los estímulos que inicialmente lo evocaron (Willis, 1953).

El paradigma actual sostiene que un tumor es algo más complejo que una masa de células neoplásicas. Por el contrario, se entiende al tumor como una entidad multicelular heterogénea formada por **células neoplásicas** y **células estromales** “normales” que son activadas y/o reclutadas al **microambiente tumoral** (*Figura 1*). Otro componente fundamental del microambiente tumoral es la **matriz extracelular (MEC)**, tema que será tratado con mayor profundidad en otra sección, dada su relevancia en el presente trabajo de tesis.

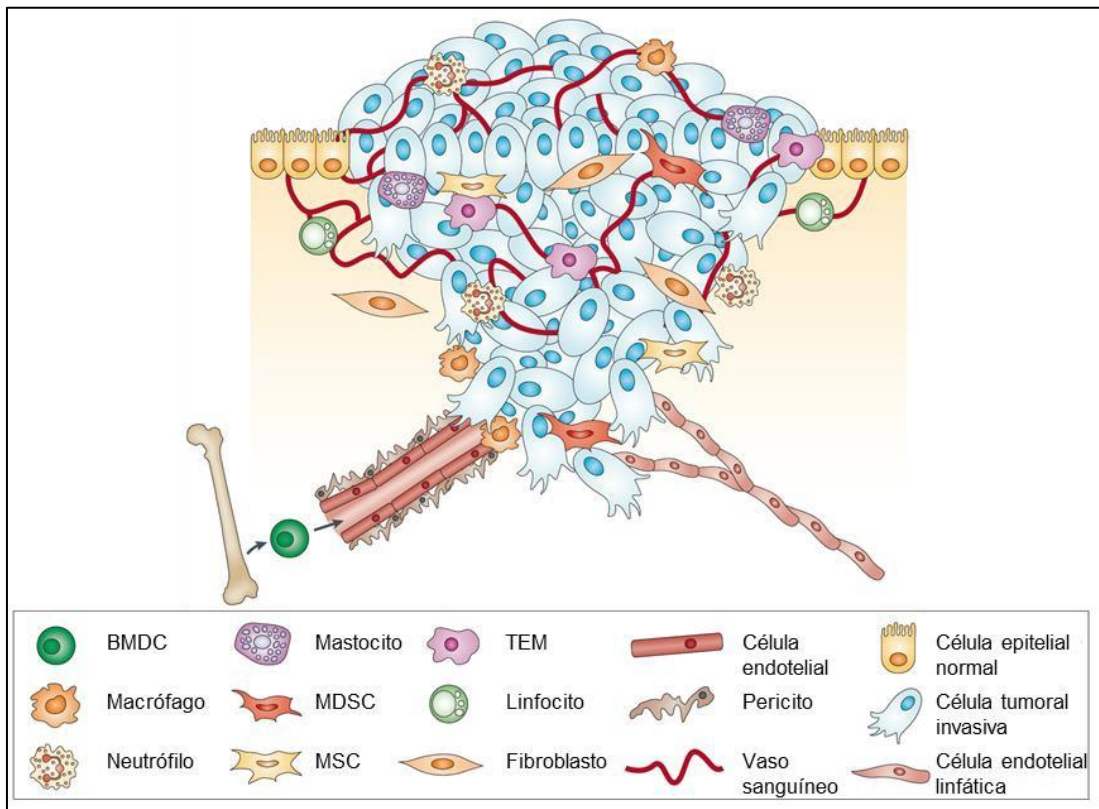


Figura 1: El microambiente tumoral. Las células tumorales en el tumor primario están rodeadas por un microambiente complejo formado por matriz extracelular (MEC) y diferentes tipos celulares que incluyen células endoteliales que forman parte de los sistemas circulatorios sanguíneo y linfático, fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, linfocitos, monocitos, células mieloides-supresoras (MDSCs) y células madres mesenquimales (MSCs). Adaptado de Tlsty&Coussens, 2006 (Tlsty and Coussens, 2006).

Por último, es importante destacar que el tumor no es una entidad patológica estática, sino que progresa indefinidamente por diferentes estadios a través de un proceso de malignización conocido como **progresión tumoral**. Así, por ejemplo, cuando las células tumorales permanecen en la capa epitelial, sin invadir la **membrana basal** y el estroma, hablamos de **carcinomas *in situ***. Por el contrario, cuando las células epiteliales tumorales adquieren la capacidad de invadir y destruir la membrana basal y el estroma subyacente (**invasión local**) hablamos de un **tumor invasivo**. Si estas células neoplásicas logran penetrar en los vasos sanguíneos y/o linfático, diseminarse y crecer como tumores secundarios en los nodos linfáticos locales o en órganos distantes entonces hablamos de **metástasis**.

1.1.2 Progresión tumoral

La carcinogénesis es un proceso lento y de múltiples etapas. La primera etapa, **iniciación**, consiste en la mutagénesis de células iniciadoras por acción de agentes exógenos denominados carcinógenos. En referencia a esto, hoy se sabe que el cáncer se desarrolla como consecuencia de alteraciones genéticas (mutaciones) heredables o adquiridas *de novo* que conducen en forma gradual a la transformación maligna de células normales (Hanahan and Weinberg, 2000). La segunda etapa, **promoción**, es más lenta y corresponde a la expansión clonal de las células iniciadoras dando lugar a tumores benignos. Finalmente, la **progresión**, involucra la evolución espontánea o inducida por carcinógenos de carcinomas *in situ* a carcinomas invasivos y metastásicos.

Cabe destacar que la progresión tumoral, así como la diseminación metastásica no depende sólo de las características intrínsecas de las células neoplásicas sino también de la interacción de las mismas con el microambiente tumoral y la matriz asociada (Tlsty and Coussens, 2006).

1.1.2.1 Características biológicas de las células neoplásicas seleccionadas durante la progresión tumoral

Con el uso de modelos experimentales se postuló que el desarrollo tumoral procede a través de un mecanismo de evolución darwiniana según el cual aquellos cambios genéticos y epigenéticos que confieren una ventaja en el crecimiento celular conducen a la conversión progresiva de una célula normal a una neoplásica favoreciendo el surgimiento de variantes tumorales de mayor malignidad (Nowell, 1976).

Douglas Hanahan y Robert Weinberg, en sus trabajos, identificaron las principales características biológicas que son seleccionadas en las células neoplásicas durante la carcinogénesis y que constituyen los pilares básicos de la tumorigenicidad independientemente del tipo de cáncer y subtipo tumoral (*Figura 2*). Estas características son adquiridas mediante diferentes mecanismos y facilitadas por la inflamación promovida por el

tumor y la inestabilidad genómica de dichas células (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011).

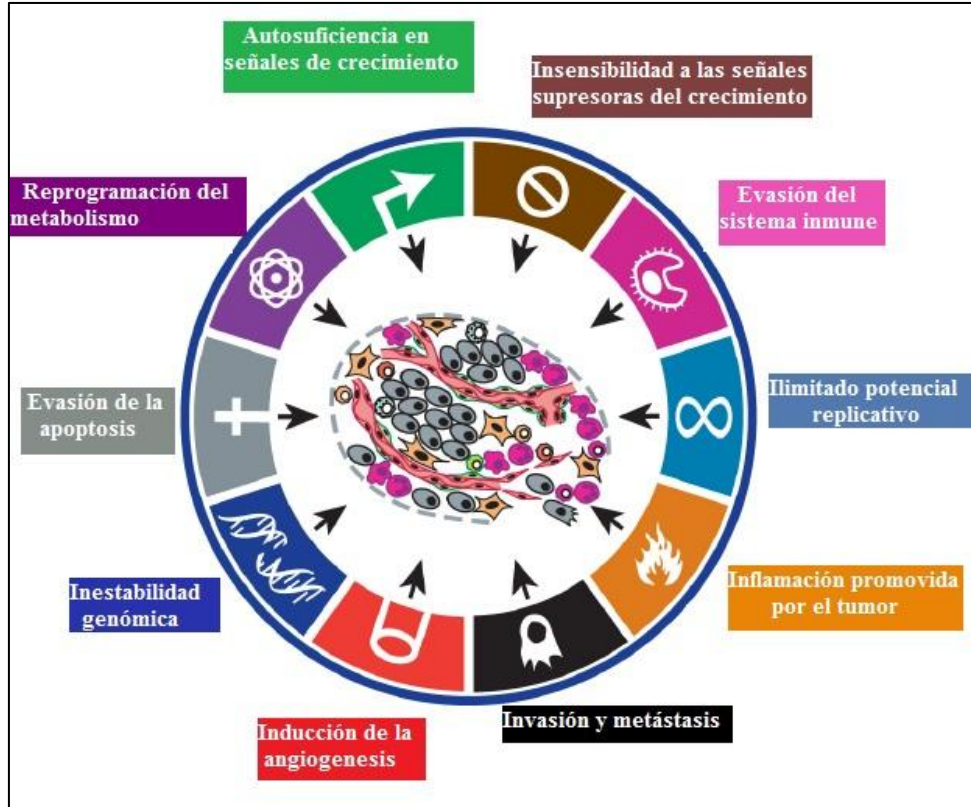


Figura 2. Características biológicas compartidas por las células neoplásicas que son seleccionadas durante la progresión tumoral. Adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011 (Hanahan and Weinberg, 2011).

Durante este proceso, las células tumorales adquieren una extraordinaria capacidad proliferativa independiente de señales mitogénicas externas. Esto lo logran sintetizando y secretando sus propios factores de crecimiento, activando constitutivamente vías de señalización relacionadas a la proliferación (ejemplo: Vía de las MAPK), sobreexpresando receptores de factores de crecimiento en la superficie celular, etc. Además este ilimitado potencial replicativo está asociado a la sobreexpresión de telomerasa (enzima que utiliza ARN como molde para replicar ADN telomérico), lo cual impide la senescencia celular por acortamiento de telómeros.

Para poder dividirse rápidamente, las células malignas disminuyen su adhesión a las células estromales o a la MEC circundantes a través de cambios en el patrón de expresión de

proteasas y de proteínas de adherencia célula-célula y célula-MEC; adquiriendo de esta forma un fenotipo semejante al de las células mesenquimáticas. Esto conduce a la invasión local y luego a la metástasis.

La célula tumoral ajusta su metabolismo durante la progresión tumoral para hacer frente a la alta demanda energética reorientando la mayor parte de su energía al ciclo celular. Por ello, debe adquirir la capacidad de inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) alrededor del tumor, para proveer de oxígeno y nutrientes al mismo. Por tanto en estas células hay un balance positivo hacia la expresión de factores pro-angiogénicos tal como el VEGF-A.

Finalmente, las células malignas desarrollan múltiples estrategias para evadir la muerte celular programa (apoptosis) y las señales supresoras del crecimiento celular. Este último fenotipo suele estar asociado a la pérdida de función de genes supresores de tumor, tales como los que codifican las proteínas RB y TP53. Además adquieren la capacidad de evadir la respuesta inmune antitumoral del huésped, generalmente mediante la expresión y/o secreción de moléculas inmunosupresoras.

1.1.2.2 Invasión y metástasis

Por metástasis se entiende a la propagación de células cancerosas desde su lugar de origen, tumor primario, a otra parte del organismo a través del sistema linfático o sanguíneo donde forman un nuevo tumor.

Las metástasis clínicamente detectables son producto de una sucesión de eventos interrelacionados a los que se conoce como **cascada metastásica**. Esta comienza cuando las células epiteliales neoplásicas abandonan el tumor y penetran en el estroma normal mediante la invasión local. Esto requiere de la adhesión y de-adhesión de las células tumorales a la MEC y a otras células como así también la degradación proteolítica de la membrana basal y el tejido conectivo.

La estructura de la MEC también puede promover la invasión. Tal es así que se ha reportado el engrosamiento y linealización de las fibras de colágeno en áreas tumorales de

invasión activa y la migración de las células tumorales a través de ellas (Condeelis and Segall, 2003).

Una vez que las células penetran el compartimento estromal deben entrar al lumen de los vasos sanguíneos y/o linfáticos mediante la **intravasación**, y lo logran mediante diferentes mecanismos; por ejemplo la expresión de Ciclooxigenasa-2 (COX-2) induce neoangiogénesis, que permite la formación de vasos muy permeables por los cuales las células tumorales entran fácilmente (Gupta, Nguyen et al., 2007).

Luego, se produce el **arresto** de las células tumorales en la microvasculatura del órgano para posteriormente penetrar en el parénquima del mismo mediante la **extravasación**. Por ejemplo las células de cáncer de mama, para penetrar en el pulmón cuya microvasculatura es de baja permeabilidad, secretan factores tales como MMP-1, MMP-2 y COX-2 (Gupta, Nguyen et al., 2007). Una vez sucedido esto, la célula tumoral debe sobrevivir en un microambiente diferente al del tumor primario formando **micrometástasis**. Estas en su mayoría pueden permanecer en estado de latencia, también conocido como **dormancia tumoral**, explicando la aparición de metástasis en pacientes, meses a años tras la extirpación del tumor. Aquellas células que logran superar dicho estado proceden a la **colonización metastásica** (Valastyan and Weinberg, 2011). Es importante destacar, que cada cáncer tiene un tropismo tisular específico (órganos o tejidos por los cuales las células tumorales son más afín) y que el tumor metastásico es del mismo tipo de cáncer que aquel que dio su origen.

Para que las células tumorales puedan desarrollar con éxito cada etapa de la cascada, adquieren características biológicas específicas, que van siendo pre-seleccionadas en el tumor primario (Nguyen, Bos et al., 2009).

1.1.2.3 Angiogénesis

La **angiogénesis** se define como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Este proceso resulta clave durante la embriogénesis y en el organismo adulto es activado en forma transitoria durante la cicatrización de heridas y el ciclo reproductivo femenino. Durante la progresión tumoral, se produce una activación constitutiva de la angiogénesis a los fines de garantizar la provisión de oxígeno y nutrientes así como la

remoción de residuos metabólicos y CO₂ (Hanahan and Weinberg, 2011). Para que las células endoteliales de vasos preexistentes den lugar a nuevos vasos es necesario que las mismas se activen en respuesta a señales angiogénicas provenientes del tumor. Esta activación consiste en la desestabilización de los vasos preexistentes por ruptura de las uniones entre estas células, la migración de las mismas hacia un gradiente de factores pro-angiogénicos, la proliferación y unión para formar túbulos provisorios (tubulogénesis), el reclutamiento de células perivasculares que favorecen la estabilidad y maduración de los nuevos túbulos y la remodelación final para generar una red vascular funcional (Weis and Cheresh, 2011).

La activación angiogénica tumoral está dada por un balance entre factores pro y anti-angiogénicos. Los factores pro y antiangiogénicos canónicos son el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) y trombospondina-1 (TSP-1), respectivamente.

1.1.2.4 Evasión del sistema inmune

El sistema inmune es capaz de reconocer y destruir células cancerosas o precancerosas antes de que puedan dar lugar a un tumor clínicamente detectable. Esta idea es conocida como la hipótesis de la **vigilancia inmunológica** (Burnet, 1957). Como consecuencia de la constante presión selectiva inmune sobre una población heterogénea de células tumorales genómicamente inestable, pueden emerger variantes celulares con la capacidad de evadir la respuesta inmune y crecer, dando lugar a un tumor clínicamente detectable. A esto último se lo conoce como escape del sistema inmune y puede ocurrir por diversos mecanismos. Uno de estos es el establecimiento de un **microambiente tumoral inmunosupresor**. La evidencia actual sostiene además que la expresión de la enzima **COX-2** en las células tumorales favorece la expansión de células inmunosupresoras tales como las células mieloides supresoras.

1.2 Cáncer de mama

Se define al cáncer de mama como un crecimiento excesivo y no coordinado con el tejido normal de las células epiteliales que conforman los lobulillos o ductos mamarios, es la neoplasia diagnosticada en mujeres con mayor frecuencia alrededor del mundo. De acuerdo a los registros de la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer, IARC, del año 2012 la

incidencia de cáncer de mama en mujeres alrededor del mundo es del 25% representando el 15% de las muertes; ubicándose por encima del de pulmón, colorrectal y útero (Ferlay, Soerjomataram et al., 2015). Esto mismo se repite para nuestro país donde según el Instituto Nacional del Cáncer, el cáncer de mama es el tumor con mayor incidencia y la primera causa de muerte por tumores en mujeres.

A pesar de los recientes avances en el tratamiento de la enfermedad, la sobrevivencia de los pacientes con cáncer de mama metastásico es de apenas 25% (Howlader et al, 2015). La comprensión de los mecanismos moleculares que favorecen la progresión tumoral constituye un paso fundamental en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que mejoren la calidad de vida de las pacientes.

1.2.1 Glándula mamaria

La glándula mamaria está formada por acinos secretores, conductos excretores y tejido conjuntivo intersticial. Los lobulillos mamarios, unidad estructural básica de la glándula mamaria, están formados por acinos secretores que se agrupan en torno a un conducto colector. Los acinos están formados por células epiteliales secretoras que son rodeadas por una capa de células mioepiteliales con propiedades contráctiles capaz de expulsar la leche. Los lobulillos mamarios se reúnen formando lóbulos, pueden distinguirse de quince a veinte lóbulos que desembocan en el pezón con un conducto excretor (*Figura 3*). Los tipos de tejidos que forman a la mama son: tejido glandular tipo túbulo-alveolar, tejido adiposo (ocupa espacios interlobulares) y tejido conjuntivo (principalmente consiste en colágeno y elastina) (Ferlay, Soerjomataram et al., 2015; Ramiao, Martins et al., 2016).

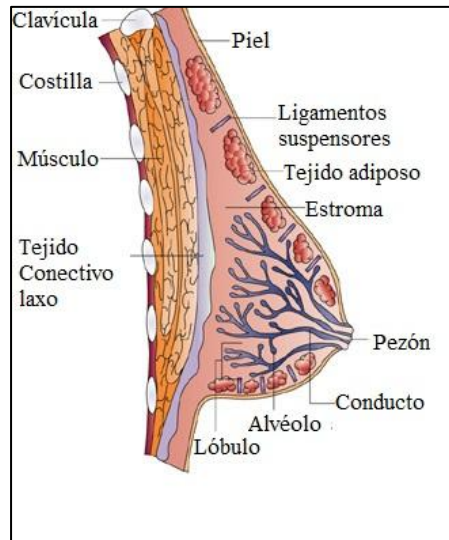


Figura 3: Anatomía de la glándula mamaria femenina. Adaptado de Ali y Coombes, 2002 (Ali and Coombes 2002).

Las mamas son glándulas de secreción presentes tanto en hombres como mujeres, pero solo en ellas exhibe cambios drásticos en su composición, arquitectura y funcionalidad a lo largo de la vida. El desarrollo de la mama es un proceso progresivo que inicia en el periodo embrionario, alcanzando el completo desarrollo y diferenciación al final del embarazo. Luego de la pubertad, la mama experimenta ciclos de crecimiento e involución regulados por ciclos menstruales, embarazo y lactancia (Russo and Russo, 2004). La involución de la glándula se hace de programas coordinados de muerte celular y remodelación estromal que resultan en una arquitectura de glándula de tipo no secretora (pre-embarazo). Hay evidencias de que la involución tiene características similares a la cicatrización de heridas y microambiente pro tumoral. Todos estos cambios tienen consecuencias en la estructura del tejido, su morfología y propiedades mecánicas (Ramiao, Martins et al., 2016).

1.2.2 Clasificación del cáncer de mama

Biológica y clínicamente, el cáncer de mama es una enfermedad heterogénea. En la actualidad se pueden clasificar los tumores mamarios en función de su histología, presencia de marcadores moleculares y el patrón de expresión génica ayudando de esta manera al diagnóstico y tratamiento de dicha patología.

En base a la histología tumoral, pueden encontrarse carcinomas *in situ* o *infiltrantes/invasivos*, como fue detallado en la sección anterior. Ambos tipos pueden clasificarse a su vez en ductales (DCIS ó IDC respectivamente) o lobulillares (LCIS ó ILC respectivamente) dependiendo de la ubicación dentro de la mama, siendo los IDC los más presentes en la población.

En el año 2000, Charles Perou junto a su grupo, con el objetivo de abordar la problemática de la heterogeneidad del cáncer de mama, analizaron por primera vez la expresión simultánea de miles de genes en 38 pacientes mediante microarreglos de ADN (Perou, Sorlie et al., 2000). Los datos recopilados permitieron agrupar los tumores de acuerdo a características biológicas intrínsecas y clasificar la enfermedad en 4 subtipos. Posteriores trabajos ampliaron la clasificación a 6 subtipos (*Tabla 1*) asociándolos a diferentes pronósticos (*Figura 4*).

Subtipo intrínseco	Frecuencia (%)	Recetores Hormonales	Grado Histológico	Genes de proliferación	Mutaciones en TP53	Pronostico
Basal	10-20	ER-PR- HER2-	Alto	Alto	Alto	Malo
HER2-enriched	15-20	ER-PR- HER2+	Alto	Alto	Alto	Malo
Normal	5-10	ER-/+ HER2-	Bajo	Bajo	Bajo	Intermedio
Luminal A	50-60	ER+ PR+ HER2-	Bajo	Bajo	Bajo	Excelente
Luminal B	10-20	ER+/- PR+/- HER2-/+	Intermedio/ Bajo	Intermedio/alt o	intermedio	Intermedio/mal o
Claudin Low	12-14	ER-PRg- HER2-	Alto	Alto	Alto	Malo

Tabla 2. Características de los subtipos intrínsecos de cáncer de mama. Adaptado de Eroles, 2011(Eroles, Bosch et al., 2012).

En general los ER+ (Luminal A y B) están asociados a un buen pronóstico y excelente supervivencia a largo plazo. Mientras que los ER- son difíciles de tratar y están asociados a un pronóstico pobre. Los HER+ son típicamente ER-, por lo que el tratamiento no incluye

terapias hormonales. Los subtipos Basal-like y Claudin-low representan aquellos de tipo triple-negativo (ER-, PR-, HER-), y se correlacionan con una mayor agresividad por parte del tumor y mal pronóstico.

El Luminal A es el subtipo más común, siendo el B un poco menos frecuente. La expresión de genes asociados a la proliferación es uno de los parámetros para diferenciar un A de un B. Dentro de los ER+, el Luminal B tiene peor pronóstico que el Luminal A. Por último, los Normal-like presentan un patrón de expresión génica similar al del epitelio normal.

HER2 es un miembro de la familia de receptores de factores de crecimiento. En el carcinoma de mama se comporta como un oncogén, a través de su sobreexpresión, la cual está asociada a un mal pronóstico, pero también predice una buena respuesta a terapias anti-HER2 (Reinvanbark, O'Connor et al., 2013).

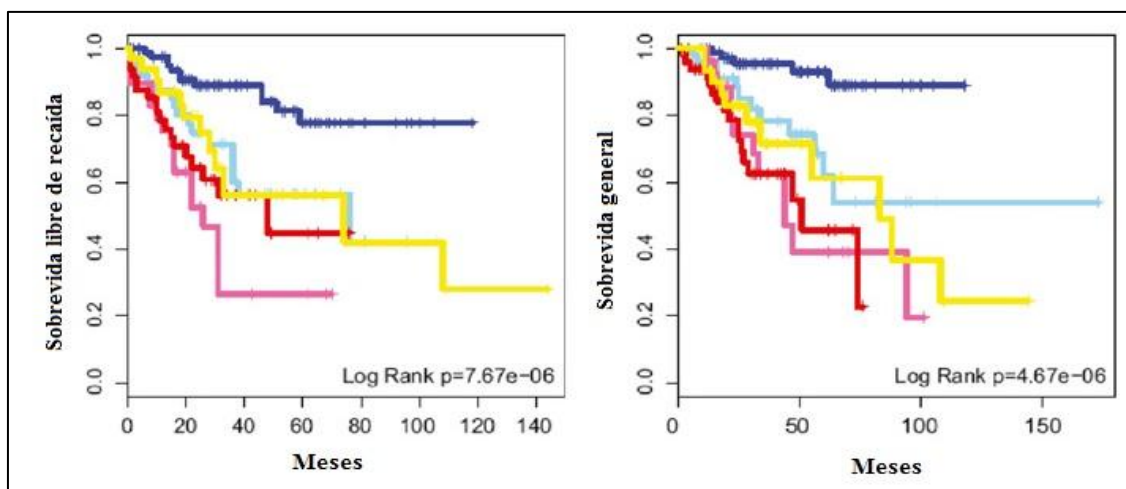


Figura 4. Curvan Kaplan-Meier de *sobrevida libre de recaída* y *sobrevida total* en los subgrupos intrínsecos de *cáncer de mama*. Rosa: HER2-enriched, rojo: basal, amarillo: claudin-low, celeste: luminal B y azul: luminal A. Adaptado Eroles, 2011 (Eroles, Bosch et al., 2012).

En los siguientes apartados se detallará más sobre la matriz extracelular que rodea a las células y su influencia en el comportamiento de las mismas como así también el rol de la remodelación de la matriz en el desarrollo y progresión del cáncer de mama.

1.3 La célula y su entorno

1.3.1 Matriz Extracelular

Las características más distintivas del cáncer, a las que se hizo referencia previamente, conducen a la pérdida de la arquitectura del tejido normal y la **matriz extracelular** (MEC) tiene un impacto en la regulación de cada uno de ellos. Por ello la MEC puede ser considerada un regulador del fenotipo celular, normal o de malignización.

Ahora bien, ¿Qué se entiende por matriz extracelular? La MEC se describe como una red organizada compuesta por diversas proteínas y polisacáridos (macromoléculas) con diferentes propiedades físicas y bioquímicas secretadas localmente por las células incluidas en ellas. La matriz provee a las células soporte estructural (adhesión celular) e información contextual (transmisión de señales) (Alberts, Johnson et al., 2008). Aunque fundamentalmente esté formada por agua, proteínas y proteoglicanos, la composición y características de la MEC varían en los distintitos tejidos, otorgando así las funciones específicas para cada uno y confiriendo las propiedades bioquímicas y mecánicas correspondientes. Las principales clases de macromoléculas que componen a la MEC son: proteoglicanos y proteínas fibrosas, entre las que predominan la elastina, la fibronectina, la laminina y el colágeno. Cabe destacar, que en un mismo tejido las fibras de colágeno suelen ser heterogéneas ya que están constituidas por mezclas de diferentes tipos, pero siempre hay un tipo que predomina. El colágeno tipo I y III junto con la fibronectina contribuyen a la fuerza mecánica del tejido así como también tienen un rol importante en la adhesión celular; mientras que los proteoglicanos, ubicados en el espacio extracelular intersticial, contribuyen a la hidratación y son sitio de unión para factores de crecimiento y citoquinas entre otros (Frantz, Stewart et al., 2010).

En particular, el tejido epitelial glandular normal como el de la *mama*, está compuesto por una capa de células epiteliales que adoptan una polaridad apical y basal siendo esta última la que entra en contacto con la membrana basal, un tipo especial de MEC. La lamina basal tiene como función principal la separación de compartimentos celulares y dar soporte por ejemplo a células epiteliales (Alberts, Johnson et al., 2008). En este tipo de tejido hay una capa de células mioepiteliales que separa el epitelio luminal de la MEC intersticial. La mayoría de ellos se encuentran en un estado de homeostasis tensional (Paszek and Weaver, 2004), lo que se correlaciona con un tipo de matriz rica en colágeno tipo I y III, elastina y

fibronectina las cuales forman un red de fibras embebidas en un hidrogel compuesto por proteoglicanos (Bosman and Stamenkovic, 2003).

La MEC no sólo presenta características especiales según el tipo de tejido o el estadio del desarrollo normal, sino que además sufre cambios temporales durante procesos patológicos, como el *cáncer*. Esto hace que la organización tridimensional y la arquitectura de la misma sean consideradas dinámicas. La topología de la matriz refleja la organización, orientación y modificaciones post-traduccionales de la misma, determinando sus propiedades mecánicas y modulando junto con la rigidez, el fenotipo del tejido y de las células que lo componen, al impactar en la remodelación del citoesqueleto, señalización, crecimiento, diferenciación y migración celular (Erler and Weaver, 2009). En este contexto, hoy en día cada vez se hace más énfasis en que los parámetros de la MEC como *topología*, *rigidez* y *composición bioquímica* son importantes y afectan a la respuesta celular y los patrones de expresión génica, pudiendo guiar los procesos de transformación maligna ó hacia un fenotipo tumoral (Erler and Weaver, 2009).

1.3.2 Mecanotransducción

La *mecanotransducción* es la respuesta de las células ante los estímulos físicos de su entorno y la conversión de ese evento mecánico a un evento bioquímico (Schedin and Keely, 2011). Una vez detectada la señal física, las células deben propagarla, amplificarla y traducirla a una respuesta ya sea temporal o sostenida que impacte en su comportamiento. Los estímulos físicos son esenciales para el desarrollo normal de un tejido ya que regulan el crecimiento celular, la supervivencia y la migración. El desarrollo correcto de un tejido no sólo depende de la aplicación de la fuerza en el momento preciso sino también de la correcta ubicación espacial, con lo cual cada tejido posee un “*fenotipo de rigidez*” específico que puede cambiar en el curso del desarrollo o en respuesta a la función. Las células responden de manera dinámica a la fuerza externa con una fuerza proporcional y recíproca, fenómeno conocido como *mecanoreciprocidad*. Esto puede influenciar el comportamiento celular, aumentando el estiramiento, crecimiento, supervivencia y motilidad de la célula (Butcher, Alliston et al., 2009).

La transducción de la rigidez de la MEC a señales intracelulares está mediada principalmente por receptores transmembrana conocidos como **integrinas**. Las integrinas son

heterodímeros que consisten en subunidades alfa y beta que mediante el dominio extracelular se unen a ligandos de la MEC mientras que con su extremo intracelular se unen al citoesqueleto de actina (Handorf, Zhou et al., 2015). Tras la unión a la MEC, las integrinas se agrupan para formar **adhesiones focales (FAs)**, proceso que implica el reclutamiento de moléculas adaptadoras tales como FAK, vinculina y talina (Figura 5). Las **adhesiones focales** son complejos macromoleculares en la cara intracelular de la interfase célula – MEC, que permiten el anclaje físico de los receptores de adhesión celular al citoesqueleto y la coordinación de la señalización por mecanotransducción. Brevemente, la talina es una proteína adaptadora citoplasmática capaz de conectar directamente las integrinas al citoesqueleto de actina. Posee características únicas como la regulación a diversos niveles, incluyendo la autoinhibición y la apertura de los sitios de unión a través de control mecánico (la longitud de su porción citoplasmática aumenta debido al estrés mecánico y esa extensión expone sitios de unión para otras proteínas). Por otro lado, FAK es una tirosina quinasa que consisten un extremo N-terminal que puede interactuar con ácidos lipídicos de la membrana plasmática, mientras que el extremo C-terminal posee sitios de unión a diversas proteínas de la cara citoplasmática. La activación de FAK es una parte integral de la mecanoseñalización, afectando localmente a este tipo de adhesiones y la motilidad celular (Hytonen and Wehrle-Haller, 2016).

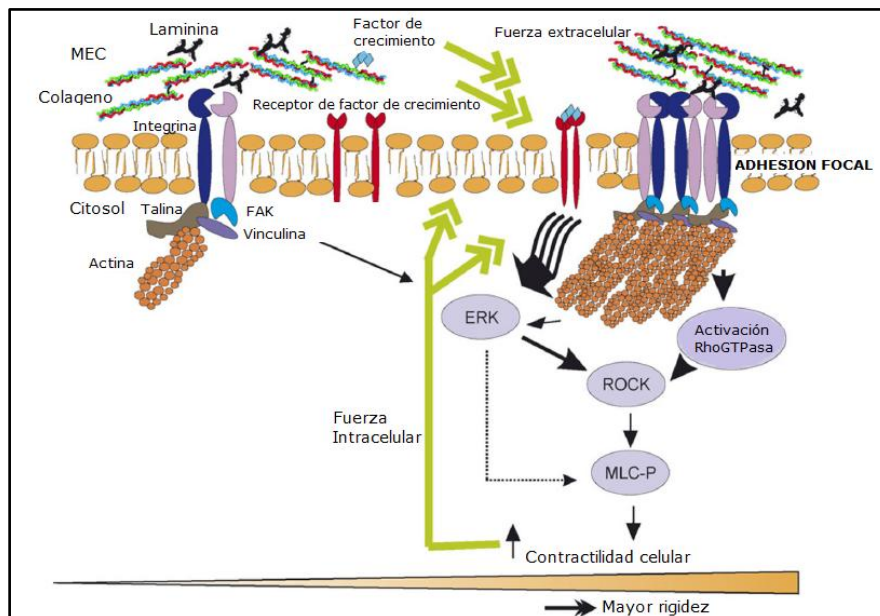


Figura 5. Ensamblado de adhesiones focales ante un estímulo físico. Adaptado de Kass et al. 2007 (Kass, Epler et al., 2007)

El armado de estas FAs perpetúa la señalización río abajo por medio de quinasas como ERK, y dependiendo del estímulo, modifica el comportamiento celular a través de cambios en la expresión génica. En el caso de los estímulos físicos, la vía de señalización de la GTPasa Rho y su quinasa efectora ROCK es la que está predominantemente asociada a la respuesta celular del epitelio mamario frente a la rigidez de la matriz (Paszek, Zahir et al., 2005). Rho puede estimular la contractilidad celular a través de la activación de ROCK, la cual puede inhibir la fosfatasa de la cadena liviana de miosina (MiosinLightChain-MLC) y activar la MLC quinasa, promoviendo su fosforilación, y logrando así la remodelación del citoesqueleto (Kumar and Weaver, 2009). Se sabe que esta GTPasa contribuye en varios pasos de la progresión del cáncer, incluyendo proliferación, evasión de apoptosis, invasión y metástasis; también puede regular y localizar espacialmente la secreción de metaloproteasas (MMPs), que promueven y facilitan la remodelación de la matriz (Kumar and Weaver, 2009).

1.3.2.1 Mecanotransducción en el contexto de la glándula mamaria normal y patológica

Bajo condiciones normales, la fisiología de cualquier tejido se mantiene en parte a través de un proceso continuo de remodelación, llamado *homeostasis*. Esto consiste en un equilibrio entre la degradación del tejido “viejo” por parte de MMPs, y la generación de tejido “nuevo”. Cuando la homeostasis del tejido normal se ve afectada, la función de este también lo está (Handorf, Zhou et al., 2015).

El tejido mamario cuenta con propiedades mecánicas que permiten clasificarlo como un tejido blando, cuya principal característica es su elasticidad intrínseca, la cual puede verse alterada bajo condiciones patológicas (Ramiao, Martins et al., 2016). Cada etapa del desarrollo de la glándula mamaria tiene un contenido de proteínas de MEC único, que regula la diferenciación, la expresión génica y responde a los requerimientos tensionales específicos para cada estadio (Schedin and Keely, 2011), y esto además se acompaña de señales hormonales y de crecimiento (Butcher, Alliston et al., 2009). Durante la ramificación en la pubertad y la involución luego del embarazo, la remodelación de la MEC ocurre mediante la expresión, inactivación ó inhibición precisa de MMPs.

En los procesos tumorales, se observa una deposición aumentada de MEC, evento conocido *desmoplasia* (Handorf, Zhou et al., 2015) junto con la reorientación de las

moléculas de colágeno de tipo I, II, III, V y IX principalmente, generando fibras más rígidas (Butcher, Alliston et al., 2009). Esta distribución adquirida durante la progresión tumoral se denomina *anisotropía* (Schedin and Keely, 2011). Se ha demostrado que si la MEC que rodea a las células mamarias es rígida y estas células responden con resistencia, las fuerzas generadas resultan en tensión a través de receptores de adhesión y complejos focales, y provee una tracción tal que la célula es capaz de estirarse y proliferar, o migrar (*Figura 6*).

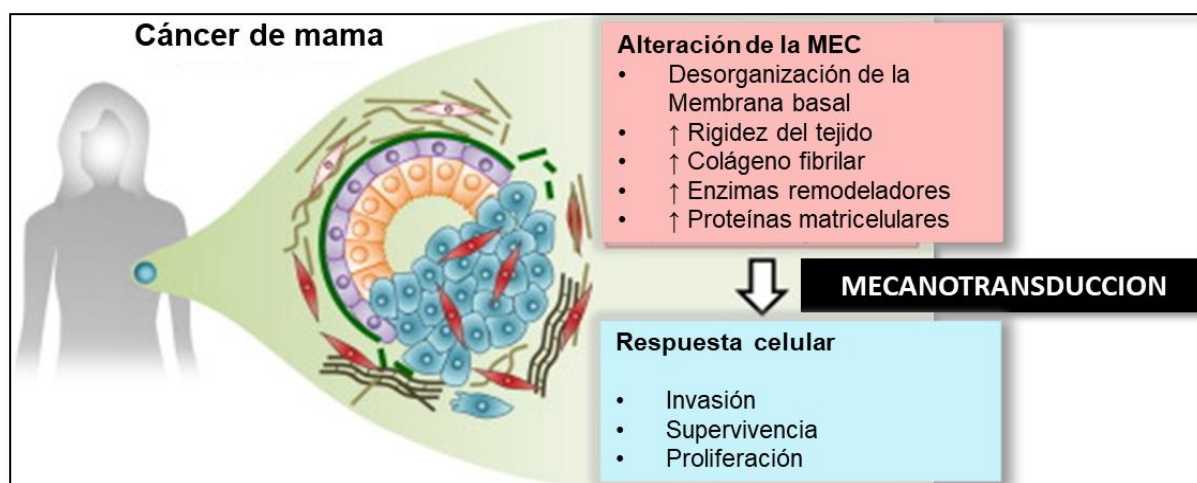


Figura 6. Cambios en la MEC durante la progresión del cáncer de mama. La progresión del cancer de mama se acompaña de una remodelación de la MEC que tiene un impacto sobre el compoartamiento celular mediante eventos de mecanotransducción. Adaptado de Insua-Rodriguez & Oskarsson, 2015 (Insua-Rodriguez & Oskarsson, 2015).

Esto es posible ya que en esas condiciones hay una mayor proporción de FAK fosforilado, lo que fosforila a ERK, activándolo y haciéndolo capaz de translocarse al núcleo, en donde regula la actividad de factores de transcripción como los responsables de la entrada al ciclo celular (Provenzano, Inman et al., 2009). En contraste, las células mamarias en sustratos blandos muestran un crecimiento controlado, arquitectura organizada y expresión de proteínas consistentes con un fenotipo más diferenciado, además de la disminución de la vía de Rho-GTPasa (Schedin and Keely, 2011)(*Figura 7*). Tal es así que una mayor densidad mamaria representa un factor de riesgo para cáncer de mama ya que aumenta la probabilidad de 4 a 6 veces de desarrollarlo (Provenzano, Inman et al., 2009).

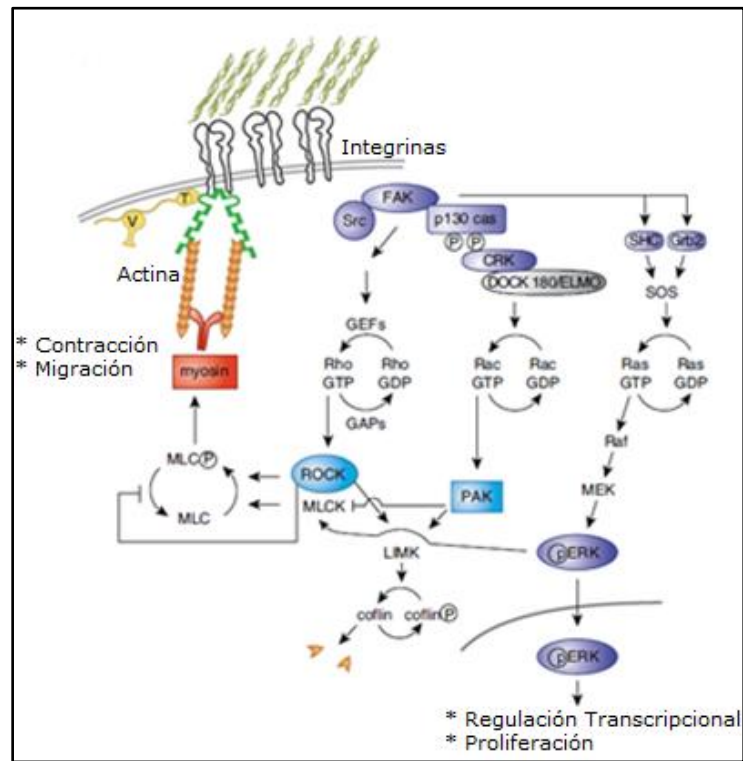


Figura 7. Diagrama de vías de señalización relacionadas a la contractilidad celular en glándula mamaria. Adaptado de Schedin y Keely 2011 (Schedin and Keely, 2011)

En este contexto la mecanoreciprocity de las células transformadas está comprometida. Este proceso puede inducir angiogénesis, ya sea de forma directa por un aumento en la expresión de VEGF o de forma indirecta a través del bloqueo de la vasculatura existente alrededor del tumor para promover hipoxia y así la secreción de VEGF. También puede contraer el espacio intersticial que rodea a las estructuras ductales en la mama por ejemplo, y aumentar la concentración local de factores de crecimiento y citoquinas para facilitar la señalización autocrina y paracrina y promover el crecimiento del tumor (Butcher, Alliston et al., 2009).

La metástasis se ve facilitada por cambios en la arquitectura de las células, inducidos como respuesta a los cambios en la MEC. Recordemos que para que una célula metastatise, debe primero degradar la membrana basal y migrar al estroma circundante. Para ello las MMPs degradan la MEC y al hacerlo liberan los factores de crecimiento concentrados allí, que pueden desencadenar mayor invasión epitelial. La expresión inapropiada de MMP-3 por ejemplo, puede llevar a la transición epitelio mesenquimal, inestabilidad genómica, inducción de un estroma fibrótico y la progresión tumoral (Nelson and Bissell, 2006). Durante esta

invasión, las células extienden pseudópodos que se adhieren a las fibras de colágeno de la MEC y se arrastran linealmente hacia los vasos sanguíneos (Kass et al, 2007). Las alteraciones en la estructura de una célula tumoral durante la separación del tejido y la invasión están acompañadas de cambios recíprocos en la organización, propiedades materiales y composición de la MEC. Además y apoyando esto, se ha correlacionado al aumento en la expresión y actividad de la lisil oxidasa (LOX), responsable del reordenamiento de las fibras de colágeno, con metástasis y mal pronóstico en pacientes con cáncer (Handorf, Zhou et al., 2015).

1.3.2.2 Métodos para el estudio de mecanotransducción

Para una mejor comprensión del tema a abordar es necesario aclarar ciertos conceptos técnicos que serán de suma importancia. La **rigidez** de un material se define como el grado en el que un material resiste la deformación en respuesta a la aplicación de una fuerza. El **estrés mecánico** es la fuerza aplicada por unidad de área a un objeto (unidad: fuerza/área, N/m² o Pa) y la **tensión** es la deformación de ese objeto normalizada a su tamaño inicial (es un parámetro adimensional). El **Módulo de Young**, también conocido como **módulo elástico o elasticidad (E)** es una medida de la deformabilidad del material y se define mediante la siguiente ecuación:

$$E = \frac{\text{Estrés}}{\text{Tensión}}$$

Por lo tanto, se desprende que el módulo elástico es directamente proporcional a la rigidez del material. Como la tensión es un parámetro adimensional, el Módulo de Young tiene las mismas unidades que el estrés mecánico (Pa). Al medir las propiedades mecánicas de los materiales, es crítico registrar tanto las propiedades elásticas (o de almacenamiento) como las propiedades viscosas (o de pérdida) (Janmey, Georges et al., 2007; Kumar and Weaver, 2009).

La influencia de la rigidez del espacio extracelular en el comportamiento celular es un tema ampliamente estudiado (Butcher, Alliston et al., 2009; Handorf, Zhou et al., 2015). Diversos autores han explorado diferentes herramientas para variar la rigidez del sustrato e imitar así las condiciones patológicas presentes en un tumor, con el objetivo de entender los

mecanismos subyacentes. Cabe destacar que el cultivo en monocapa sobre placa de poliestireno, si bien es una de las técnicas más comunes de cultivo celular, no ofrece condiciones de crecimiento semejantes a las fisiológicas (*in vivo*). El módulo de Young de las células de la mayoría de los tejidos difiere en varios órdenes de magnitud al de los materiales en los que se suele cultivar células *in vitro*, para los cuales se reporta un módulo de Young mayor a 1 GPa (Wakatsuki, Kolodney et al., 2000; Bao and Suresh, 2003) (Figura 8).

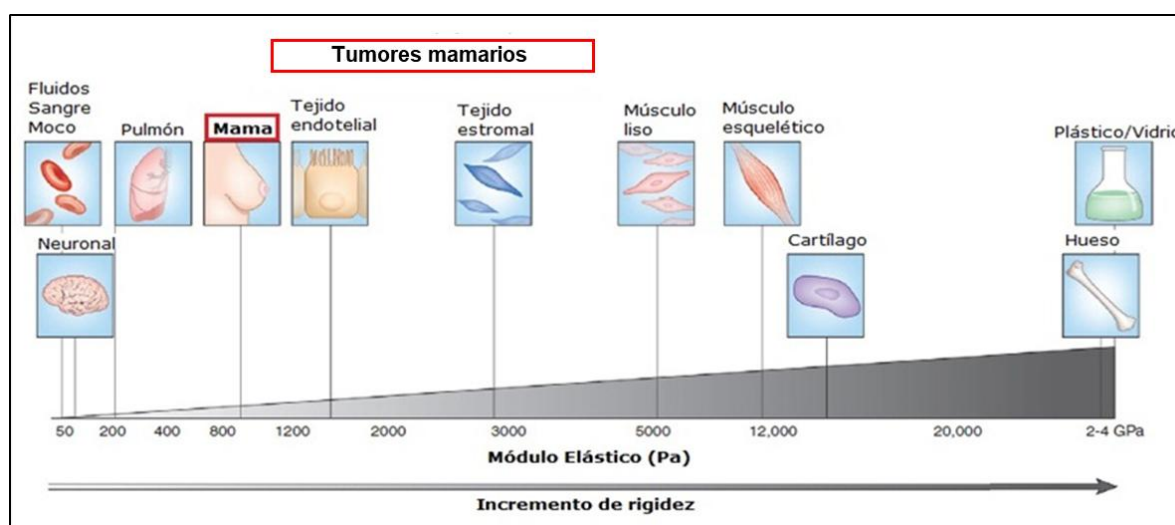


Figura 8. Rigidez de diferentes órganos y tejidos del cuerpo humano. Cada tejido tiene propiedades biomecánicas diferentes que se correlacionan con sus funciones biológicas. Como se puede observar, la mama en condiciones normales tiene un Módulo de Young muy por debajo del módulo correspondiente al plástico o vidrio, materiales de amplio uso en el laboratorio. Esto último también sucede en los tumores mamarios, aunque cuentan con valores de rigidez mayores. Definitivamente, la exposición a este tipo de Modulo de Young influye en el comportamiento de las células *in vitro*. Adaptado de Cox & Erler, 2011 (Cox and Erler, 2011).

Como método de estudio del comportamiento celular que resulta de las señales externas que recibe una célula, Brandley y colaboradores propusieron en el año 1987 el uso de “análogos de superficie celular” y en este contexto desarrollaron geles de poliacrilamida funcionalizados con glicoproteínas o glicolípidos, entre otras, para estudiar cómo afectan la adhesión y el crecimiento de una línea celular de fibroblastos de ratón BALB/3T3 (Brandley, Weisz et al., 1987). Años más tarde, en 1998 Wang y Pelham sugieren que los geles de poliacrilamida desarrollados por Brandley y col. constituyen una herramienta que no había sido totalmente explotada, modificaron dicho protocolo original al incorporar el uso de cubreobjetos de vidrio y su activación para permitir la adhesión segura de los geles y una

manipulación más versátil para cualquier estudio posterior. Además funcionalizaron dichos vidrios con colágeno tipo I y describieron métodos de caracterización para los mismos (Wang and Pelham, 1998).

Estos geles de poliacrilamida, también denominados hidrogeles, tienen una gran cantidad de ventajas, entre las cuales destacan sus propiedades mecánicas ideales (se deforman en proporción a las fuerzas que se le aplican pero se recuperan completamente al dejar de aplicarlas); permiten un control sistemático y reproducible de la flexibilidad del sustrato, tan sólo con cambiar la concentración relativa de acrilamida y bisacrilamida; al ser transparentes permiten realizar tinciones de fluorescencia y observación a campo claro, y al ser químicamente inertes en relación a la superficie celular basta con agregar una proteína de la matriz extracelular que actúe como ligando para la adhesión de la célula. Por último, la naturaleza porosa de estos geles permite la penetración de medio y provee un entorno más fisiológico para el cultivo de células, particularmente para células epiteliales (Wang and Pelham, 1998).

En el año 2003, Reinhart-King y colaboradores toman este protocolo en combinación con microscopía de tracción (TFM). Para ello incorporan microesferas fluorescentes en el entramado de los hidrogeles y así logran visualizar las deformaciones que sufre la matriz de cultivo ante la fuerza ejercida por las células (Reinhart-King, Dembo et al., 2003).

A partir de entonces, muchos autores adoptaron este enfoque de hidrogeles con el objetivo de desentrañar los mecanismos moleculares que asocian un estímulo mecánico del entorno con los cambios resultantes en el comportamiento celular y su relación con la iniciación, crecimiento y progresión tumoral (Yeung, Georges et al., 2004; Paszek, Zahir et al., 2005; Klein, Yung et al., 2007; Klein, Yin et al., 2009).

En este modelo de hidrogeles, el módulo de elasticidad puede ser ajustado de manera cuantitativa y reproducible, variando las concentraciones de acrilamida y bisacrilamida. Sin embargo, se debe tener en cuenta que para formulaciones con la misma cantidad de polímero total, el módulo elástico aumenta con el aumento de la concentración de entrecruzador hasta alcanzar un punto de inflexión, luego del cual el módulo empieza a decrecer (los geles se vuelven más blandos) por más de que se siga agregando entrecruzador (Denisin and Pruitt, 2016).

En paralelo surgieron otras formas de estudiar la influencia del microambiente, pasando del cultivo en monocapa a cultivos tridimensionales, que se asemejan más a las circunstancias que se presentan *in vivo*. En 2009, Provenzano y su equipo implementaron cultivos 3D de diferentes líneas celulares del epitelio mamario (línea MCF10A) con baja y alta densidad de colágeno lo cual hace que la matriz sea más blanda o más rígida. Hallaron que en aquellos cultivos de mayor densidad de colágeno, la proliferación e invasión estaban aumentadas y se asociaban con un fenotipo maligno, mayor cantidad y tamaño de adhesiones focales y mayor expresión de FAK fosforilado, ERK fosforilado y Rho. Asimismo, determinaron que la inhibición de la fosforilación de ERK revierte la expresión diferencial observada en genes de proliferación, obteniendo un patrón semejante al de baja densidad de colágeno. Resultados similares se obtuvieron creciendo a las células sobre geles de poliacrilamida cubiertos con la misma concentración de colágeno. Finalmente, evaluaron la respuesta *in vivo* haciendo xenografts en ratones nude, tras lo que observaron que las células crecidas en alta densidad de colágeno generaban tumores de mayor tamaño, confirmando así la relación con una mayor proliferación.

Otra forma de estudiar la rigidez del tejido y su influencia en las células que lo componen, es trabajando directamente sobre el tejido, tal como hicieron la Dra. Acerbi y colaboradores con muestras de tejido mamario humano obtenidas de mastectomías, en un trabajo publicado en el año 2015 (Acerbi, Cassereau et al., 2015). Mediante microscopía de fuerza atómica encontraron que la transformación maligna no sólo está acompañada de una deposición y remodelación progresiva de colágeno de tipo I hacia fibras más gruesas y dispuestas de manera lineal, sino también de un aumento en la rigidez de la MEC en el frente invasivo de la lesión. También observaron que los subtipos más agresivos (Basal-like y Her2) fueron los más rígidos y heterogéneos en comparación con los subtipos menos agresivos (Luminal A y B). En resumen, demuestran una asociación positiva entre la progresión y agresividad del tumor de mama, la linearización del colágeno y las características mecánicas.

Existen diferentes enfoques para el estudio de la rigidez de matriz, que se complementan con mediciones tanto *in vitro* como *in vivo*, para acompañar los efectos observados con parámetros físicos. Sin embargo, trabajos recopilatorios como el realizado por Ramiao y colaboradores en el año 2016 muestran que todavía no se ha logrado un consenso respecto a los valores de la rigidez (Ramiao, Martins et al., 2016). Brevemente en la *Tabla 2*

se encuentra resumida la información disponible acerca de qué valores de Módulo de Young representan un tejido normal versus un tejido tumoral en ensayos de tipo *ex vivo* e *in vivo*. A priori se puede concluir que la medición varía mucho dependiendo del tipo de ensayo, por el método utilizado. El método *in vivo* más extendido es la elastografía. Las distintas técnicas de elastografía se basan en la hipótesis de que los tejidos blandos se deforman más que los tejidos rígidos, y esto puede ser cuantificado y diferenciado mediante imágenes (Aroca et al, 2012).

Autor	Tipo de ensayo	Stiffness normal (kPa)	Stiffness tumoral (kPa)
Samani et al 2007	Ex vivo	3,25 (G)	16,38 (IS) / 42,5 (IN alto grado)
Sarvazyan et al 1994	Ex vivo	2	15 (IN)
Krouskop et al 1998	Ex vivo (5% compresión previa a la carga)	20 (TA) / 31,5 (G)	24 (IS)/109 (IN)
Krouskop et al 1998	Ex vivo (20% compresión previa a la carga)	22 (TA) / 57 (G)	299 (IS) / 509 (IN)
Matsumura et al 2009	Ex vivo (0-0.2 stress)	0,7 (TA) / 0,8 (G)	3,4 (IS) / 11,5 (IN)
Matsumura et al 2009	Ex vivo (1.0-1.2 stress)	17,3 (TA) / 15,4 (G)	15,6 (IS) / 27 (IN)
Umemoto et al 2014	Ex vivo (0-0.2 stress)	0,69 (TA) / 0,73 (G)	5,25 (IS) / 13,82 (IN)
Umemoto et al 2014	Ex vivo (1.0-1.2 stress)	19,08 (TA) / 16,99 (G)	16,15 (IS) / 30,5 (IN)
Kruse et al 2000	In vivo	20 (TA) / 37,5 (G)	62,5
Sinkus et al 2000	In vivo	0,75 (TA) / 2,25 (G)	3,75
McKnight et al 2002	In vivo	3,3 (TA) / 7,5 (G)	25
Cheng et al 2013	In vivo	0,41 (TA) / 0,90 (G)	1,42
Xydeas et al 2005	In vivo	1,2	3,1
Srivastava et al 2011	In vivo	4,17 (TA)	16,45 (DI)

Tabla 3. Comparación de valores de módulo de Young reportados en diferentes trabajos, tanto para tejido normal como para tejido tumoral. Las variaciones principalmente se deben a la técnica elegida para medirlo, como así también si se toma glándula (G) o tejido adiposo (TA) como tejido normal y carcinoma ductal in situ (IS) o carcinoma ductal invasor (IN) como tejido tumoral (Ramiao, Martins et al., 2016).

Por otro lado, tanto *ex vivo* como *in vitro* un método muy utilizado es la microscopía de fuerza atómica (AFM). En esta técnica se mide la fuerza de interacción (atracción – repulsión) entre la superficie de una muestra y una sonda nanométrica (“tip”) unida a un cantiléver flexible. El encuentro entre el tip y la muestra genera una fuerza que mueve al cantiléver y esto es detectado por la reflexión de un láser que ilumina la punta del sensor (Figura 9). De este modo se obtiene un dato óptico que puede ser convertido en una medida de la fuerza de interacción si se conoce la constante del cantiléver. Se puede obtener dos tipos de información a partir de la interacción tip - muestra: imágenes topográficas y medidas de fuerza. En las primeras se escanea la superficie de la muestra con una fuerza constante, y los movimientos que tiene que hacer el cantiléver necesario para mantener esa fuerza constante a medida que cambia la topografía de la muestra, pueden ser utilizados para reconstruir un

mapa de esa superficie. En la segunda la muestra es indentada verticalmente por el tip en una posición fija y la resistencia de la muestra a la deformación puede ser analizada para extraer el dato de las propiedades viscoelásticas del material (Kumar and Weaver, 2009).

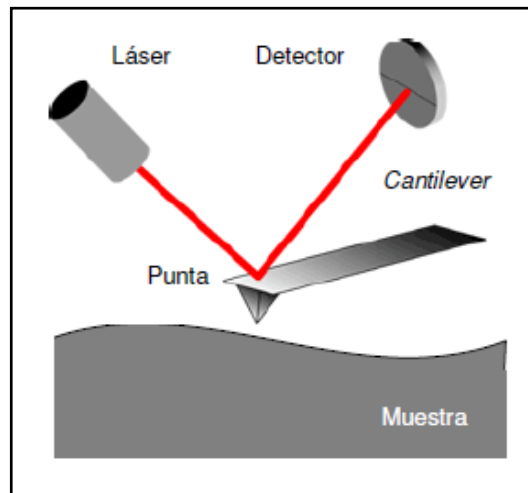


Figura 9. Diagrama del sistema de detección del AFM (Bianchi, M., 2016).

Los resultados de las mediciones varían si el tejido normal de referencia es glándula o tejido adiposo y a su vez si el tejido tumoral es *in situ* o invasor, ya que el primero es más blando que el segundo. Esto es totalmente lógico si planteamos que la rigidez del entorno hace que el tumor sea más agresivo. Todo esto sin tener en cuenta la variabilidad entre individuos. Para las mediciones *ex vivo* hay una amplia variedad de técnicas e instrumentos y la variabilidad también depende de la carga previa y de cómo se pre-acondiciona a la muestra. Por ello, al no tener valores confiables o reproducibles de ensayos *in vivo*, es complejo determinar qué valores de módulos de Young se buscan obtener en ensayos *in vitro*, como con el uso de hidrogeles, de modo tal que realmente se imiten las condiciones fisiológicas normales y/o tumorales. De todas maneras, algo en lo que sí coinciden la mayoría de los autores es que el tumor de tipo invasor puede ser hasta **10 veces más rígido que el tejido normal** (Ramiao, Martins et al., 2016).

1.4 La enzima Ciclooxygenasa

La enzima ciclooxygenasa (COX) cataliza la conversión del ácido araquidónico (AA) en prostanoideos, una familia de mediadores lipídicos con una amplia variedad de funciones biológicas que incluyen a las prostaglandinas (PG) y tromboxano A2 (Smyth, Grosser et al.,

2009). Existen dos isoformas de la enzima, mientras que COX-1 (PTGS1) tiene expresión constitutiva, COX-2 (PTGS2) se encuentra ausente en la mayoría de los tejidos y sobre-expresada en sitios de inflamación y/o durante la progresión tumoral (Smyth, Grosser et al., 2009; Wang and Dubois, 2010). La síntesis comienza con la liberación del AA desde fosfolípidos de membrana por acción de la fosfolipasa A₂ citosólica, luego COX-1/COX-2 convierte el AA en PGG₂ y luego la reduce a PGH₂; esta última puede ser metabolizada a otras prostaglandinas y a tromboxano A₂. Ambas isoformas comparten un 60% de su secuencia de aminoácidos y a nivel estructural cuentan con un dominio de factor de crecimiento epidermal N-terminal, un motivo de unión a membrana y un dominio catalítico C-terminal (Hinz and Brune, 2002) (*Figura 10*).

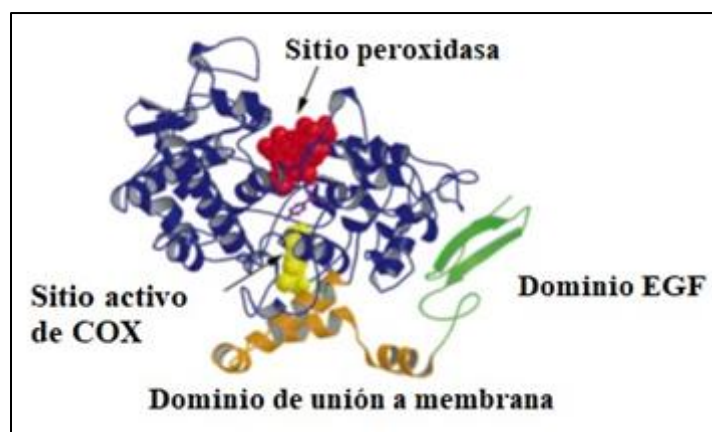


Figura 10. Representación gráfica por cristalografía de la estructura de ciclooxigenasa. En este caso la cristalografía corresponde a COX-1 ovina pero por su similitud con su isoforma *cox-2* en lo referente a sus dominios permite utilizarla para ejemplificar la estructura tridimensional de dicha proteína. Adaptada de Garavito & De witt, 1999 (Garavito and De witt, 1999).

En el presente trabajo de investigación se centra el interés en la isoforma **COX-2** ya que esta es quien cuenta con un rol crucial en carcinogénesis. Las primeras correlaciones entre COX-2 y la carcinogénesis surgieron de estudios donde se mostraba que la aspirina y otros antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) eran eficaces en la inhibición del desarrollo de distintos tipos de cáncer, entre los que se destacan el cáncer de mama, pulmón, próstata y colon (Harris, 2009).

1.4.1 Rol de COX-2 en cáncer de mama

Una gran proporción de tumores de mama de pacientes, hasta el 84% en algunos estudios, sobre-expresan COX-2 y su expresión se asocia a un alto grado de indiferenciación

histológica, alto riesgo de metástasis y menor supervivencia (Ristimaki et al., 2002). La expresión de esta enzima es una característica propia del epitelio maligno mientras que los niveles de expresión de la isoforma COX-1 no presentan variación en las células tumorales versus las normales (Soslow, Dannenberg et al., 2000). Al mismo tiempo, estudios clínicos han demostrado que existe un menor riesgo de cáncer de mama, pulmón, próstata y colon luego del tratamiento tanto con inhibidores inespecíficos de COX-2 (NSAIDs) como con inhibidores específicos (Harris et al., 2009).

Por otra parte, Minn y colaboradores han identificado a COX-2 como parte de un grupo de genes que median la metástasis de cáncer de mama a pulmón (Minn and al., 2005). En otro trabajo, se demostró que el gen COX-2 junto a otros genes sobre-expresados en tumores primarios de cáncer de mama, confiere a las células tumorales circulantes la capacidad de extravasar al parénquima pulmonar (Gupta, Nguyen et al., 2007). Se ha observado también, que la interacción de células tumorales derivadas de carcinoma ductal *in situ* con fibroblastos tanto *in vivo* como *in vitro* induce la expresión de COX-2 en las células epiteliales que lleva a la expresión de MMP14, VEGF y MMP-9 contribuyendo así a un mayor peso de los tumores y a un fenotipo más invasivo (Hu et al., 2009). Estos hallazgos han llevado a proponer a COX-2 como un gen de progresión metastásica en cáncer de mama, ya que favorece el crecimiento del tumor primario mediante un efecto particular mientras que aumenta las metástasis distantes por otro efecto diferente (Nguyen, Bos et al., 2009).

Otras evidencias indican que particularmente en cáncer de mama, la delección del receptor EP2 suprime significativamente la hiperplasia mamaria inducida por COX-2 en ratón (Chang et al., 2005), y el uso de antagonistas de EP1 inhibe el desarrollo de cáncer de mama en un modelo de carcinogénesis química en rata (Kawamori et al., 2001). Asimismo, los altos niveles de COX-2 reportados para DCIS identifica al eje COX/PGE₂ como un target para prevenir la progresión de DCIS a un carcinoma invasivo. En cáncer de mama, por el alto porcentaje de tumores dependientes de hormonas, cobra relevancia el rol de las PG en aumentar, mediante la sobre-expresión de aromatasa, la biosíntesis de estrógenos que promueven la proliferación celular (Howe et al., 2007).

En cuanto al rol de PGE₂ en angiogénesis, la PGE₂ secretada por células de cáncer de mama promueve angiogénesis *in vivo* e *in vitro* por inducción de factores pro-angiogénicos

mediante la vía PKA-cAMP (Chang et al., 2004). En segundo lugar, las PG señalizan sobre las células estromales para promover angiogénesis. A modo de ejemplo, en un modelo murino de cáncer de mama se determinó que el eje endógeno PGE2-EP2 es necesario para promover angiogénesis tumoral mediante el aumento de la movilidad de células endoteliales y la hiperpermeabilización vascular (Kang, Mbonye et al., 2007). También es importante destacar que al igual que en otros tipos de cáncer, COX-2 tiene un rol importante en la inmunosupresión y evasión del sistema inmune al impactar sobre la respuesta inmune adaptativa e innata. En este sentido, inhibe directamente la proliferación y activación de células T, así como la función citotóxica, la presentación antigénica en células dendríticas, promueve la diferenciación de macrófagos a un perfil M2 y la inducción y activación de células T regulatorias (Treg) con propiedades inmunosupresoras (Chen and Smyth 2011; Obermajer et al., 2012).

Por todo lo mencionado en los párrafos anteriores, se puede concluir que COX-2 podría ser considerado un *oncogén* ya que promueve la formación de tumores mamarios por diferentes mecanismos entre los que se incluyen: inducción de angiogénesis, inhibición de muerte celular por apoptosis y demás características pro-tumorigénicas asociadas a los prostanoïdes producidos por COX-2. La importancia de las vías inducidas por la sobreexpresión de esta enzima, lo ubica como un buen target terapéutico ya que el bloqueo o inhibición de la misma permitiría disminuir la carcinogénesis y/o el desarrollo y establecimiento de metástasis. En este contexto, es necesario comprender como se regula la expresión de COX-2 a partir de los estímulos físicos particulares a los que están sometidas las células del tejido mamario y que eventos podrían estar asociados con la malignización de ese tejido.

1.4.2. Regulación de la expresión de COX-2 y funciones biológicas en la progresión tumoral.

El control de la expresión de COX-2 es importante ya que la pérdida de su regulación es un evento temprano en la génesis de algunos tipos de cáncer como por ejemplo el cáncer de mama (Dixon et al, 2004).

El producto de la reacción catalizada por COX-2 es la Prostaglandina E2 (PGE2) y sus efectos pro-tumorales han sido ampliamente demostrados en la literatura. Las PGs actúan de manera autócrina o parácrina la interactuar con receptores unidos a proteínas G. En particular

PGE₂, actúa a través de los receptores EP1, EP2, EP3 y EP4, aunque en ciertos casos es capaz de unirse a receptores nucleares como PPAR δ (Wang and Dubois, 2010). Específicamente promueve la iniciación, progresión y metástasis mediante mecanismos que incluyen aumento de la proliferación, angiogénesis e invasión, disminución de la apoptosis e inducción de inmunosupresión (Wang and Dubois, 2006) (*Figura 11*). Por tanto, PGE₂ afecta tanto a la célula tumoral en sí misma como al microambiente tumoral haciéndolo más afín a la progresión y metástasis. De esta manera, la PGE₂ contribuye al establecimiento de los hallmarks del cáncer (Greenhough, Smartt et al., 2009).

Ahora bien, ¿Cómo están regulados los niveles de COX-2 en la célula? El gen que codifica para COX-2 está regulado tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional, incluyendo a la estabilidad de ARNm, por características de la región 3-UTR (Harper and Tyson-Capper, 2008). La expresión de COX-2 se induce por oncogenes y diferentes señales extracelulares que incluyen estímulos pro-inflamatorios y factores de crecimiento que convergen en la activación de la vía de las MAPK, las cuales activan moléculas de señalización, entre las que se encuentran factores de transcripción (Tsatsanis, Androulidaki et al., 2006). En este sentido, el promotor de COX-2 es controlado por la actividad de varios de ellos entre los que se destacan, CRE, NF- κ B, NF-IL6, AP-1, AP-2, Sp-1, C/EPB β y TCF/LEF (Nunez, Bravo et al., 2011) (*Figura 12*). Así también, diferentes trabajos han reportado el control de expresión de COX-2 por remodelación de la cromatina como la impartida por cambios en la metilación en las islas CpG (Song, Jong et al., 2001).

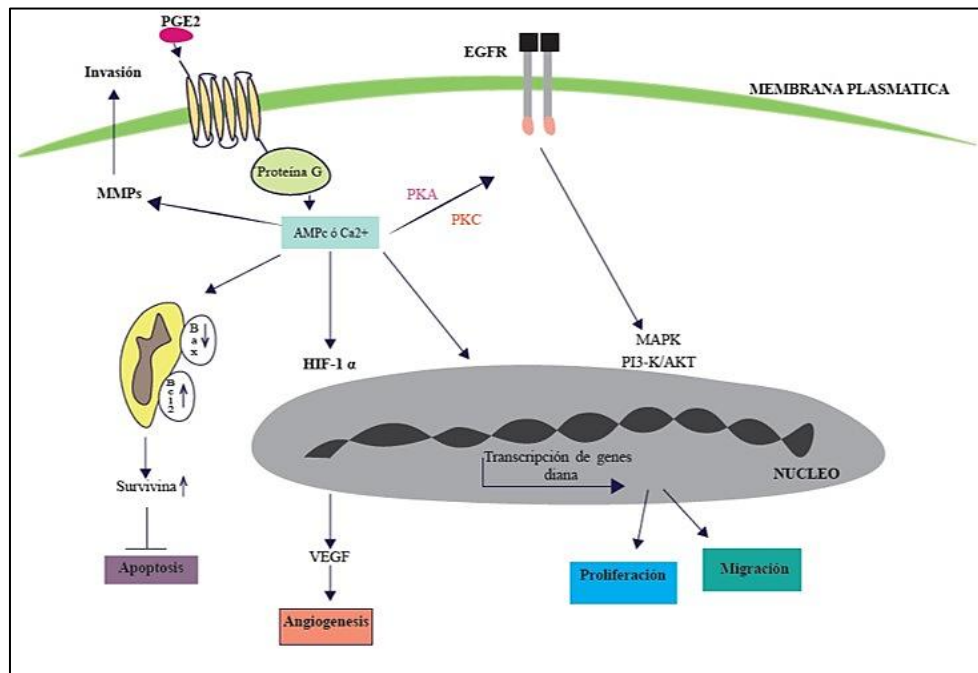


Figura 11. *Diferentes mecanismos a través de los cuáles las PGs derivadas de COX-2 esta implicadas en la carcinogénesis. Adaptado de Zarghiet.al., 2011(Zarghi and Arfaei 2011).*

A nivel transcripcional, también es regulada por cambios en la rigidez de la matriz. Estos hallazgos provienen del estudio del rol de COX-2 en los desórdenes de obstrucción intestinal. En ese modelo, Shi y col. demostraron que la presión ejercida por la obstrucción intestinal promueve la expresión de COX-2 en las células del músculo liso del intestino (Shi et al., 2011). Más tarde, se demostró que el estrés mecánico induce la expresión de COX-2 a través de integrinas y una vía de transducción de señales que involucra a MAPKs, ERKs, p38 y JNKs (Li et al., 2012). Sin embargo, no existe hasta el momento ninguna evidencia de este tipo de regulación en cáncer de mama, contexto patológico en el cual la alteración en la rigidez de la matriz, explicado en el apartado anterior, tiene un rol fundamental.

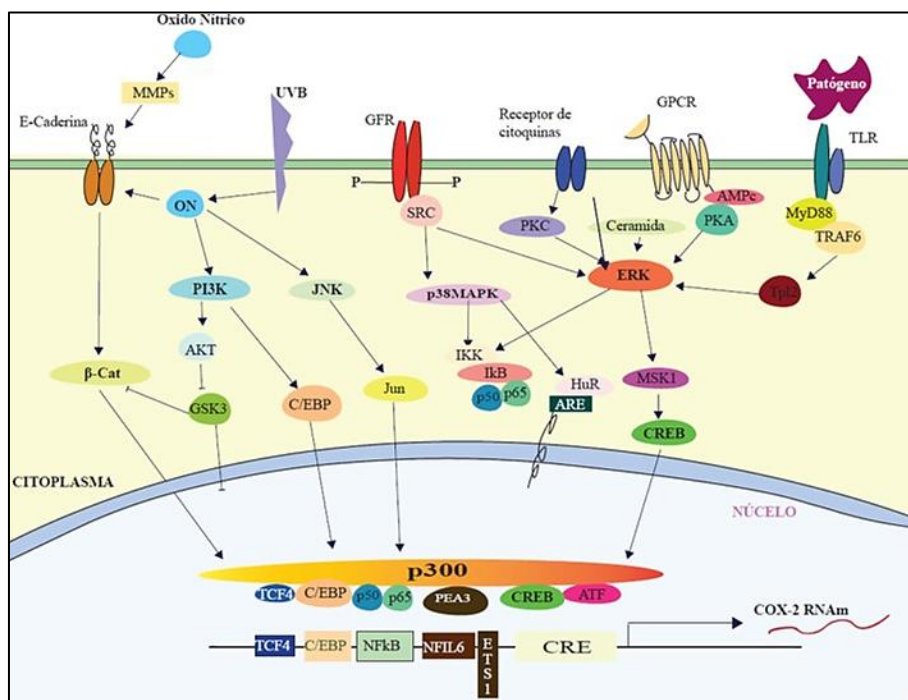


Figura 12. Vías de señalización implicadas en la regulación de la expresión de COX-2. Adaptado de Tsatsanis, 2006. (Tsatsanis, Androulidaki et al., 2006)

1.5 Modelo biológico utilizado: cultivos celulares

Los **cultivos celulares** son células que han sido removidas de un animal (o vegetal) para luego ser crecidas en un medio favorable artificial. En este pueden crecer en suspensión o adheridas a una superficie. Estos cultivos pueden derivar de explantes primarios o de una suspensión de células dispersas. La formación de una línea celular a partir de un cultivo primario implica un aumento en el número total de células a través de varias generaciones, lo cual es posible gracias a la proliferación de las células. Esta línea celular puede sufrir cambios genéticos o una transformación que deriva en una línea continua o establecida. La misma se caracteriza por un aumento en la tasa de proliferación y una mayor eficiencia de plaqueo (Freshney, 2005).

Una de las principales razones por las cuales se utiliza este modelo biológico es debido a la posibilidad de controlar el ambiente fisicoquímico (pH, temperatura, presión osmótica, tensión de O₂ y de CO₂) y las condiciones fisiológicas. Otra ventaja que tienen los cultivos celulares es que hay diversas pruebas que permiten identificar cada línea celular y así validar

la misma para asegurarse que estén libres de contaminaciones cruzadas. Además, un cultivo requiere menos reactivos que los utilizados en experimentos *in vivo*, donde el 90% se pierde por excreción y distribución a otros tejidos que no se encuentran en estudio. Asimismo, los cultivos pueden exponerse directamente a los reactivos logrando así acceso directo a la célula. De esta manera, los ensayos tienen un menor costo en cuanto a la cantidad de reactivos necesarios. Otra ventaja del trabajo con células *in vitro* es que se evitan las cuestiones legales y éticas que conlleva el trabajo con animales (Freshney, 2005).

Igualmente, este modelo también posee desventajas. Uno de los inconvenientes más frecuentes es la aparición de contaminaciones de diversos orígenes. Estas pueden ser contaminaciones cruzadas entre distintas líneas o de microorganismos, tales como las bacterias, hongos y levaduras. A su vez, las células cultivadas pueden sufrir la pérdida de las características fenotípicas del tejido del cual provienen las células, proceso definido como desdiferenciación. Sin embargo, actualmente, el aislamiento de linajes específicos es más viable debido al desarrollo de medios selectivos libres de suero. La inestabilidad cromosómica es otro de los problemas que puede sufrir este modelo. Esto es causado porque las líneas celulares continuas suelen contener una composición inestable de cromosomas aneuploides.

Además, surgen diferencias en el comportamiento de células cultivadas y las mismas *in vivo*. Esto se debe principalmente a la disociación de las células de la geometría tridimensional *in vivo* a una bidimensional, generando la pérdida de varias interacciones características de cada tejido. Del mismo modo, se debe tener en cuenta que el ambiente de un cultivo *in vitro* no equivale al de los modelos *in vivo* (Freshney, 2005). Es por esto último que para responder nuestro interrogante tratamos de mimetizar el entorno celular al que se da *in vivo*, en lo referente a la rigidez de la matriz a la que se hallan expuestas dichas células.

2. HIPOTESIS

- El *aumento de la rigidez* de tejidos por alteraciones en la matriz extracelular puede *promover la transformación maligna*. Además, los tumores frecuentemente se correlacionan con un “endurecimiento” palpable del tejido, tornandolos mas rígidos que su contraparte de tejido normal, no siendo esto una excepción en los tumores mamarios
- Una gran proporción de tumores de mama de pacientes *sobre-expresan COX-2*.
- La expresión de COX-2 es una *característica propia del epitelio maligno*
- COX-2 está regulado tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional; a nivel transcripcional, COX-2 es regulada entre otras cosas por *cambios en la rigidez de la matriz* y no existe hasta el momento ninguna evidencia de este tipo de regulación en cáncer de mama contexto patológico en el cual cumple un rol importante (agresividad, metastasis, escape inmune por ejemplo).

En base a la asociación directa de estas evidencias, se planteo la siguiente hipótesis de trabajo,

La rigidez de la matriz induce la expresión de la enzima COX-2 en células tumorales de cáncer de mama.

3. OBJETIVOS

En el presente proyecto final se plantea como objetivo general estudiar la influencia de la rigidez de la matriz extracelular sobre el fenotipo de células epiteliales tumorales derivadas de cáncer de mama.

Dentro del mismo se encuentran los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollar un modelo experimental que permita evaluar el efecto de la rigidez del soporte de cultivo sobre el comportamiento biológico de células *in vitro*.
- Evaluar el efecto de la rigidez del soporte de cultivo sobre la morfología de células 4T1 derivadas de adenocarcinoma mamario murino mediante tinciones de citoesqueleto y microscopia de fluorescencia.
- Analizar el efecto de la rigidez del soporte de cultivo sobre la expresión de la enzima pro-inflamatoria COX-2 o PTGS2 en células 4T1 mediante PCR semicuantitativa y/o inmunodetección.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Lugar de trabajo

4.1.1. Cuarto de cultivo celular

El cuarto de cultivo celular está ubicado en el laboratorio del piso N° 9 de UADELabs, estando destinada única y específicamente al trabajo con cultivos celulares eucariotas. La misma está equipada para el mantenimiento de los mismos y, además, tiene una antesala en la cual los usuarios deben colocarse la vestimenta adecuada (guardapolvo, cofia y botas descartables) antes de entrar al cuarto. Además, esta antesala disminuye la formación de corrientes de aire contaminado desde el exterior al interior. Por lo tanto, siempre que la puerta de ingreso a la antesala este abierta, la de entrada al cuarto de cultivos debe permanecer cerrada.

Al momento de trabajar en el cuarto de cultivo, es muy importante hacerlo en condiciones de total asepsia para evitar la contaminación de los cultivos. Para ello es necesario combinar buenas técnicas de trabajo en laboratorio, equipos de seguridad y las instalaciones adecuadas. Esta combinación dependerá del nivel de bioseguridad con el que se tenga que trabajar.

Las actividades que se realizaron en este cuarto fueron: la preparación del stock celular para la realización del ensayo, el descongelamiento y mantenimiento de la línea celular a utilizar, preparación de soportes de cultivo con rigidez variable, cultivo sobre dicho soportes, tinción de fluorescencia y la toma de muestras.

Todo esto se llevó a cabo utilizando el equipamiento de la sala de cultivos que se detalla a continuación. Se cuenta con dos cabinas de flujo laminar vertical (*ESCO Class II BSC*) en las que se realizó todo el trabajo con los cultivos y la preparación de los soportes de cultivo (*Figura 13A*). Las mismas cuentan con un sistema de filtrado de aire con filtros HEPA, y al ser de tipo II, protegen al cultivo celular con el que se trabaja y al operador que desarrolla las tareas. Para el crecimiento de las células, se utilizó una estufa (*SANYO CO2 incubator*) a 37°C con atmósfera humidificada y 5% CO₂ (*Figura 13B*). Además, se usó un microscopio invertido (*Olympus CKX41*) para la visualización del estado de adhesión de las células, grado de confluencia, grado de spreading sobre los soportes y recuento en cámara de

Neubauer. En caso de que hubiera contaminaciones, este permitió identificarlas, especialmente con el aumento de 200X (*Figura 13C*). Otros equipos usados fueron el baño termostático (*VICKING Modelo Masson D*), para atemperar el medio de cultivo y otras soluciones estériles antes de colocarlas sobre la monocapa de células ya que estas eran conservadas en heladera a 4°C; una centrifuga de mesada para obtener el pellet de células durante el congelamiento y descongelamiento de las mismas (*Figura 13D*) y 2 controladores de pipetas (*Pipet-aid model 4000-220-TC*), los que agilizaron la toma y descarte de los líquidos dentro de la cabina de flujo laminar.

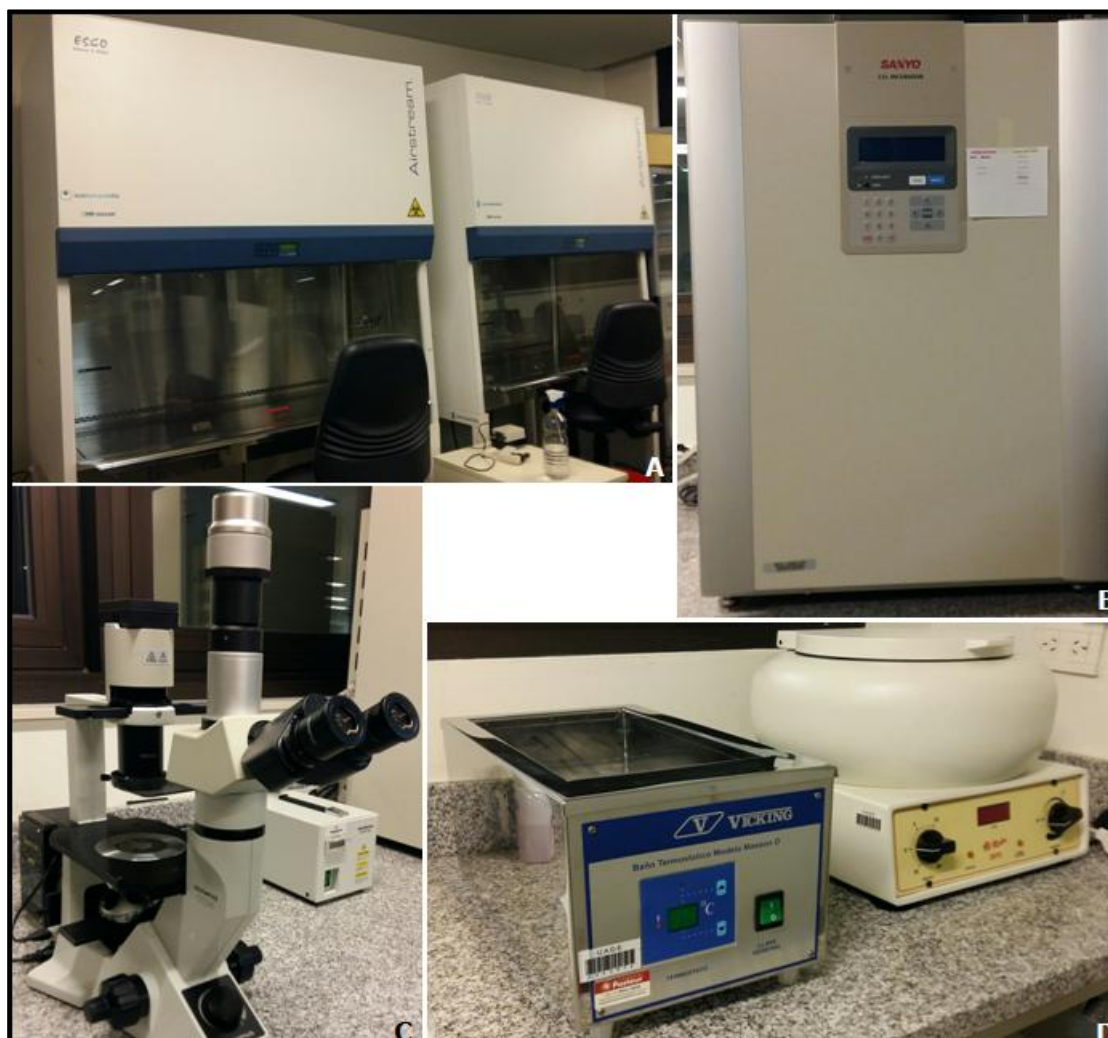


Figura 13. Equipamiento del cuarto de cultivos celulares. Algunos de los equipos utilizados en el desarrollo del presente trabajo de tesis, entre los que se encuentran las Cabinas de Flujo Laminar vertical (A), Estufa de cultivo (B), Microscopio confocal invertido (C), el Baño Termostático y la Centrifuga de Mesada (D)

Para la preservación de las líneas celulares, se contó con un ultra-freezer (*Righi*) a -80°C y un tanque de nitrógeno a -196°C (*MVE Millenium XC 20*). El primero se usó para guardar los criotubos dentro del contenedor con isopropanol y así lograr que la temperatura de los mismos vaya descendiendo lentamente. Las células podían mantenerse en este freezer durante varios meses, pero para períodos de tiempos más prolongados, se debían pasar al tanque de nitrógeno.

4.1.2. Laboratorio de Microbiología y Biotecnología

El laboratorio de microbiología y biotecnología se encuentra en el piso N° 9 del edificio UADE Labs. Dicho laboratorio está equipado con 8 mesadas disponibles para su uso como, también, cuenta con las instalaciones eléctricas necesarias para conectar los equipos requeridos y grifos para la limpieza de los materiales utilizados.

En este laboratorio, se llevó a cabo la preparación de las muestras luego de los tratamientos y parte del Western Blot, incluidas la técnica PAGE, la transferencia del gel a la membrana de nitrocelulosa, el bloqueo de la misma y la incubación con los anticuerpos primario y secundario.

4.1.3. Sala de revelado

La misma se localiza en el piso N° 9 del edificio UADE Labs dentro de la Universidad (*Figura 14*). Esta consta de doble puerta, ambas en color negro que no permiten el traspaso de luz hacia su interior. Además, contiene una lámpara de luz roja, requerida para el revelado de placas en cuarto oscuro, y también está equipada con tubos fluorescentes para los momentos en los cuales no se requiere oscuridad. Aquí se llevaron a cabo los revelados de las placas, correspondientes a los distintos experimentos realizados, sobre la mesada disponible en el cuarto.



Figura 14. Sala de revelado. En esta mesada se realizaron los revelados de la técnica de western blot agregando los materiales necesarios para dicho procedimiento.

En esta sala también se ha llevado a cabo la visualización de las tinciones de fluorescencia de los cultivos haciendo uso del microscopio de fluorescencia (*Axiostar Plus con contraste de fase, equipado con lámpara de mercurio de alta presión HBO 50 L1*). Este microscopio se encuentra acoplado a una computadora de escritorio y una cámara fotográfica (*AxioCamICc 3*) que permiten la captura de las imágenes de fluorescencia (*Figura 15*).



Figura 15. Instrumentos utilizados para tomar las fotografías de microscopía de fluorescencia. Esto consta de un microscopio de contraste de fases con cámara incorporada y computadora con el software correspondiente para el procesamiento de las imágenes obtenidas.

4.2. Materiales

4.2.1. Cultivos celulares: línea celular y reactivos

El modelo de cáncer de mama utilizado para el presente trabajo es el que se corresponde con la línea celular 4T1, amablemente provista por el Dr. Leandro Güttlein, profesor adjunto de la Licenciatura en Biotecnología de UADE.

La línea celular 4T1, fue establecida a partir de un adenocarcinoma mamario murino por Fred Miller y colaboradores a partir de un tumor mamario espontaneo en BALB/c (Aslakson and Miller, 1992) (*Figura 16*). Es una de las cuatro sublíneas derivadas del tumor 410.4, y fue seleccionada por su resistencia a 6-tioguanina. Se caracteriza por ser altamente tumorigénica e invasiva, siendo capaz de metastatizar en forma espontánea del tumor primario en la glándula mamaria a sitios distantes entre los que se incluyen pulmón, hueso, ganglio linfático, cerebro e hígado. Esta línea celular cuenta con características que la hacen un modelo adecuado para el estudio del cáncer de mama ya que mimetiza muy bien a la enfermedad en humanos. Las células se trasplantan fácilmente a la glándula mamaria para dar origen al tumor primario en el lugar exacto donde se desarrolla la enfermedad; permite, al igual que en los humanos, el desarrollo de enfermedad metastásica y pueden manipularse en modelos inmunocompetentes, lo que permite el estudio del infiltrado inflamatorio, la influencia del sistema inmunológico y el uso de inmunoterapias, entre otras cosas. Además, es fácil de manipular *in vitro* (Pulaski et al, 2003).

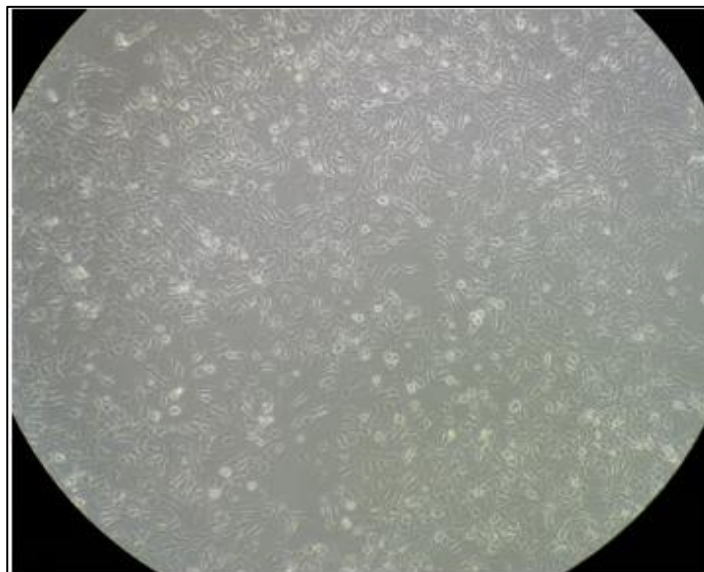


Figura 16. Monocapa subconfluente de la línea celular 4T1 observada en microscopio invertido. Las imágenes están tomadas con un aumento de 100X.

Para el cultivo de dicha línea celular se utilizó el medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 de Gibco con agregado de suero fetal bovino (SFB) Natocor a una concentración final de 10%. Pasadas dos semanas aproximadamente de la preparación del medio se debe agregar glutamina a una concentración final de 20mM. Para evitar posibles contaminaciones se agregó antibiótico-antimicótico de Laboratorios Richet a concentraciones finales de 100 µgr/ml de Estreptomicina y de 100 UI/ml de Penicilina. Los cultivos se mantienen a 37°C y 5% de CO₂. Otros reactivos que fueron necesarios para el mantenimiento del cultivo son: 0,5% Tripsina-EDTA de Gibco y Buffer fosfato salino (PBS) de Merck Millipore.

4.2.2. Hidrogeles de acrilamida de rigidez variable

Los principales materiales necesarios para la preparación de hidrogeles de acrilamida de rigidez variable se resumen en la tabla 4. En el apartado 4.3.2 se explicará más en detalle el rol de cada uno de ellos.

Materiales	Marca
Cubreobjetos circulares de 25 mm Ø	Marienfeld
Acrilamida	Sigma
Bis-acrilamida	Sigma
Acrylicacid N-hydroxysuccinimideester (NHS)	Sigma
Tetrametiletilendiamina(TEMED)	Sigma
Persulfato de Amonio 10% (APS)	Sigma
3-Aminopropyltrimethoxysilane 97% (3-APTMS)	Sigma
Surfasil siliconizing fluid	Thermo Scientific
Solución de Colágeno de cola de rata casero (Cedido por el Dr. Leandro Guttlein)	-
Cloroformo	Sintorgan
Glutaraldehído (Cedido por el Dr. Leandro Guttlein)	-

Tabla 4. *Materiales empleados para la generación de hidrogeles de acrilamida de rigidez variable.*

4.2.3. Colorantes de fluorescencia, anticuerpos y cebadores de ADN

Los colorantes utilizados para la tinción de fluorescencia del citoesqueleto celular y núcleo fueron Faloidina (Life Technologies) y Colorante Hoescht (Sigma), respectivamente.

Los anticuerpos primarios que se usaron durante este trabajo para la detección de proteínas por western blot fueron anti-COX-2-murino clon ab15191 de Abcam (dilución 1/1000) y anti-actina-murina clon A2066 de Sigma (dilución 1/1000). Como anticuerpo secundario se usó HRP-anti-rabbit hecho en cabra clon 115035003 de Jackson (dilución 1/2500). La sigla HRP proviene del inglés horseradish peroxidase (peroxidasa de rabanito). Todos los anticuerpos utilizados fueron cedidos por el Dr. Leandro Guttlein.

Los cebadores de ADN que se usaron para la cuantificación relativa de ARNm mediante retrotranscripción seguida por PCR punto final (RT-PCR) se describen en la tabla 5.

Gen	Secuencia del cebador directo	Secuencia del cebador reverso
COX-2	TGAGTACCGCAAACGCTTCT	CAGCCATTTCTTCTCTCCTGT
HPRT	AGACTGAAGAGCTATTGTAAT	CAGCAGTCTGCGACCTTGAC

Tabla 5. Secuencias de los cebadores de ADN empleados en este trabajo para la RT-PCR

4.3. Métodos

4.3.1. Mantenimiento de la línea celular

4.3.1.1. *Generación del stock celular*

Para generar el stock de células 4T1, se descongeló un criotubo de la línea celular, pasaje N° 9 en una placa p100 y se esperó que su confluencia sea cercana al 90%. Mientras tanto se realizaron cambios de medio rutinarios para asegurar un ambiente óptimo para su crecimiento. Posteriormente, se prosiguió a repicar las células con una dilución de 1/10 en 5 placas p100. Alcanzada la confluencia deseada, se resolvió congelar 20 criotubos, todos pertenecientes al mismo pasaje (pasaje N° 12). Para esto, se levantó la monocapa celular mediante el uso de una solución de 0,5% tripsina-EDTA 2X y se hizo un pool de células, el cual luego se alicuotó en misma cantidad en los criotubos. Cada criotubo se rotulo con el nombre de la línea, número de pasaje y fecha.

Los tubos congelados se mantuvieron en el ultra-freezer (-70°C) 24 horas y luego fueron llevados a nitrógeno líquido para su correcta preservación. Previo al congelamiento, se realizó el recuento de células y un ensayo para asegurarse que no existiera contaminación por micoplasma.

4.3.1.2. *Descongelado*

El descongelado de cada criotubo de células, debe llevarse acabo de la manera más rápida posible para minimizar el crecimiento de cristales de hielo intracelulares durante el proceso de calentamiento (ver diagrama de trabajo en *Anexo III*). Por ello, se recomienda sumergir en un baño termostático a 37°C, de modo de lograr un descongelado completo, para luego diluir con medio nuevo y plaquear. Todos los viales utilizados fueron descongelados de esta manera, en pasaje 12, sobre placas p100.

4.3.1.3. Cambio de medio y repique en monocapa

El intervalo entre cambio de medio y subcultivo varía con la línea celular ya que el mismo depende de la tasa de actividad metabólica y de crecimiento. En este caso, para las células 4T1 el cambio de medio se realizó siempre que se observaron cambios en su coloración, que denotan cambios de pH, resultado de la actividad metabólica de las células, simplemente retirando el medio, lavando y reemplazando con medio fresco.

La división del cultivo (repique) debe llevarse a cabo cuando la concentración de células es tal que cubre entre un 80 y un 90% de la superficie total de la placa, ya que pasada dicha concentración el crecimiento cesa o se reduce de manera notable, así como también puede tener consecuencias en el comportamiento de la línea. Las células 4T1 se propagan como monocapas adherentes. Son células dependientes de anclaje que requieren de la adhesión al sustrato y de un estiramiento, conocido como *spreading*, para proliferar. Cada 2 a 3 días se realizaba un repique del cultivo con un 80-85% de confluencia, realizando la dilución apropiada; generalmente se realizaba una dilución 1/6 (ver diagrama de trabajo en *Anexo III*).

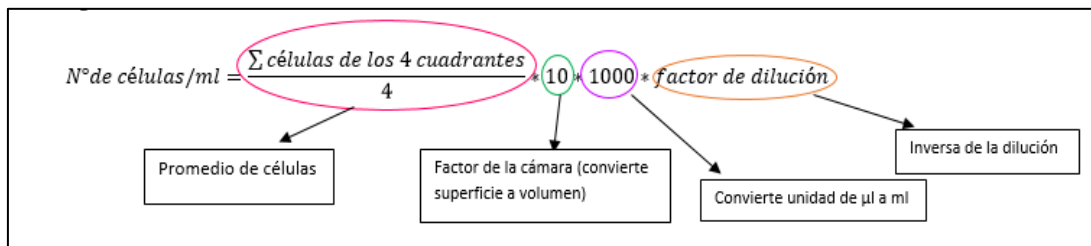
4.3.1.4. Congelado

El congelado de las células debe hacerse en forma paulatina, disminuyendo lentamente la temperatura de a 1°C por minuto en presencia de un agente criopreservante como el dimetilsulfoxido (DMSO). Previo al congelado, las células 4T1 fueron llevadas a subconfluencia para tener una alta densidad celular. Se levantaron con tripsina, se llevó a cabo el recuento pertinente para tener una idea de cuál sería la concentración de células por vial y se resuspendieron en medio de congelación, para alicuotar en los viales necesarios (ver diagrama de trabajo en *Anexo III*). Luego se depositaron a -80°C (ultrafreezer) durante 24 a 48 horas y al cabo de ese tiempo fueron almacenadas a -160°C (nitrógeno líquido) para conservar por largos periodos de tiempo sin deterioro celular.

4.3.1.5. Recuento de células

Para la criopreservación celular y para llevar a cabo los experimentos, fue necesario hacer el recuento celular. Para ello se utilizó la **cámara de Neubauer**, la cual consta de un

portaobjetos con una depresión en el centro que se encuentra marcado con una cuadrícula. Las células a contabilizar fueron levantadas con tripsina y diluidas con medio. Se realizó una dilución 1/3 de suspensión celular, medio solo y azul tripán (para diferenciar células vivas y muertas, dada la permeabilidad que caracteriza a cada grupo), con volumen final de 10µL. Al contarse las cuatro áreas, se pudo calcular la concentración celular con la siguiente ecuación:

$$N^{\circ} \text{ de células/ml} = \frac{\sum \text{células de los 4 cuadrantes}}{4} * 10 * 1000 * \text{factor de dilución}$$


Formula 1. Fórmula para el cálculo de la concentración celular por cámara de Neubauer.

4.3.1.6. Determinación de contaminación por micoplasma

La contaminación por micoplasma puede alterar el cultivo y su metabolismo de una manera sutil. Es por esto, que es necesario asegurar que no se encuentran presentes. Las contaminaciones por micoplasma no pueden ser detectadas simplemente al observar las células por microscopio, pero sí puede detectarse mediante tinción fluorescente. Para ello se llevó a cabo la tinción de los núcleos con el **colorante de Hoechst**. A través de este método se logra ver a los micoplasmas, si es que se encuentran presentes, como filamentos delgados en el citoplasma de las células, al ser observadas en una magnificación de 400X. A pesar de que el núcleo de las células deseadas también se tiñe, se diferencian de la contaminación por su mayor tamaño (ver diagrama de trabajo en *Anexo III*).

4.3.1.7. Determinación de viabilidad celular por MTS

Dentro de los múltiples ensayos para evaluar la viabilidad celular luego de aplicar cierto tratamiento, uno de los más comúnmente utilizados se denomina “ensayo de MTS”. Es un ensayo rápido y sencillo que se basa en la capacidad de las células de reducir el MTS a otro compuesto, el formazán. Sólo las células metabólicamente activas podrán hacerlo, gracias a sus enzimas deshidrogenasas. Mientras que aquellas cuyo metabolismo se encuentra dañado, seguirán teniendo MTS en el pocillo.

Las células 4T1 cultivadas sobre los soportes de rigidez variable fueron incubadas con MTS durante 4 horas a 37°C, y luego se midió la absorbancia a 490nm, tomando como referencia un pocillo con MTS sin células. En este caso el método fue utilizado para determinar la viabilidad de las células sobre estos geles de poliacrilamida, sólo como parámetro para continuar con los ensayos subsiguientes y no de modo comparativo entre geles.

4.3.2. Cultivo de células sobre soportes de rigidez variable: hidrogeles de acrilamida

Para someter a las células *in vitro* a diferentes grados de rigidez y así evaluar la expresión de la enzima COX-2 y el fenotipo celular, se prepararon soportes de cultivo de rigidez variable, según los cuales se los clasifiqué en dos grupos: blandos y rígidos. Como se explicó anteriormente, hay varios modelos para el estudio de la respuesta celular a la rigidez de la MEC. En base a los insumos disponibles se optó por el uso de geles de poliacrilamida (hidrogeles de acrilamida) con recubrimiento de colágeno.

Se partió del trabajo de Cretu y colaboradores (Cretu, Castagnino et al., 2010), el cual se basa en la preparación de geles de poliacrilamida en los cuales variando la concentración de bis-acrilamida, se puede controlar la dureza de los mismos y por tanto obtener geles con diferente rigidez. El módulo elástico de los mismos se extiende de 3 kPa (blandos) a 20 kPa (rígidos). En este caso, en base a lo estudiado y ya comentado sobre glándula mamaria normal y cáncer de mama, hemos optado por mantener los valores propuestos en el trabajo de Cretu y colaboradores usando 4 porcentajes de bis-acrilamida: 0,03; 0,06; 0,15 y 0,3%.

Para facilitar su manipulación y posterior manejo en cultivo, estos geles fueron polimerizados sobre cubreobjetos de vidrio, los cuales necesitan ser activados para que los geles puedan quedar efectivamente unidos. Con este fin, los cubreobjetos fueron expuestos a NaOH para volverlos más reactivos. Luego se agregó 3-APTMS, que se une por enlaces Si-O-Si, y deja grupos amino libres que reaccionarán con el glutaraldehído agregado posteriormente, y actuará como entrecruzador entre el 3-APTMS y el gel de poliacrilamida (*Figura 17*) (Klein, Yung et al., 2007). Por otro lado se polimerizaron los geles con NHS en superficie, el cual se integra en el gel en formación y se une a los grupos aldehído del

glutaraldehído sobre el cubreobjetos. A su vez, deja expuesto grupos amino para poder recubrir con la proteína de matriz extracelular de interés, que en este caso se trata de colágeno, para proveerle las uniones necesarias a la célula en cultivo. Paralelamente, un segundo set de cubreobjetos fue siliconizado para ser agregado encima del otro vidrio con el gel en formación, de modo que se obtiene un sándwich que facilita la polimerización y luego la remoción de este segundo cubreobjeto.

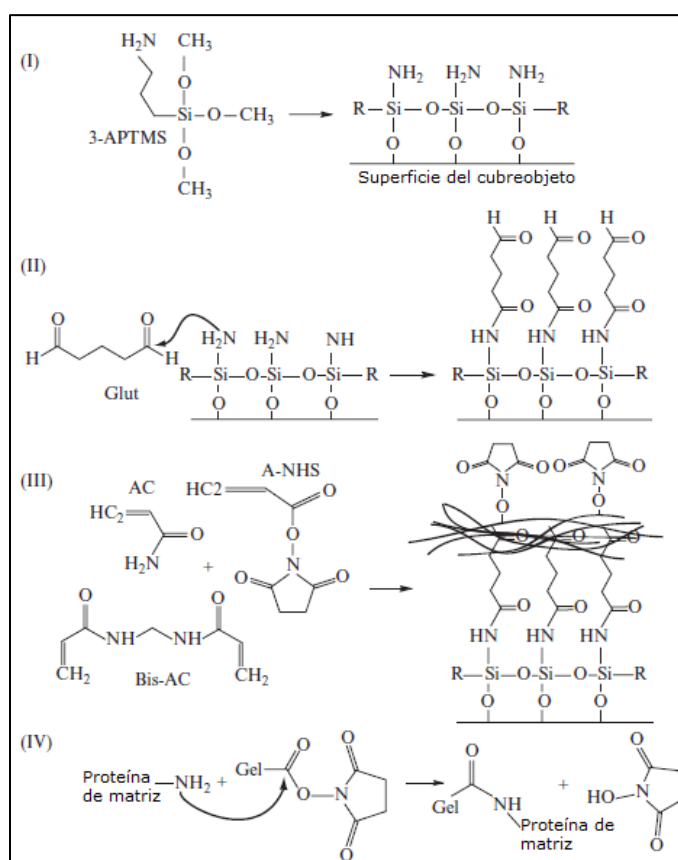


Figura 17. Esquema de reacciones para generar matrices de rigidez variable. (I) El agregado de NaOH “graba” la superficie del cubreobjetos. Luego el 3-APTMS reacciona con el vidrio reactivo para formar enlaces Si-O-Si. Los grupos amino de este reactivo quedan libres para reacciones posteriores. (II) El glutaraldehído reacciona con los grupos amino expuestos y a su vez actúa como entrecruzador entre el 3-APTMS y el gel de poli(acrilamida), de modo que este último siempre quede adherido de forma segura. (III) Las soluciones de gels correspondientes a cada punto de rigidez se dispensan sobre estos vidrios activados y se dejan copolimerizar junto con al agregado de NHS por encima, el cual se integra al gel en formación. (IV) Los grupos ester del NHS reaccionan con los grupos amino de la proteína elegida de matriz (en este caso colágeno), y de este modo se une a los

geles para permitir la adhesión de las células. Esquema tomado de Klein y colaboradores (Klein, Yung et al., 2007).

4.3.3. Evaluación de la morfología celular a campo claro y fluorescencia

Para evaluar la morfología celular ante los distintos grados de rigidez a los que son sometidas las células, se las observó bajo un microscopio invertido. Esto permite determinar la adherencia y el grado de estiramiento, fenómeno que se asocia a una mayor capacidad de proliferación, la ausencia de contaminación y el estado celular. Además para evaluar con mayor detalle la morfología celular se tiñó el citoesqueleto con fluorocromos y observó bajo un microscopio de fluorescencia.

En virtud a lo recién mencionado cabe aclarar que ciertas moléculas por su estructura química, tienen la capacidad de emitir luz a longitudes de onda específicas luego de la absorción de una longitud de onda menor y de mayor energía. Este proceso es llamado fluorescencia y las moléculas que exhiben este comportamiento se denominan fluorocromos. Todos los fluorocromos tienen un espectro de absorción y de emisión de luz característico. Luego de la absorción de fotones de la longitud de onda de excitación, los fluorocromos se excitan a un estado mayor e inestable de energía. Esta inestabilidad se traduce posteriormente en la emisión de fotones de una menor energía a una menor longitud de onda. Un fluorocromo puede interactuar con un componente celular, ya sea en forma directa, o conjugado a otra sustancia capaz de unirse a estructuras celulares, como por ejemplo un anticuerpo que reconoce de forma específica una proteína.

Ahora bien, la principal proteína que compone el citoesqueleto de una célula es la *actina*. Los filamentos de actina pueden ser fácilmente marcados utilizando las falotoxinas (aisladas del hongo Amanita) unidas a un fluorocromo. El miembro más común de esta familia de compuestos es la **faloidina**. La faloidina se une selectivamente y estabiliza los filamentos de actina polimerizados, no así a la actina monomérica; propiedad que la convierte en un compuesto más útil para la visualización del esqueleto celular en lugar de utilizar anticuerpos acoplados a fluorocromos.

Con el fin de visualizar el citoesqueleto en mayor detalle, las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% para realizar esta tinción. Al ser impermeables a la faloidina, fue necesario permeabilizarlas con un detergente como el Tritón. A su vez se realizó como

contratinción, la tinción fluorescente de los núcleos con **colorante de Hoescht** (bisbenzimidida), el cual se une con alta afinidad al ADN y ya se ha mencionado para la detección de contaminación por micoplasma. Las células son permeables a este fluorocromo que posee una longitud de onda de 370 nm y emisión alrededor de 450 nm (ver diagrama de trabajo en *Anexo III*).

4.3.4. Extracción de Proteínas y ARN

El perfil de expresión de proteínas que presenta una célula en determinado momento depende del conjunto de genes que se estén activando y esto está relacionado directamente con las señales que recibe la célula, de su micro ambiente y de las características celulares que le son propias. Para evaluar la expresión génica por tanto podemos trabajar a nivel de ARN y/o proteínas llevando a cabo una RT-PCR seguida de una PCR semicuantitativa y/o un Western Blot respectivamente. Para evaluar los niveles de expresión de COX-2 bajo los diferentes grados de rigidez se decidió trabajar con ambos enfoques.

Para la obtención de los extractos proteicos y de ARN se usaron las técnicas propuestas por Cretu y colaboradores (Cretu, Castagnino et al., 2010) en donde hacían uso de buffer reductor (Laemmli Buffer) y TRIzol respectivamente. En este caso se hizo un pool con las réplicas técnicas dentro de cada concentración, para cada réplica biológica, de modo de concentrar la muestra (ver diagrama de trabajo en *Anexo III*). Los extractos proteicos fueron expuestos durante 5min a 100°C, fenómeno conocido como “crackeo” y fueron almacenados así a -20°C hasta su uso. Mientras que para el ARN, se guardaron directamente los extractos en TRIzol a -80°C hasta su extracción, siguiendo instrucciones del fabricante del producto.

4.3.5. Retrotranscripción seguida de PCR punto final (RT-PCR)

Otra de las técnicas seleccionadas para estudiar la proteína en cuestión fue la combinación de una retrotranscripción para conocer los niveles de expresión a nivel de ARN mensajero, seguida de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) para poder cuantificar estos niveles y así encontrar diferencias según las condiciones estudiadas. En conjunto esto consiste en tomar el ARN extraído y pasarlo a ADN copia (ADNc) con una enzima retrotranscriptasa y oligonucleótidos con bases de timina, que permitan levantar todo el conjunto de ARNs mensajeros que se estaban expresando al

momento en que fue tomada la muestra, por la complementariedad con las bases de adenina características de este tipo de ARN. Luego se purificó el ADNc así obtenido y se utilizó como molde para la PCR. En ella se utilizaron primers específicos para las secuencias de interés, en este caso para COX-2 y para HPRT (secuencias detalladas en sección 4.2.3), de expresión constitutiva como control de reacción. La PCR permite amplificar exponencialmente fragmentos de tamaño conocido que pertenecen a estas secuencias, ya sea para detectar presencia/ausencia como también para determinar diferencias cuantificables. El procedimiento de PCR consta de incrementos y descensos de temperatura en los cuales se permite la desnaturalización de las hebras del ADN molde para permitir el acceso de la enzima polimerasa y los demás reactivos, el pegado de los primers y la extensión de las hebras para generar nuevas copias, de modo que el producto final está enriquecido con el fragmento buscado.

Luego para visualizar el resultado es necesario emplear otra técnica conocida como electroforesis en gel de agarosa. Para ello se prepara un gel del polímero mencionado, se siembran los productos obtenidos en la PCR y se genera una corriente eléctrica que impulsa la movilidad de las muestras. Este fenómeno ocurre gracias a la carga negativa que el esqueleto de fosfatos le confiere al ADN, de modo que migrará hacia el electrodo positivo. El porcentaje del gel determina el entramado y tamaño del poro del mismo, por lo que se define a partir del tamaño de los fragmentos a separar. En este caso se esperaban bandas menores a 1000pb, por lo que se polimerizó un gel de 2%. Finalmente para visualizar las bandas, fue necesario utilizar agentes intercalantes como el bromuro de etidio, que fluorescen al ser irradiados con luz UV, cuya señal será proporcional a la cantidad de ADN presente, y para identificar cuáles son las bandas que se buscan, se emplea un marcador de peso molecular que posee bandas de cierto tamaño en un rango definido.

4.3.6. SDS-PAGE y Western Blot

Una de las técnicas seleccionadas para estudiar la proteína de interés fue la de **Western Blot** o Inmunoblotting, la cual involucra transferir las proteínas de una muestra a un soporte sólido y luego sobre este realizar la detección de la molécula target. En este caso, la muestra primero va a ser corrida en un gel por SDS-PAGE, para a continuación ser transferida

a una membrana de nitrocelulosa por un método húmedo y finalmente detectar la molécula mediante una reacción de quimioluminiscencia.

El primer paso involucra la electroforesis de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) en un sistema buffer discontinuo, el cual permite obtener bandas con mejor resolución. Este se prepara con dos tipos de geles: el *gel de separación*, de pH más ácido y menor tamaño de poro, lo que permite que este tenga un efecto tamiz; y el *gel de stacking* o apilamiento, de pH más alcalino y mayor tamaño de poro. En este último, se produce lo que se denomina “efecto sándwich”, en el cual las proteínas quedan entre los iones glicina y cloruro a causa de las diferencias de movilidad que estos poseen y así se concentran las proteínas de la muestra en una delgada línea, entrando todas en el mismo momento al gel de separación. Cabe recordar que en el momento de la toma de muestra se utilizó un buffer reductor y se realizó un “crackeo” de las mismas, lo que hace que las distintas proteínas de la muestra se encuentren totalmente desnaturalizadas y con carga negativa. Por lo tanto, la velocidad a la cual va a migrar cada proteína en el gel de separación depende exclusivamente de su tamaño, permitiendo hacer una estimación del tamaño molecular de las mismas al correr junto con estas un marcador de peso molecular. Se prepararon geles de separación y de *stacking* de 12% y 5% respectivamente, y para la corrida se usaron todos los componentes del sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell, de Bio Rad.

Una vez obtenido el gel, se prosiguió a la *transferencia* de las proteínas a un soporte sólido o “blotting”, en este caso una membrana de nitrocelulosa. El equipo de transferencia que se utilizó fue el Mini Trans-Blot® Cell, el cual se basa en el método de transferencia húmeda. Esta inmovilización de las proteínas deja que luego se pueda llevar a cabo una detección específica del target, en este caso la enzima COX-2, mediante el uso de anticuerpos específicos. En esta última parte, primero se debe incubar la membrana con el anticuerpo primario (detallado en sección 4.2.3), reconocedor de la proteína de interés, y posteriormente con el anticuerpo secundario, que determinará el método de revelado. Al utilizar un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rabanito (HRP, por *horseradish peroxidase*), el método final de revelado fue por detección de luminiscencia con un reactivo con luminol (Pierce® ECL Western Blotting Substrate, ThermoScientific) el cual tiene el sustrato con el que la HRP emite luz, por lo que el último paso fue exponer placas

radiográficas en un cuarto oscuro y en estas quedaron impresionadas las bandas correspondientes a las proteínas blanco.

4.3.7. Obtención y análisis de datos

A partir de las imágenes de los revelados, se prosiguió a transformar las intensidades de las bandas en datos numéricos utilizando un procesador de imágenes denominado **Image J**. En este programa, los valores de cada uno de los experimentos fueron normalizados con respecto a la banda de β -actina, para repetir cada experimento sembrando las mismas cantidades netas de proteína. Brevemente, el programa permite convertir el dato gráfico de intensidad en datos numéricos de densidad óptica (DO). Con ellos se puede hacer una comparación estadística, y/o curvas de calibración para extrapolar datos de concentración.

Para estudiar si hubo diferencias significativas entre los datos de los distintos puntos de rigidez, se llevó a cabo un análisis estadístico mediante los programas *GraphPad e Infostat* (*Universidad Nacional de Córdoba*). Los resultados obtenidos fueron analizados mediante la prueba estadística correspondiente, según el cumplimiento de los supuestos. Para analizar la expresión a nivel proteico de COX-2, se realizó un test de Kruskal-Wallis, ya que la variable no posee una distribución normal. Esto se hizo a partir de 4 réplicas independientes. Mientras que para la comparación de las mediciones obtenidas por microscopía de fuerza atómica se realizó un test T a partir de 25 mediciones independientes para cada muestra. Se consideraron significativas aquellas pruebas con $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Preparación del stock celular necesario para el diseño propuesto

La línea celular elegida como modelo biológico, 4T1, no estaba en el laboratorio de Microbiología y Biotecnología de UADE por lo que era necesario generar un stock de la misma. Con este fin, el Dr. Leandro Güttlein del Instituto Leloir cedió una alícuota de dicha línea celular. Se congelaron 20 criotubos (1×10^5 células/ml) a partir de un único pool de células 4T1 de pasaje 12. 9 de estos criotubos han sido utilizados como replicas biológicas independientes para los ensayos realizados y el resto, han quedado a disposición de la universidad para ser utilizados por la cátedra de Cultivos Celulares y/o grupos de investigación que lo requieran. Para alcanzar el número de células necesarias para el congelado, se amplificó la línea celular en placas p100 y se observó el mantenimiento de las características propias de la línea. Para evitar la aparición de contaminaciones de tipo bacterianas y/o fúngicas durante el trabajo con el cultivo se adoptó el uso de antibiótico – antimicótico. De esta manera se obtuvo un stock de células suficiente para proseguir con la puesta a punto del modelo y los ensayos correspondientes.

Antes del congelamiento de los criotubos, a modo de validación de la línea celular, se analizó que no tuvieran contaminaciones con micoplasma. El resultado de la prueba realizada con colorante H \ddot{o} chst fue negativo. La presencia de micoplasma, con esta técnica, se puede visualizar debido a que todos los núcleos se tiñen con dicho reactivo, pero permite diferenciar a los núcleos de micoplasma de los núcleos celulares ya que son de menor tamaño (*Figura 18*). Por ende, la ausencia de núcleos pequeños llevó a la conclusión de que no existía dicha contaminación en la línea 4T1.

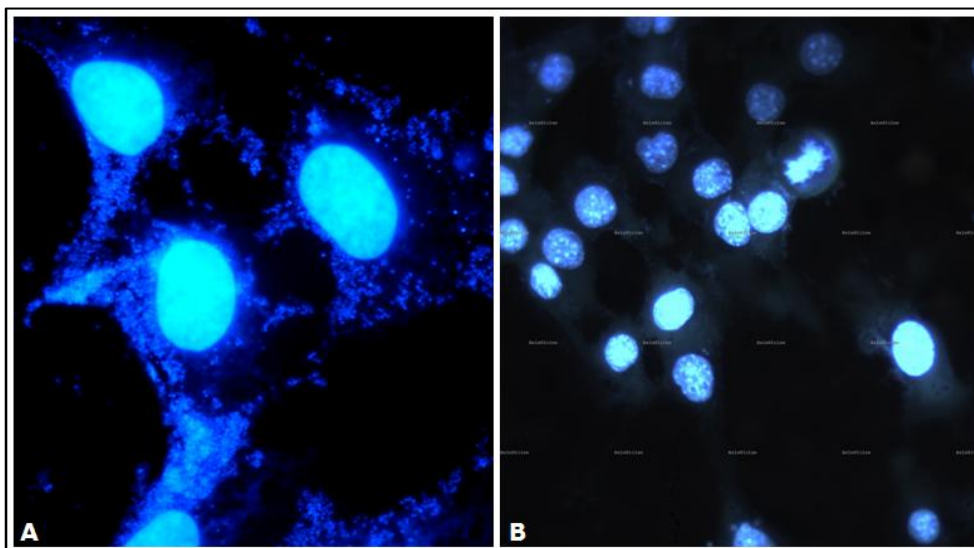


Figura 18. *Tinciones H \ddot{o} chst de cultivos celulares para detecci3n de presencia de micoplasmas. A. Ejemplo de resultado positivo, en el cual se observan, adem1s de los grandes n \acute{u} cleos celulares te \tilde{n} idos, peque \tilde{n} os gr1nulos alrededor que corresponden a los n \acute{u} cleos de micoplasma (Fuente imagen: http://www.pharmamicroresources.com/2014_12_01_archive.html). B. Resultado de la tinci3n de las c3lulas 4T1 donde no se ve presencia de micoplasma ya que solo se observa la tinci3n del n \acute{u} cleo de las mismas.*

5.2. Puesta a punto del modelo experimental

Para evaluar el efecto de la rigidez del soporte de cultivo en la expresi3n de COX-2 fue necesaria la puesta a punto del protocolo de preparaci3n de hidrogeles de acrilamida, elecci3n de las concentraciones a ensayar, los tiempos de cultivo hasta la obtenci3n de las muestras y los procedimientos para optimizar la recolecci3n de las mismas, entre otras. Cada uno de estos puntos ser1 desarrollado en los siguientes apartados.

5.2.1. Protocolo de preparaci3n de Hidrogeles de Acrilamida de Rigidez Variable

Como se explic3 en materiales y m3todos, el protocolo que se tom3 como referencia para la obtenci3n de un sustrato de cultivo con diferente grado de rigidez, es el propuesto por Cretu y colaboradores (Cretu, Castagnino et al., 2010): Hidrogeles de Acrilamida.

Brevemente, propone activar cubreobjetos con el uso de NaOH, 3-APTMS y glutaraldehido y polimerizar sobre los mismos, soluciones de acrilamida/bis-acrilamida y NHS. Para favorecer la polimerizaci3n se coloca sobre dicha soluci3n un cubreobjetos

siliconizado. Finalmente, se agrega, sobre el gel polimerizado, una solución de la proteína de MEC elegida, preferentemente en una concentración de 3 µg/ml; luego de incubar durante 16 horas a 4°C, se lava para retirar el exceso de la misma y se bloquea con seroalbumina bovina (BSA) los grupos del NHS que no reaccionaron con la proteína de la MEC. Luego, cada hidrogel adherido al cubreobjetos, se coloca en el interior de un pocillo de una MW6 y se plaquea las células sobre ellos. Los autores reportan que tan sólo con un día de cultivo sobre los geles se ven diferencias en la morfología celular.

Al seguir fielmente este protocolo surgieron diversas complicaciones que se enumeran en los apartados 5.2.1.1 a 5.2.1.6.

5.2.1.1. Mayor adhesión de las células plaqueadas sobre el fondo del pocillo que sobre el hidrogel independientemente de su rigidez.

Los hidrogeles, como se mencionó previamente, se colocaban directamente sobre los pocillos de la MW6 para luego sobre ellos llevar a cabo el plaqueo e incubación de las células. Sin embargo, tras el plaqueo de las células se observaba que una mayor proporción de las mismas se adherían al fondo del pocillo que quedaba expuesto alrededor y por debajo del cubreobjeto donde estaba adherido el hidrogel (dato no mostrado). Esto perturba el modelo ya que el número final de células que se adherían y proliferaban sobre el hidrogel era muy bajo. Por ello, se incorporó el uso de agarosa estéril 1% para cubrir por complete toda la base del pocillo. La agarosa al ser inerte no permite la adhesión de las células sobre ella por lo que de este modo, se evita la adhesión celular fuera del hidrogel.

5.2.1.2. Alto número de células en suspensión tras el plaqueo.

Del total de células plaqueadas, observamos que una proporción considerable de ellas no se adherían al hidrogel (dato no mostrado) por lo que se introdujo un lavado y cambio de medio pasado 24 horas del cultivo. Este lavado permitió la remoción de las células que se encontraban en suspensión, favoreciendo la visualización al microscopio y las condiciones de cultivo para aquellas que si se habían adherido a los hidrogeles.

5.2.1.3. Poca adhesión de células en geles de 0,03 y 0,06%.

En los primeros ensayos, se plaqueaba el mismo número de células en los diferentes geles, independientemente de la rigidez de los mismos. Sin embargo, en los geles duros tras un día de cultivo el número de células adheridas era mayor. A los fines de estudiar los cultivos a tiempos cortos con niveles comparables de confluencia celular, se decidió sembrar el doble de células en los geles blandos (aquellos de 0,03% y 0,06%) que en los duros (aquellos de 0,15% y 0,3%). De todas maneras, esto ya era una sugerencia de los autores del trabajo original para mejorar los resultados.

5.2.1.4. Formación de precipitado luego del bloqueo con la solución de BSA.

Luego de la incubación de BSA con los hidrogel, observamos la formación de un precipitado (*Figura 19a*), el cual era removido mediante lavado con PBS. Luego de 24 horas de cultivo, se observaban al microscopio precipitados muy similares a los mencionados, junto con cúmulos de células (*Figura 19b*). Este efecto “secuestraba” células y les impedía la unión al sustrato. Luego de consultar directamente con los autores, se eliminó este paso, ya que los mismos planteaban que las proteínas presentes en el suero fetal bovino del medio de cultivo completo podían cumplir el rol de bloquear los grupos sin reaccionar del NHS al igual que la solución de BSA.

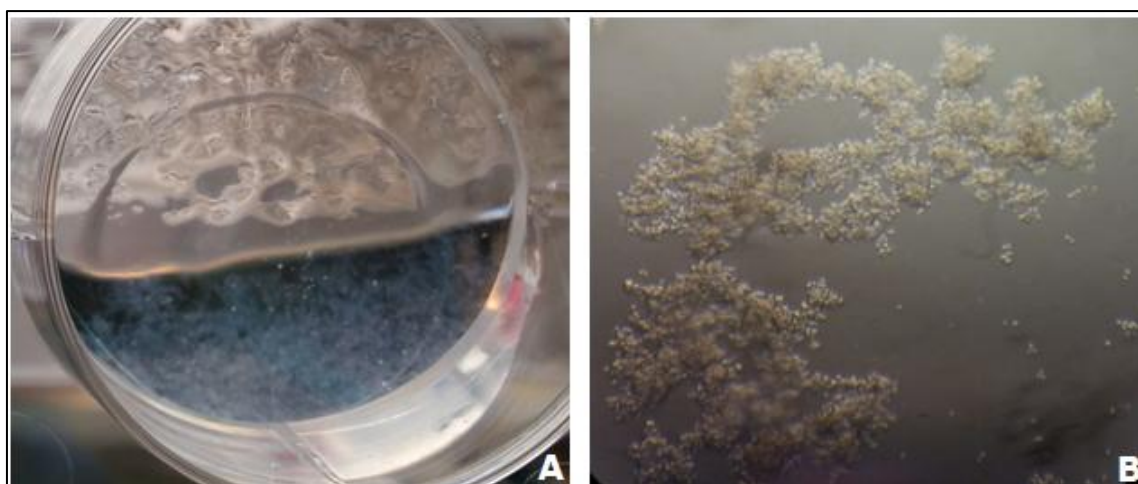


Figura 19. *Formación de precipitado luego del agregado de solución de BSA en PBS. (A) Observación a simple vista de un precipitado viscoso y blanquecino. (B) Observación de cúmulos de células luego de 1 día de cultivo sobre los geles de poliacrilamida. Imagen tomada con microscopio invertido, con aumento de 100X.*

5.2.1.5. Solución de colágeno de concentración desconocida.

La proteína de la MEC utilizada fue colágeno a diferencia del protocolo propuesto en donde usaban fibronectina. Esto fue así no sólo por la disponibilidad del reactivo sino también por la relevancia del colágeno en el cáncer de mama, como se ha mencionado en la introducción previamente.

La solución de colágeno a utilizar, cedida por el Dr. Leandro Güttlein, se obtenía a partir de cola de rata y su concentración era desconocida. Durante las primeras pruebas del protocolo, se utilizó la solución de colágeno 1X sin cuantificar, pero los resultados no fueron reproducibles. Por ese motivo, decidimos semi-cuantificar la solución de colágeno mediante la comparación con una solución estándar de BSA en SDS-PAGE seguido de tinción con Coomassie Blue y cuantificación con ImageJ.

Con este objetivo en mente, se prepararon diluciones seriadas de la solución incógnita de colágeno y de una solución de BSA de concentración conocida, para como curva de calibración, y luego se corrieron en un gel SDS-PAGE de 7,5% (adecuado para los tamaños de las proteínas de interés, colágeno y BSA). Por último, se tiñó el gel con Coomassie Blue y tras el desteñido se tomó una fotografía (*Figura 20 A*) para cuantificar con el programa Image J.

Con los valores numéricos obtenidos, correspondientes a la densidad óptica de la señal, se realizó la curva de calibración (*Figura 20 B*) con la cuál finalmente se pudo extrapolar la concentración de la solución de colágeno. De esta forma, se conoció que la misma tenía una concentración de 3 mg/mL, mil veces más concentrada que lo recomendado en el protocolo de referencia. A partir de esto, se procedió a diluir la solución de colágeno antes de utilizarla. Se probaron como diluyentes, ácido acético 0,5mM y PBS, obteniendo mejores resultados en términos de adherencia y supervivencia celular con PBS (datos no mostrados).

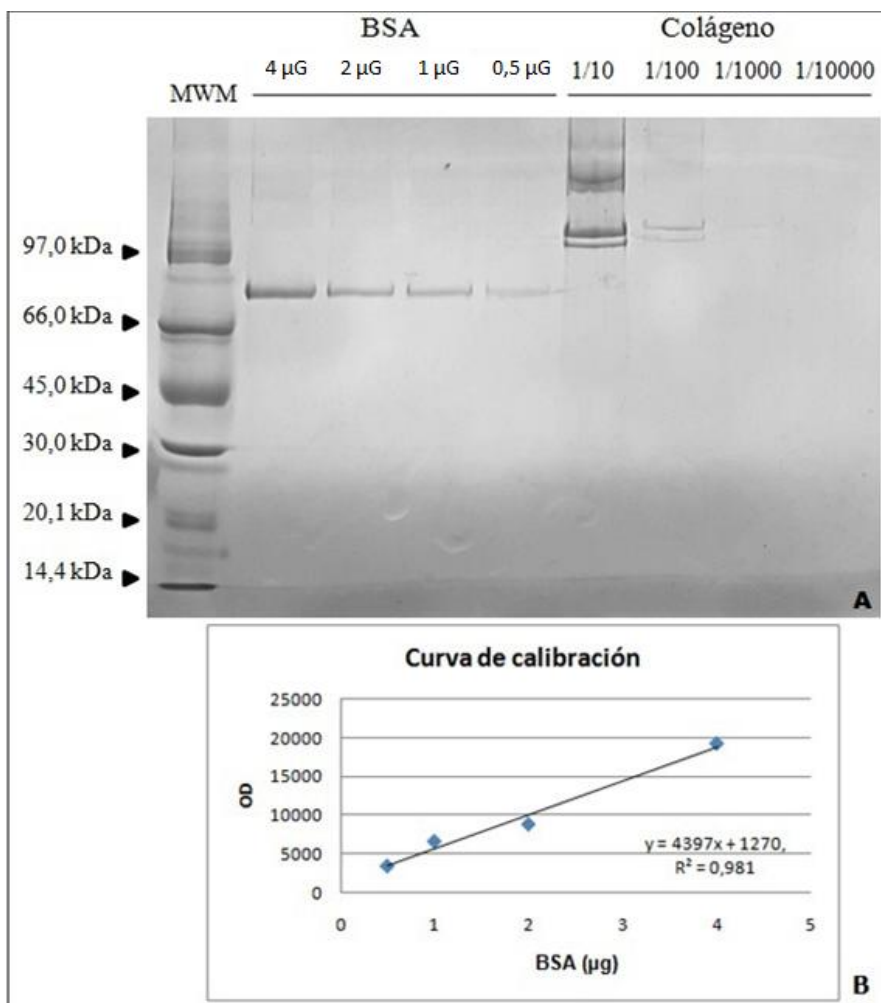


Figura 20. Cuantificación de la solución incógnita de colágeno. Se realizaron diluciones seriadas de la solución de colágeno (incógnita) y de una solución de BSA de concentración conocida. Con ellas se corrió un gel SDS-PAGE teñido con Coomassie Blue (A) y a partir de datos de densidad óptica (OD) se construyó la curva de calibración a partir de la cual se extrapolaron la concentración de la solución de colágeno (B).

5.2.1.6. Polimerización del hidrogel

Al mezclar los reactivos para preparar los geles, se observó que la solución presentaba dos fases bien definidas, y al querer homogeneizar se generaban burbujas, como en una emulsión. Esto dificulta la toma del volumen correspondiente e impacta sobre la calidad del gel final, ya que si se polimeriza con burbujas, afecta la unión de las células. La mayoría de los reactivos utilizados son de carácter hidrofílico, excepto la solución saturada de NHS que se prepara en tolueno, solvente inmiscible en agua (Cretu, Castagnino et al., 2010). A raíz de esto, nuestra hipótesis fue que las dos fases observadas se debían a esta mezcla de

solventes, y al cambiar el método de polimerización de modo que la solución de NHS no entre en contacto directo con la solución stock del gel, se podría sobrepasar esta dificultad y lograr mejores resultados. Con esta hipótesis en mente, se ensayaron dos métodos alternativos de polimerización en paralelo con el método convencional.

- a) Método convencional: Agregado del NHS en la misma solución del gel.
- b) Método de agregado del NHS sobre el gel ya polimerizado (Syed, Karadaghy et al., 2015).
- c) Método de co-polimerización: Dispensar la solución del gel sobre el cubreobjeto y agregar el volumen adecuado de NHS por encima (Wang, Y. y Discher, D.)

El método que implicaba el agregado del NHS sobre el gel ya polimerizado no se ha podido llevar a cabo con éxito debido a la formación de una solución viscosa que “pegaba” el cubreobjetos, sobre el cual se encontraba el hidrogel unido, al well de la placa. Esto no hacía posible la manipulación del hidrogel ya que al querer retirarlo del well se rompía, por lo que fue descartado tras observar dicho comportamiento repetidas veces.

Finalmente, se optó por el *método de co-polimerización* ya que en todas las concentraciones ensayadas de bis-acrilamida las células presentaron el comportamiento esperado para cada punto y se adhirieron en mayor proporción que con el método convencional (*Figura 21*). Además, en ensayos subsiguientes se observó que era más reproducible que el método original.

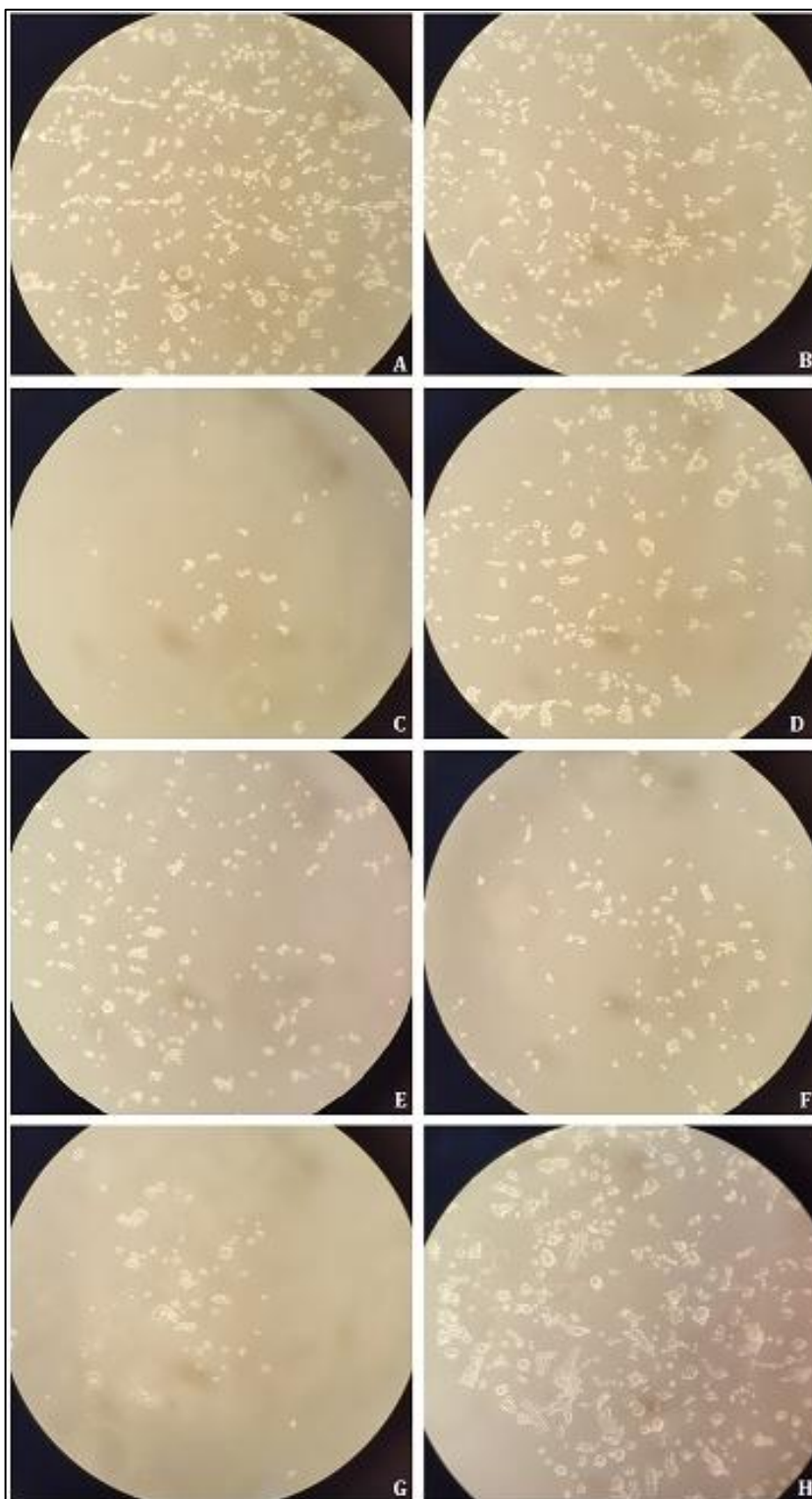


Figura 21. Comparación de métodos de polimerización. La columna izquierda corresponde al método original mientras que la de la derecha al método de co – polimerización. Las concentraciones ensayadas de gel son 0.03% (A y B), 0.06% (C y D), 0.15% (E y F) y 0.3% (G y H). Se puede observar que el comportamiento es el esperado y mejora la adherencia de las células.

5.2.1.7. Solución de NHS

El reactivo comercial es un polvo (*Sigma-Aldrich*), y siguiendo el protocolo original de preparación de hidrogeles, como se mencionó en 5.2.1.6., se debía preparar una solución saturada en tolueno. Los autores detallaban que había que agregar NHS hasta que la solución adquiriera un color rosado y no se disuelva más (condiciones saturantes). A pesar de seguir estas indicaciones, nunca se logró obtener una solución que se asemejara a la descripción del protocolo de referencia, ni siquiera agregándolo en pequeñísimas cantidades y probando diferentes condiciones (agitación, temperatura). En base a esto y como los resultados no eran reproducibles, en paralelo con los cambios hasta ahora detallados, la única variable que aún no había sido analizada era la disolución de este reactivo. Luego de consultar con los autores y otros investigadores, resolvimos probar su disolución con otros solventes, los cuales indefectiblemente deben ser orgánicos para evitar que se hidrolice y desestabilice el NHS en solución. Es así como se evaluó en paralelo disolverlo en tolueno (protocolo original), cloroformo y dimetilsulfóxido (DMSO). *A priori* se descartó la opción con DMSO porque si bien se lograba la disolución del compuesto, se observó que impedía la correcta polimerización del gel (dato no mostrado). Finalmente se obtuvieron mejores resultados al utilizar cloroformo (mayor reproducibilidad en la polimerización de los geles), por lo que se adoptó esta modificación a partir de ese momento.

De todas maneras, es muy importante destacar que nunca se obtuvo una solución propiamente dicha. Al adoptar este cambio las células se adherían más a los hidrogeles y se observaba el comportamiento esperado para cada gel en términos de su morfología. Por esta razón se decidió trabajar con una solución saturada de NHS en cloroformo.

5.2.2. Selección de puntos de rigidez

Los puntos ensayados en el protocolo de referencia, son un ejemplo de lo que sería un tejido *blando*, el entorno normal, y un tejido *duro*, entorno tumoral. Para esto, definen valores de módulo de Young menores a 3 kPa para los blandos (0,03% y 0,06%) y mayores a 20 kPa para los duros (0,15% y 0,3%) (Cretu, Castagnino et al., 2010).

Como parte de la puesta a punto se exploraron otros puntos de rigidez teniendo en cuenta, a) que fueran fisiológicamente compatibles o relevantes y b) que fueran técnicamente posibles de elaborar con el modelo experimental y el protocolo propuesto, ya que

modificaciones muy grandes podrían significar una limitante en cuanto a insumos disponibles (reactivos y equipamiento). Como se mencionó en varias oportunidades, no hay un consenso respecto a la rigidez de la mama normal versus la tumoral en términos numéricos ya que el grado de rigidez reportado depende de la técnica de medición y el modelo planteado. Esto implica entonces, que no hay valores que universalmente se asocien a los tejidos mamarios rígidos o blandos, aunque se ha postulado que el rígido suele ser hasta 10 veces mayor y es coincidente con un estado patológico de la glándula (Ramiao, Martins et al., 2016).

Por un lado se incorporaron puntos de rigidez por encima de 0,3%: 0,6%, 1,2% y 1,5% (recordemos que el % se relaciona con la cantidad de Bis-Acrilamida final). Sin embargo, el comportamiento observado en estos hidrogeles fue similar al de los geles blandos, 0,03-0,06% (*Figura 22*). Consideramos que este tipo de respuesta puede deberse a que los hidrogeles alcanzaran el punto de inflexión. En este punto, el aumento en la concentración de Bis-acrilamida no aumenta la rigidez formal del gel (Denisin and Pruitt, 2016). Por ello, ningún punto nuevo fue incorporado.

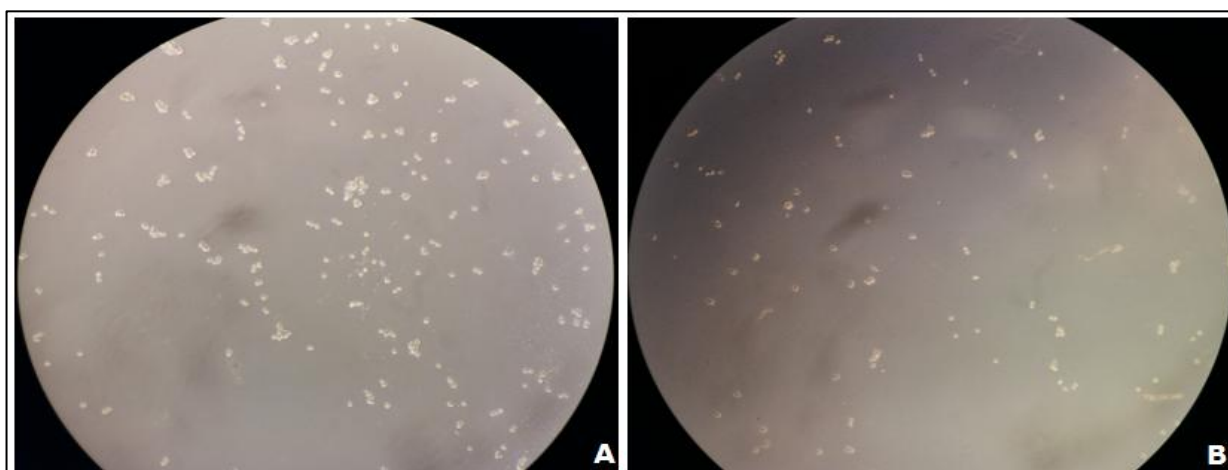


Figura 22. Nuevos puntos de rigidez. Siguiendo el mismo protocolo se agregaron 3 puntos de rigidez a la curva de trabajo: 0,6% (**A**), 1,2% (**B**) y 1,5%. Se observa que la morfología de las células es semejante a aquella en los geles blandos, por lo que se descartan. Para los geles de 1,5% no se tomaron fotografías ya que dada la concentración de entrecruzador, a simple vista presentaron un color blanquecino que dificultó la observación de las células al microscopio.

5.2.3. Determinación de tiempo de cultivo y optimización de toma de muestra

En cuanto al ensayo con los hidrogeles de concentración 0,03-0,3% de Bis-Acrilamida, fue necesario encontrar el tiempo de cultivo óptimo que permitiera a las células hacer “*spreading*” y al mismo tiempo minimizar la cantidad de células que se desprenden ante una matriz poco favorable, quedan en suspensión, y eventualmente mueren. Se encontró que un día de cultivo no era tiempo suficiente para que las células en los geles rígidos puedan hacer *spreading*, mientras que tres días era un tiempo excesivo y en los geles blandos, comenzaban a despegarse y formar cúmulos. El mejor equilibrio se logra con dos días de cultivo, incorporando un cambio de medio luego del primer día, para asegurar buenas condiciones de cultivo.

Para corroborar la viabilidad celular a las 48 horas de haber sido plaqueadas las células sobre los hidrogeles de diferente rigidez, se llevó a cabo el ensayo de MTS observando que efectivamente las células continuaban siendo viables (*Figura 23*). Haciendo uso de esta técnica, también se podría haber realizado una comparación en cuanto al porcentaje de viabilidad celular de cada punto de rigidez a diferentes tiempos de cultivo, al correlacionar el valor de absorvancia a cada tiempo (por ejemplo 24 y 48 horas) y refiriéndolo a tiempo 0. Sin embargo, este experimento no fue realizado debido a que, independientemente de la rigidez, e incluso entre geles diferentes dentro del mismo punto de rigidez, el número final de células adheridas no puede ser controlado. Dicho esto, la medición de diferentes tiempos pierde relevancia al ser los geles tan variables. Por la misma razón el ensayo de MTS no resulta cuantitativo para evaluar si hay diferencias en la viabilidad celular en función de la rigidez del soporte de cultivo, sino que sólo permite determinar que las células son viables en todas las condiciones experimentales ensayadas, al momento de realizar los ensayos subsiguientes.

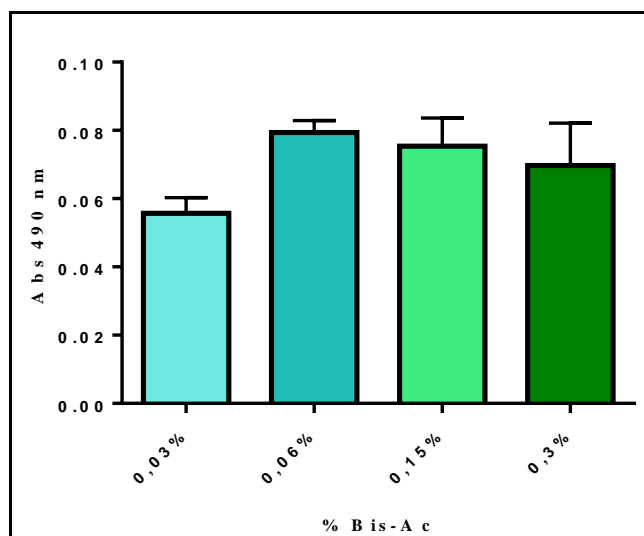


Figura 23. Evaluación de viabilidad celular por ensayo de MTS. El ensayo fue efectuado al segundo día de cultivo (48 horas) para corroborar que las células fueran viables al momento de proceder con la extracción de proteínas ó RNA. El gráfico fue confeccionado con el programa GraphPad.

Una de las maneras de evaluar nuestro diseño experimental, fue extraer proteínas totales de las células cultivadas sobre los diferentes geles y analizar la expresión de Actina y COX-2 mediante western blot. En los primeros ensayos, se determinó que la señal era muy débil para el gen control (Actina) y completamente ausente para COX-2 (*Figura 24*). Por ello, se resolvió aumentar la cantidad de células plaqueadas sobre los geles a los fines de incrementar la concentración de proteínas totales, manteniendo la relación 2:1 en geles blandos y geles duros respectivamente, pasando de 1×10^5 células/ml a $1,5 \times 10^5$ células/ml en los duros y de 2×10^5 células/ml a 3×10^5 células/ml en los blandos. Con el mismo objetivo, se modificó el esquema de toma de muestra (ver diagrama en *Anexo III*), extrayendo proteínas a partir de 3 hidrogel para cada punto de rigidez (pool de réplicas técnicas).

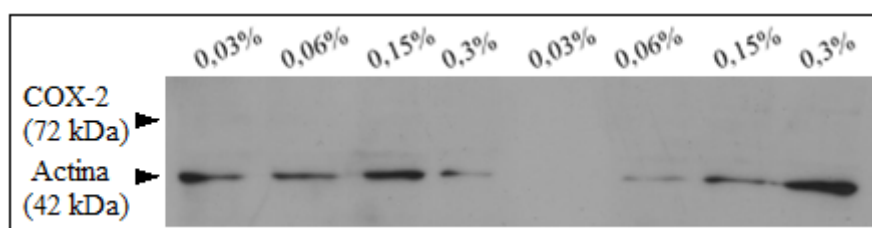


Figura 24. Primeras pruebas de Western Blot. Se puede observar que la señal de actina es débil después de 1 hora de exposición, mientras que la banda de COX-2 no está presente.

En conjunto, todas las modificaciones detalladas a lo largo de la sección dieron origen al protocolo que se fue usado finalmente para realizar los ensayos con sus respectivas replicas biológicas.

5.3. Caracterización de la rigidez de los hidrogeles: medición del Modulo de Young

Para caracterizar nuestro modelo experimental y conocer el rango de rigidez de los hidrogeles generados, se midió el módulo de Young de los mismos mediante *Microscopía de Fuerza Atómica* (AFM). En el marco de esta técnica de microscopía, se estableció una colaboración con el Dr. Leonardo Lizarraga del grupo de Biopolímeros del CIBION-CONICET quien tiene conocimientos y experticia en AFM así como acceso al equipamiento necesario.

Los estudios de indentación con AFM fueron realizados pasadas 24 horas desde la polimerización de los geles, para imitar las condiciones en que las células entran en contacto por primera vez con esos geles en el modelo experimental desarrollado, y acorde a la metodología publicada (Denisin and Pruitt, 2016). Los geles fueron polimerizados sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro, para cubrir las demandas de superficie del equipo, y fueron adheridos con cinta bifaz a la plataforma. Desde el momento de polimerización y durante las mediciones inclusive, los geles se mantuvieron hidratados en PBS 1X y se incubó al cantiléver en este sistema por 1 hora para estabilizarlo antes de obtener las mediciones. El microscopio utilizado fue *BrukerMultimode 8*, con controlador *Nanoscope V* (*Figura 25*) y un cantiléver de tipo *silicon-tip on nitride lever*, de forma cónica cuyo radio es de 15 nm.

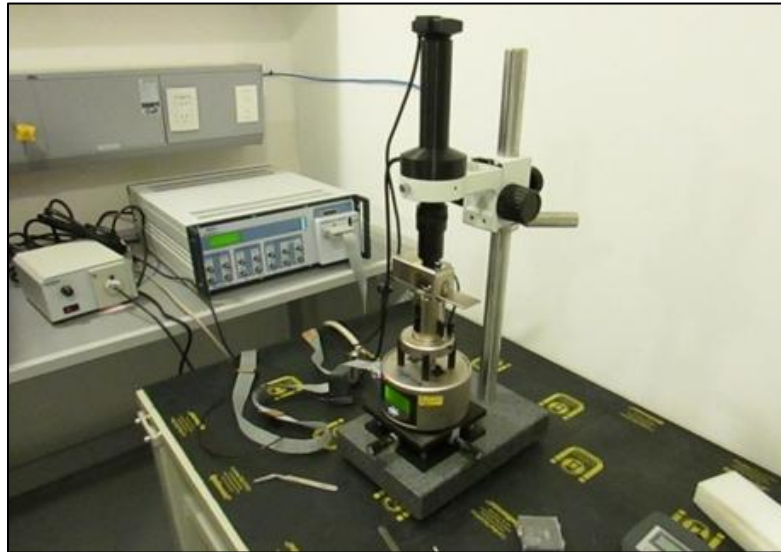


Figura 25. Microscopio Bruker multimode 8, controlador nanoscope V. Equipo utilizado para realizar las mediciones para caracterizar a los gels en términos del módulo de Young.

Se corroboró la constante final del cantiléver (0,03009 N/m) y luego se realizaron 5 indentaciones en 5 áreas del gel (25 indentaciones totales por muestra) a una velocidad de indentación de $3\mu\text{m}/\text{seg}$ (Denisin and Pruitt, 2016). Las curvas obtenidas fueron analizadas con el modelo de ajuste de *Sneddon* (modelo de ajuste con indentador cónico, determinado por el tip utilizado) y se utilizaron las curvas de acercamiento para determinar el Módulo de Young (Figura 26).

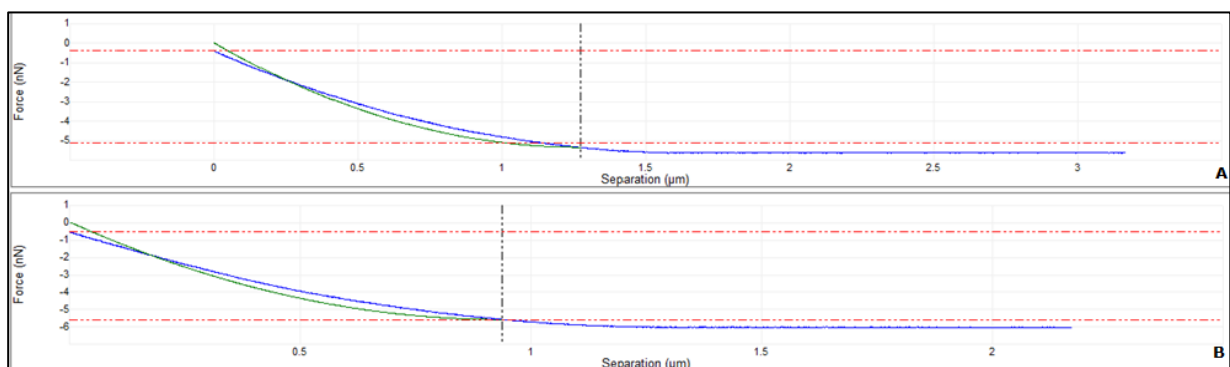


Figura 26. Curvas de acercamiento obtenidas por AFM. En el eje de las x se grafica la separación en μm y en el eje de las y, la fuerza en nN. Esto indica la fuerza ejercida por el cantiléver en función de cuánto indenta o ingresa al gel, lo cual está relacionado a la rigidez del sustrato. Con el modelo de ajuste de *Sneddon* se puede extrapolar el módulo de Young. El análisis de curvas fue realizado con el software NanoScopeAnalysis 1.5. En la figura se muestra 1 curva representativa de cada concentración, 0,15% (A) y 0,3% (B).

Por dificultades técnicas, sólo se pudieron obtener mediciones de los geles rígidos que corresponden a aquellos de 0,15% y 0,3% de Bis-acrilamida. Los geles blandos, dada su naturaleza “pegajosa” no se pudieron caracterizar (*Figura 27*), aún cambiando a otros tipos de cantiléver y otras formas de medición, dentro de las opciones disponibles en el laboratorio. Por ello, sólo se presentan los datos correspondientes a los geles rígidos.



Figura 27. Geles blandos. El gel de la imagen corresponde a un gel blando de 0,03% de crosslinker. Como se puede observar, el mismo ya está polimerizado pero al aspirar con la punta de un tip para pipetas p1000, se adhiere y por su naturaleza pegajosa, no se suelta fácilmente. Esto mismo sucede a escala nanométrica en AFM, por lo que si el cantiléver no se puede despegar adecuadamente, no se pueden obtener datos confiables para evaluar el módulo de Young. Esto sucede también para el gel de 0,06% aunque en menor medida, pero de todas maneras tampoco se pudieron obtener mediciones para este último.

Los datos obtenidos con el software pertinente fueron analizados estadísticamente con los programas Infostat y GrahPad. Se observa un mayor Módulo de Young en los geles de 0,3% de bis-acrilamida respecto de los geles con 0,15% (24,67 vs 16,34 kPa, Pvalor<0,0001) (*Figura 28*). Los sectores donde se efectuaron las mediciones fueron seleccionados al azar, por lo que no se puede determinar qué mediciones corresponden al centro o al borde del gel.

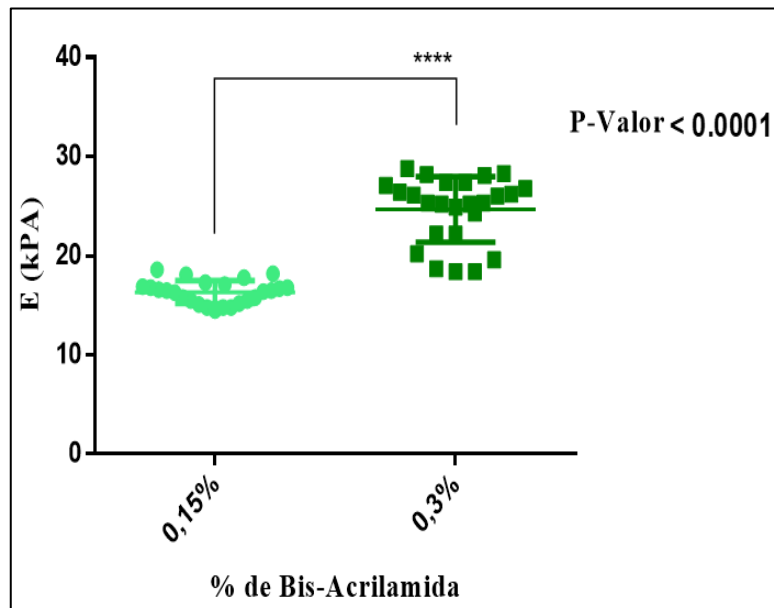


Figura 28. Módulo de Young (E) de cada gel. Se observan diferencias significativas entre la rigidez de ambas concentraciones (p -valor < 0,0001). Gráfico obtenido con el programa Graphpad al realizar una prueba T .

Recordemos que el protocolo de referencia (Cretu, Castagnino et al., 2010) en el que se basa este modelo reporta valores de E mayores a 20 kPa para los geles duros y menores a 3 kPa para los geles blandos. Al menos en las condiciones ensayadas, nuestro modelo experimental cumple con esas condiciones.

5.4. Diseño experimental definitivo

Luego de optimizar el modelo experimental se prosiguió con la evaluación de la morfología celular y la expresión de COX-2 en la línea celular 4T1 en función de la rigidez del sustrato. Se realizó el descongelamiento de 9 criotubos de células 4T1 (5 para ensayos de proteínas, 3 para ensayos de ARN y 1 para tinción). Al alcanzar una confluencia del 85-90%, se levantaron todas las placas en cultivo, se realizó el recuento en cámara de Neubauer y se dividieron en los 12 geles generados para cada ensayo, 3 de cada concentración, ubicados en placas MW6. La cantidad final de células plaqueadas corresponde a 3×10^5 células para geles duros y 6×10^5 células para geles blandos (esto equivale a las concentraciones detalladas anteriormente en 2 ml finales de medio por pocillo). A las 24 horas de cultivo se cambió el

medio y a las 48 horas se realizó la toma de fotografías a campo claro y la tinción de fluorescencia o la extracción de ARN o proteínas según corresponda (Figura 29).

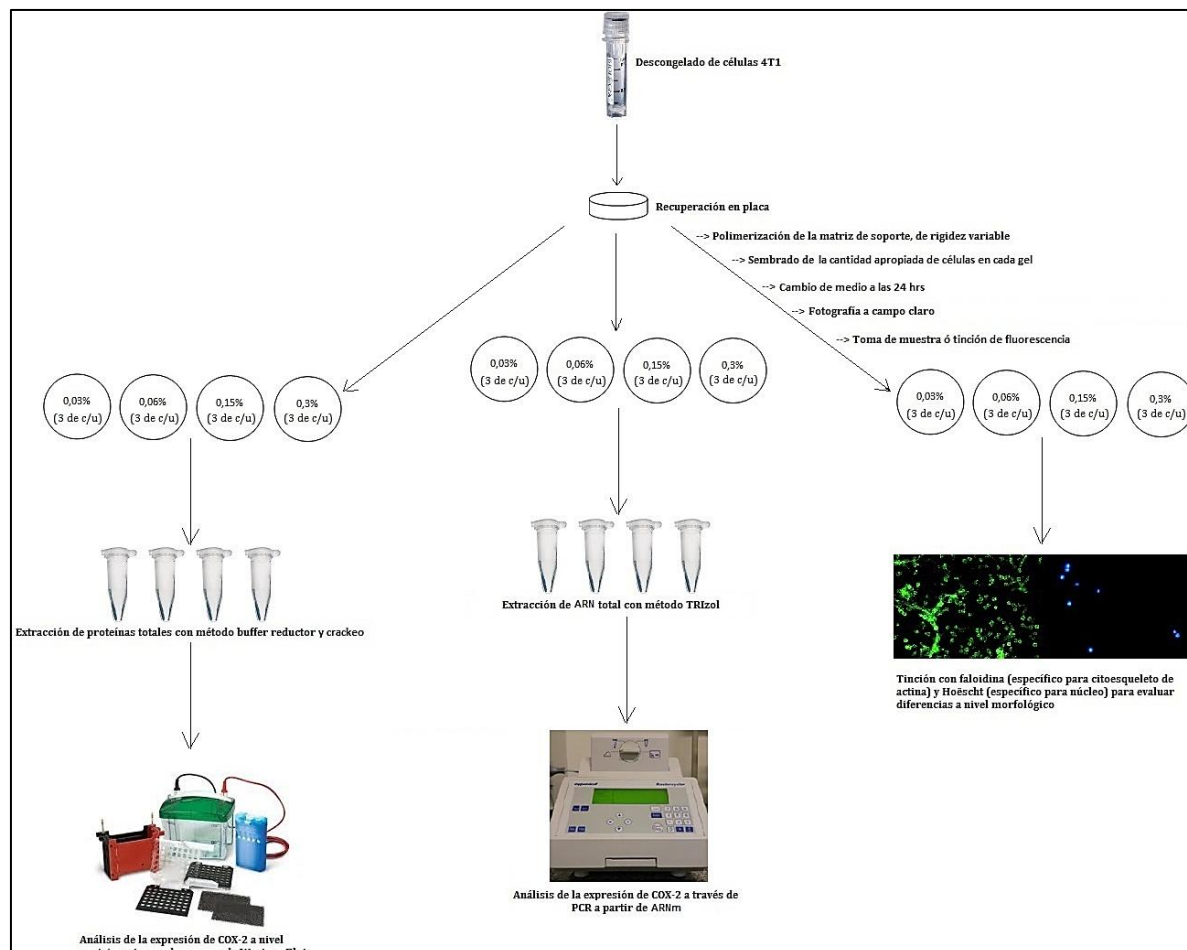


Figura 29. Esquema del diseño experimental. Cada criotubo de células 4T1 fue descongelado, amplificado y sembrado en cada gel. Luego de 48 horas se prosiguió con la observación de la morfología celular y la toma de muestra de proteína o ARN según corresponda.

5.4.1. Evaluación de la morfología celular

Pasadas las 48 horas en cultivo se evaluó la morfología celular mediante microscopía en campo claro. Se observó que las células cultivadas en los geles de 0,03% presentaban una forma bien redondeada, las células en los geles de 0,06% en su mayoría conservaban la forma redonda pero se empezaba a observar cierto grado de *spreading*, y finalmente en los dos geles definidos como duros (0,15% y 0,3%) casi la totalidad de las células estaba haciendo

spreading. Esto sugiere un cambio de morfología impulsado por la rigidez del sustrato circundante (Figura 30).

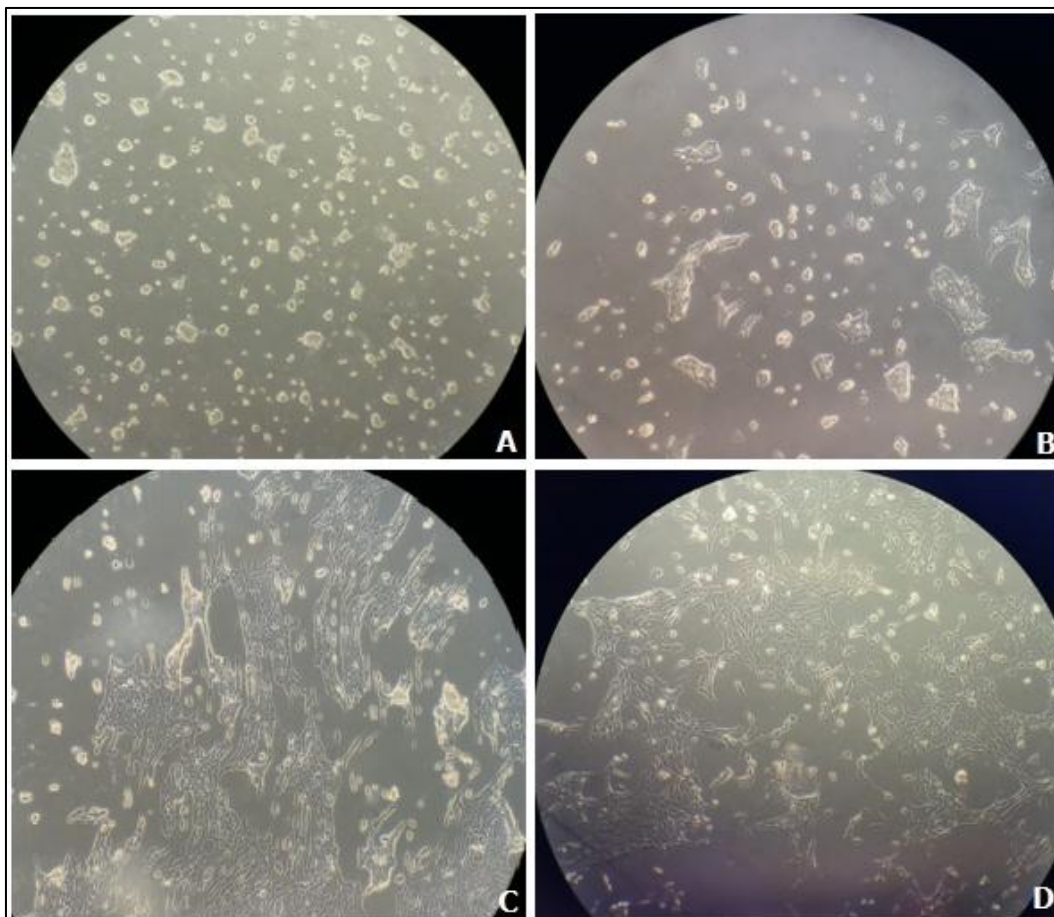


Figura 30. *Morfología de las células 4T1 plaqueadas en geles de diferente rigidez. Observación en microscopio invertido de las células en geles 0,03% (A), 0,06% (B), 0,15% (C) y 0,3% (D). Todas las imágenes fueron tomadas con un aumento de 100X en el centro de los vidrios dado que sobre los bordes hay irregularidades en los geles.*

Para una mejor caracterización de la morfología celular en función de la rigidez del soporte se realizaron tinciones de fluorescencia con faloidina y colorante Hoescht para observar las fibras de actina del citoesqueleto y correlacionar con la ubicación de los núcleos, respectivamente (Figura 31). Se puede observar que efectivamente, las células de los geles de 0,03% poseen forma redonda y sus fibras de actina parecen estar más compactas. En el gel de 0,06% se ve que conviven dos “poblaciones” de células, unas que conservan la forma redonda y otras cuyo citoesqueleto se ve más estirado; para finalmente encontrar que en los geles de 0,15% y 0,3% todas las células están perfectamente estiradas, con sus citoesqueletos

desplegados. Esto concuerda con la observación en campo claro y sugiere que los sustratos más rígidos inducen un cambio en la morfología celular y una mayor adhesión al soporte.

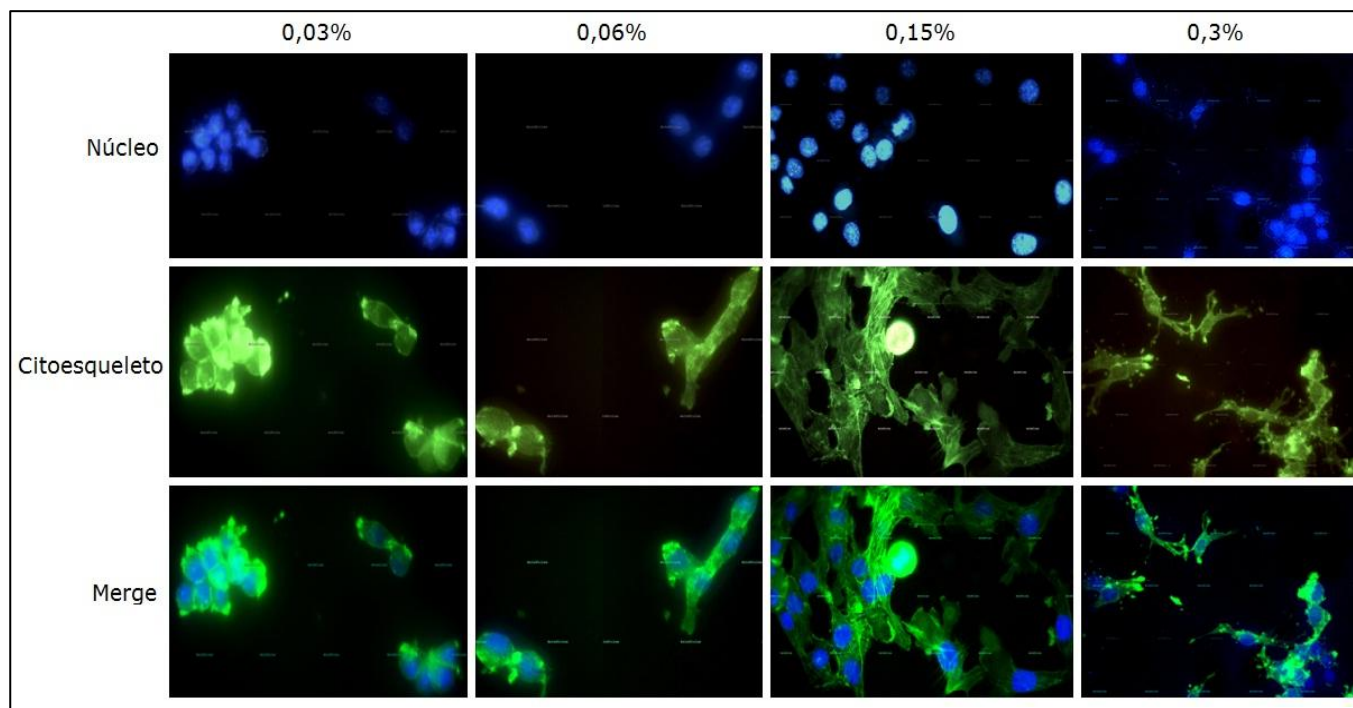


Figura 31. *La rigidez del soporte de cultivo induce cambios en la morfología. Tinción con colorante de Hoescht (azul, específico para núcleo) y faloidina (verde, específica para citoesqueleto de actina). Imágenes obtenidas con microscopio de fluorescencia con un aumento de 200X.*

5.4.2. Evaluación de la expresión de COX-2 a nivel de ARN: RT-PCR

Para evaluar el efecto de la rigidez del soporte en la expresión de COX-2 a nivel transcripcional, se propuso semi-cuantificar los niveles de ARNm de COX-2 de las células cultivadas en los hidrogeles de diferentes rigidez, mediante RT-PCR. Para ello, se extrajo ARN total con TRIzol, y a través de una retrotranscripción se generó ADN copia (ADNc), enriqueciendo la fracción de ARNm dado que se trabajó con oligo(dT)s. Antes de proseguir con la PCR punto final, se purificó el ADNc para asegurar que no hubiera posibles inhibidores de la reacción de amplificación. Tras la reacción, se reveló la presencia de productos de la reacción mediante electroforesis en gel de agarosa.

Un total de 12 muestras, correspondientes a 3 réplicas biológicas (n=3) con 4 puntos de rigidez (porcentaje de bis-acrilamida del hidrogel) por réplica, fueron evaluadas. Para cada una se ensayó HPRT como control interno (control de carga de la muestra) y COX-2, ambas por duplicado.

Nuestros resultados demuestran en primer lugar que la metodología propuesta permite amplificar los ADNc de COX-2 y HPRT en el modelo experimental desarrollado. Sin embargo, los resultados no fueron reproducibles no pudiendo por tanto semi-cuantificar los niveles de COX-2 (Figura 32).

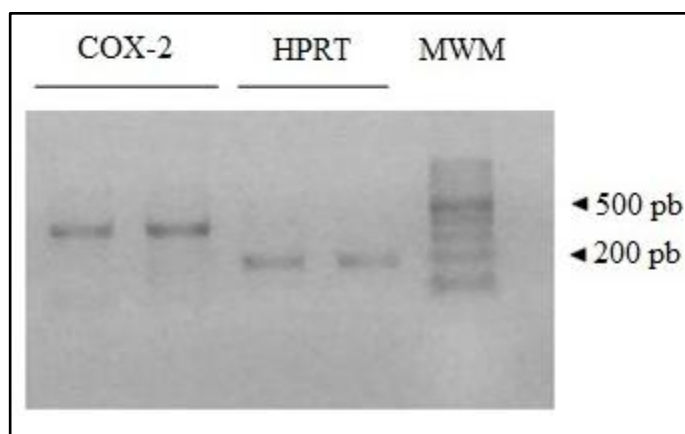


Figura 32. Gel de agarosa 2%. Resultados obtenidos luego de realizar una RT-PCR seguida de una PCR punto final, para los genes HPRT y COX-2 en una muestra cultivada en un gel 0,06%. Estos resultados no son representativos ya que para la mayoría de las muestras no se observaron bandas en el gel de agarosa, es decir que no amplificaron los ADNc.

5.4.3. Evaluación de la expresión de COX-2 a nivel proteico: Western Blot

Para evaluar el efecto de la rigidez del soporte en la expresión de COX-2 a nivel proteico, se cuantificaron los niveles de proteína de COX-2 de las células cultivadas en los hidrogeles mediante Western Blot, utilizando Actina como control de carga. Para esto, se extrajeron proteínas totales con el método del buffer reductor, crackearon y corrieron por SDS-PAGE para luego transferirlas a una membrana de nitrocelulosa sobre la cual realizar la inmunodetección de las proteínas de interés. A través de esta técnica, se obtuvieron las imágenes de los revelados de la inmunodetección mostrando la expresión de COX-2 y del gen

control, Actina. Estos resultados se generaron para cada una de las 5 réplicas del ensayo (n=5).

Como se puede observar en la *Figura 33*, no se mantiene el mismo comportamiento respecto a la expresión de COX-2 en las 5 réplicas, considerando que en algunas aumenta con la rigidez, mientras que en otras se observa lo contrario.

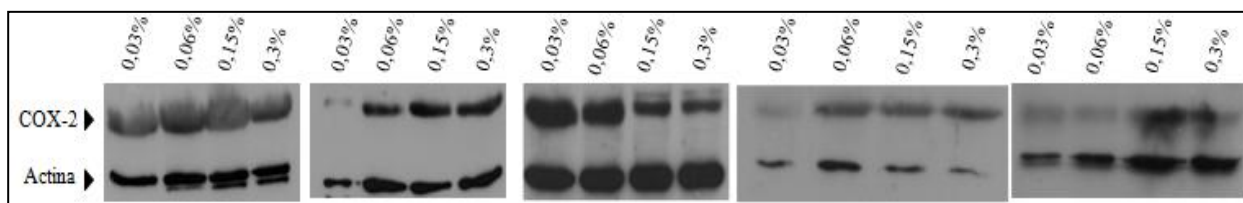


Figura 33. Inmunodetección de COX-2 en células 4T1 crecidas en hidrogeles de diferente concentración de bisacrilamida, que se correlacionarían con diferente rigidez.

En conclusión, la metodología utilizada permite la detección de COX-2 y Actina por Western Blot en el modelo experimental desarrollado. Sin embargo, parecería que la rigidez del sustrato, representada en este modelo por las distintas concentraciones de bis-acrilamida, no afecta la expresión de COX-2. Para corroborarlo hace falta un análisis estadístico pertinente que acompañe a lo observado en las réplicas biológicas. Estos resultados pueden deberse a la falta de reproducibilidad entre los ensayos.

5.5. Análisis estadístico de la expresión de COX-2 a nivel proteico

Para comparar si hubo variaciones significativas en la cantidad de COX-2 expresadas por las células cultivadas en los diferentes soportes se utilizó el programa ImageJ, con el cual se transformaron las imágenes en valores numéricos. La densidad óptica (DO) de las bandas de COX-2 fue relativizada a la DO de Actina, gen utilizado como control de carga de cada muestra.

La variable respuesta corresponde al valor de expresión de COX-2 y la variable explicatoria a la rigidez del soporte, la cual se puede clasificar en 4 grupos: 0,03%, 0,06%,

0,15% y 0,3%. Como ya mencionó, se trabajó con 5 réplicas biológicas (cada vial del stock de 4T1 pasaje 14 a 16).

En este estudio, el azar intervino cuando se plaquearon las células provenientes de una misma suspensión en forma aleatoria en cada uno de los 12 hidrogel de diferente rigidez para cada réplica. Además, se intentó controlar el error haciendo que cada hidrogel tenga la misma cantidad de células, según corresponda de acuerdo a la concentración de bis-acrilamida, y que los mismos sean homogéneos entre sí, es decir que a partir de una única solución de cada punto de rigidez se polimerizaron los 3 geles correspondientes.

Dado que la variable no presenta una distribución normal (datos no mostrados), se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor no paramétrico, o test de Kruskal Wallis, y posteriormente una comparación múltiple o test de Tukey entre todos los grupos.

El análisis estadístico arrojó que no hubo diferencias significativas en la expresión de COX-2 entre los grupos evaluados (Figura 34), p-valor > 0,05. Sin embargo, se observa una tendencia al incremento de COX-2 en 0,15% y 0,3% correspondiendo a los geles de mayor rigidez, respecto a 0,03 y 0,06%.

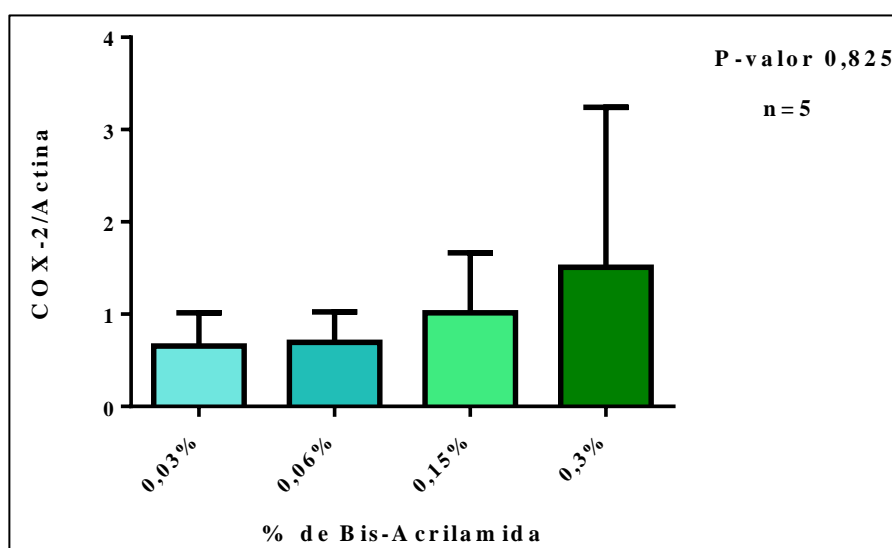


Figura 34. No se observan diferencias significativas en la expresión de COX-2 en las células 4T1 crecidas en geles de diferente rigidez (p-valor > 0,05).

5.6. Producción final

En el marco del otorgamiento del subsidio ACyT A15T19, se elaboraron 8 Procedimientos Operativos Estándar (POEs) a partir de las técnicas desarrolladas y puestas a punto en el desarrollo del trabajo, como parte de la producción científica del proyecto. Este material quedará a disposición para uso futuro del alumnado de la Universidad, así como también de grupos de investigación (ver *Anexo II*).

6. DISCUSIÓN

La progresión del cáncer de mama depende no sólo de las características genéticas intrínsecas de las células malignas sino también de la interacción de las mismas con las células del tejido conectivo y con la matriz extracelular asociada. En efecto, el incremento de la rigidez de la matriz extracelular, debido a cambios en su composición y estructura que la tornan más densa y rígida, ha demostrado ser clave en el desarrollo de tumores mamarios (Schedin, P. and Keely, P., 2011). Estas alteraciones son interpretadas por las células tumorales, las cuáles responden con cambios específicos de la expresión génica a través de “mecanotransducción” de señales. Por otra parte, una gran proporción de tumores de mama de pacientes (hasta 84% en algunos estudios) sobreexpresan COX-2 y su expresión está asociada a un alto grado de indiferenciación histológica, alto riesgo de metástasis y menor supervivencia (Assoian, R.K. and E.A. Klein, 2008). Se ha reportado que la enzima COX-2 es regulada transcripcionalmente por cambios en la rigidez de la matriz (Shi, X.Z., et al., 2011; Li, F., et al., 2012). Sin embargo, hasta el momento no existe ninguna evidencia de este tipo de regulación en cáncer de mama, contexto patológico en el cual COX-2 tiene un rol fundamental. Teniendo en consideración estas evidencias se propuso como objetivo general evaluar el efecto de la rigidez de la matriz extracelular sobre la expresión de la enzima COX-2 en células tumorales de cáncer de mama bajo la siguiente hipótesis de trabajo: “La rigidez de la matriz induce la expresión de la enzima COX-2 en células tumorales de cáncer de mama”.

Para llevar a cabo este trabajo, tras una búsqueda exhaustiva de bibliografía, se optó por utilizar hidrogeles de poliacrilamida como modelo experimental para reconstruir la MEC a la que están expuestas las células. Estos constituyen un enfoque efectivo para ensayar la influencia de la rigidez sobre el comportamiento celular en el marco de la mecanotransducción (Yeung, Georges et al., 2004; Paszek, Zahir et al., 2005; Klein, Yung et al., 2007; Klein, Yin et al., 2009) y cuentan con numerosas ventajas, entre las que destacan su fácil preparación y manipulación, la baja infraestructura necesaria para trabajar con ellos y la posibilidad de alcanzar diferentes puntos de rigidez simplemente variando el porcentaje de bis-acrilamida, dentro de cierto rango de trabajo, para evitar alcanzar el punto de inflexión de los hidrogeles que fue explicado con anterioridad.

A lo largo de este trabajo se ha descrito la optimización dicho modelo experimental en los laboratorios de UADE, evaluando diferentes puntos de rigidez, tiempos de cultivo y métodos de polimerización de los hidrogeles. De esta manera se ajustaron algunos parámetros clave en el protocolo con el objetivo de obtener un modelo robusto y reproducible.

Sin embargo, el modelo presenta debilidades que deben ser consideradas y estudiadas para poder hacer de este un modelo con menores limitaciones y reproducible entre ensayos.

Una de las principales debilidades está asociada con la solución de NHS. Este reactivo, cumple un rol clave en cuanto a la capacidad de adherencia de las células al hidrogel y por tanto el ensayo de la rigidez ofrecida por dicho soporte, al participar en el entrecruzamiento del hidrogel con la proteína de la MEC, en este caso colágeno. Como se ha mencionado previamente, no hemos logrado obtener una solución de NHS con las características mencionadas por Cretu y colaboradores, habiendo probado diferentes solventes y condiciones de preparación (Cretu, Castagnino et al., 2010). En base a esto, nos hemos planteado el interrogante de si el NHS cubre en forma homogénea y completa la superficie del hidrogel permitiendo el posterior recubrimiento con colágeno en forma uniforme a lo largo del mismo; y consecuentemente la adhesión de las células. En este sentido, hemos corroborado la unión del NHS sobre los hidrogeles y su relevancia en la adhesión celular a los mismos al preparar simultáneamente hidrogeles con NHS y sin NHS, incubándolos con colágeno y luego plaqueando un mismo número de células sobre ambos. Tras esto, se observó adhesión celular sólo sobre el hidrogel con NHS, y cúmulos de agregados celulares en suspensión sobre el otro (dato no mostrado). Sin embargo, no podemos garantizar que el NHS cubra la totalidad de la superficie siendo una variable que no podemos controlar entre replicas. Algunos grupos de investigación reportan el uso de Sulfo-SANPAH en lugar de NHS (Syed, Karadaghy et al., 2015) como entrecruzador entre el hidrogel y la proteína de la MEC de interés. El Sulfo-SANPAH es soluble en agua, mientras que el NHS únicamente en solventes orgánicos. Probablemente el uso de una solución acuosa, de la misma naturaleza que la solución de los geles, podría mejorar la interacción de ambas partes y por tanto mejorar el acceso del reactivo en el entramado del gel, para luego lograr una óptima funcionalización con colágeno. Estos inconvenientes no se han podido prever ya que los grupos que trabajaron con NHS no manifestaron haber tenido problemas (Cretu, Castagnino et al., 2010; Wang,

Y. and Discher, D.). Luego, no contábamos con los recursos económicos necesarios para adquirir Sulfo-SANPAH y evaluar que sucedía con el cambio de reactivo en cuanto a la reproducibilidad del modelo entre replicas. Por tanto, lo consideramos un cambio prioritario y sumamente interesante para introducir en el modelo con vistas a optimizarlo.

Para una caracterización del modelo se determinó, mediante microscopia de fuerza atómica, que el módulo elástico de los geles de 0,15% y 0,3% incrementa en forma no lineal con la concentración de bis-acrilamida, de modo que constituyen un modelo experimental óptimo para la evaluación de los efectos de la rigidez del soporte sobre las células *in vitro*. Si bien no se cuenta con la información del Módulo de Young para todas las concentraciones ensayadas, el hecho de que haya un cambio en la consistencia de los hidrogeles blandos, 0,03% y 0,06%, en comparación con los hidrogeles rígidos, 0,15% y 0,3%, hace suponer que la rigidez de los primeros podría ser menor, aunque dicha hipótesis requiere validación experimental.

En el protocolo de referencia se define a los geles duros como aquellos cuyo módulo de Young supera los 20 kPa, aunque esto no es comprobado experimentalmente (Cretu, Castagnino et al., 2010). En otro trabajo en el que utilizan los mismos hidrogeles, los caracterizan por su Módulo de Shear, el cual se encuentra entre 0,7 y 9 kPa para los geles de 0,03 y 0,3%, respectivamente (Klein, Yung et al., 2007). Teniendo en cuenta que el módulo de Young equivale a 3 veces el módulo de Shear (Yeung, Georges et al., 2004), se extrae que los geles blandos poseen un módulo de Young de 2,1 kPa mientras que los rígidos de 27 kPa. No se han encontrado otros trabajos en los que caractericen por microscopía de fuerza atómica los mismos hidrogeles que empleamos, aunque cabe mencionar que esta técnica es utilizada bajo otros enfoques experimentales, como por ejemplo en el trabajo de Acerbi y colaboradores, donde utilizan muestras de tejido de pacientes y observan que el estroma normal se caracteriza por un módulo de Young de aproximadamente 0,4 kPa en comparación con las lesiones invasivas de los subtipos más agresivos (Her2+ y Triple Negativo) en donde las mediciones superan los 5kPa (Acerbi, Cassereau et al., 2015).

En conjunto, los valores de Modulo de Young obtenidos en nuestros ensayos coinciden con lo reportado en otro trabajos, por lo menos para los geles duros (0,15% y 0,3%). Asimismo, estos valores se enmarcan dentro de lo esperado para un tejido mamario en

condiciones patológicas. No se debe perder de vista la variabilidad en los valores de estas mediciones según el enfoque planteado por cada autor para realizarlas, hecho mencionado en secciones anteriores y que ha sido materia de análisis (Ramiao, Martins et al., 2016).

Una vez optimizado el modelo experimental y considerando las limitaciones técnicas del mismo, evaluamos la expresión de COX-2 en células 4T1 cultivadas sobre geles de 0,03%, 0,06%, 0,15% y 0,3%. Esta línea celular se ha elegido en base a que representa muy bien a la enfermedad y es ampliamente utilizada para el estudio de dicha patología, así como también se ha reportado su uso para el estudio de eventos de mecanotransducción en cáncer de mama (Taylor, M. et al., 2011).

A nivel transcripcional, se evaluó la expresión de COX-2 mediante la técnica de retrotranscripción seguida de PCR punto final. Hemos podido establecer un protocolo de extracción de ARN total utilizando TRIzol y logramos obtener ADNc a partir del mismo a través de una retrotranscripción. Sólo se corroboró el rendimiento de la extracción de todas las muestras por espectrofotometría (datos no mostrados); no se llevaron a cabo ensayos que permitan evaluar la calidad de las mismas. Sólo de pocas muestras se ha logrado la amplificación de fragmentos de COX-2 y HPRT (gen utilizado como control) en la PCR. Consideramos que esto se debe a la falta de reproducibilidad en las condiciones de cultivo, impactando en los rendimientos de ARN que, como se mencionó previamente, fueron variables. Esto puede afectar a la calidad y a la obtención de ADNc que pueda servir de molde para la subsiguiente PCR, sumado a problemas en la conservación de estas muestras debido al desperfecto técnico que sufrió el ultrafreezer de los laboratorios de UADE. En resumen, la metodología propuesta permite detectar COX-2 y HPRT, pero las diferencias en la expresión no se han podido cuantificar por problemas de variabilidad entre las muestras tomadas, lo cual habla de las limitaciones del modelo experimental más que de la técnica elegida para responder a este objetivo.

Luego a nivel proteico se evaluó la expresión de COX-2 a partir de extractos de proteínas totales mediante la técnica de Western Blot. En este sentido, se ha optimizado la obtención de la muestra a partir de las células crecidas sobre los geles de diferente rigidez, y su posterior análisis, logrando ver señal en todas las muestras tanto de COX-2 como de Actina (proteína utilizada para control de carga y normalización de la expresión). Sin embargo, no se

ha obtenido el mismo patrón de expresión entre las réplicas biológicas, siendo que en algunas la expresión de COX-2 aumenta con la rigidez del soporte pero en otras sucede lo contrario. Esto denota nuevamente la gran variabilidad del modelo propuesto entre réplicas. En resumen, logramos poner a punto la técnica de Western Blot y extracción de proteínas, realizar comparaciones cuantitativas y un análisis estadístico que respalda lo observado.

De esta manera, como se expuso en la sección de resultados, **no se observaron diferencias significativas** entre los soportes de rigidez variable en cuanto a la expresión de la enzima COX-2 para la línea celular de adenocarcinoma mamario murino 4T1, contrario a lo que se esperaba en este trabajo.

Diversos autores han empleado modelos de cultivo tridimensionales conocidos como esferoides, con una línea de epitelio mamario normal (MCF-10A), cultivada sobre matrices de densidad variable de colágeno. Se ha observado que una mayor rigidez de ese soporte indujo cambios en la morfología, pérdida de organización, mayor formación de adhesiones focales, proliferación, invasión y metástasis (Rubashkin et al., 2014; Paszek et al., 2005), además de sobreexpresión de quinasas como FAK y ERK (Provenzano, Inman et al., 2009). Estas dos proteínas participan en la vía de señalización de las MAPK, quien tiene un rol importante en la inducción de la expresión de COX-2 al activar diversos factores de transcripción (Tsatsanis, Androulidaki et al., 2006; Shi et al., 2011; Li et al., 2012). Teniendo en cuenta esto, sumado a la gran proporción de tumores de mama que sobreexpresan COX-2 (Ristimaki et al., 2002), que el aumento de la densidad del tejido mamario es un factor de riesgo para el desarrollo y la progresión del cáncer de mama (Provenzano, Inman et al., 2009), y que la expresión de COX-2 se asocia con eventos de mecanotransducción en fibroblastos y células de músculo liso intestinal (Shi, X.Z., et al., 2011; Li, F., et al., 2012), no podemos descartar totalmente el rol de la mecanotransducción sobre la expresión de COX-2 en cáncer de mama. Más bien podemos replantear las fortalezas y debilidades del modelo biológico y experimental utilizado, para mejorarlo y lograr que se asemeje más a la situación patológica real.

Un aspecto interesante para el desarrollo en trabajos de investigación futuros es explorar en detalle el rol de la densidad del colágeno. La transformación maligna se caracteriza por una deposición y remodelación progresiva de colágeno de tipo I hacia fibras más gruesas y dispuestas de manera lineal (Acerbi, Cassereau et al., 2015). Por otro lado,

Esbona y col. utilizaron ratones transgénicos que expresan metaloproteasas defectuosas, lo cual finalmente confiere una mayor deposición de colágeno, y observaron que los tumores generados eran de mayor tamaño y sobreexpresaban COX-2 (Esbona et al., 2016). Una mayor deposición de colágeno tiene como efecto final un aumento en la rigidez de la MEC. Si bien esto es lo que se intenta recrear con el uso de los hidrogeles, quizás aumentar progresivamente la cantidad de colágeno en la superficie de los mismos puede complementar el modelo.

Las diferencias encontradas entre nuestros resultados y los obtenidos previamente por los grupos mencionados podrían ser explicadas también por las limitaciones propias del cultivo en monocapa. Aunque ampliamente utilizado, no llega a imitar fielmente las condiciones en que se encuentran las células en su ambiente normal. El acceso a los nutrientes y factores del medio, el intercambio gaseoso y las tensiones inter-celulares son muy distintas *in vivo*. Centrándonos específicamente en este último punto, si bien los hidrogeles aportan matrices de diferente rigidez, las fuerzas que experimentan las células en este modelo provienen de la matriz y las células adyacentes en un solo plano, perdiendo el efecto multidireccional que ocurre *in vivo*. Nuestros resultados destacan una vez más la importancia de estudiar el comportamiento de las células en microambientes tridimensionales que presentan mayor relevancia fisiológica. También cabe mencionar que en este trabajo hemos evaluado una única línea celular de cáncer de mama, la cual ha demostrado remedar la enfermedad humana en términos de agresividad y capacidad metastásica (Aslakson and Miller, 1992; Taylor, M. et al, 2011). Sin embargo, creemos importante utilizar nuestro modelo experimental con otras líneas celulares, derivadas de tejido mamario normal y/o de cáncer de mama a los fines de verificar si el efecto observado es general o exclusivo de 4T1. Por ejemplo se podría utilizar la línea celular MDA-MB-231, derivada de cáncer de mama triple negativo, y la línea MCF10A que corresponde a tejido epitelial de la glándula mamaria normal, con el propósito de ver la respuesta de estas líneas a la rigidez del entorno y compararlo con el comportamiento observado para la línea utilizada en el presente trabajo. Estas líneas ya fueron utilizadas en estudios de mecanotransducción, aunque sólo en modelos tridimensionales (Provenzano, Inman et al., 2009). Además de evaluar la expresión de COX-2, en estas líneas y en el modelo experimental propuesto, sería interesante analizar si la rigidez puede en sí misma ser un factor que induzca la transformación maligna de la línea MCF10A y genere un fenotipo aún más agresivo en la línea MDA-MB-231.

En resumen, teniendo en cuenta numerosas evidencias, como ya se mencionó y explicó en varias oportunidades a lo largo del cuerpo del trabajo, que vinculan al cáncer de mama con la expresión de COX-2 y que la expresión de esta última ha sido reportada como un evento producto de la mecanotransducción de señales, no habiendo antecedentes de este tipo de regulación en cáncer de mama (donde tiene un rol importante), este trabajo propuso la hipótesis de que la expresión de COX-2 está regulada por la rigidez de matriz en células tumorales de cáncer de mama. Para ello, se planteó el cultivo de células derivadas de adenocarcinoma de mama murino (4T1) sobre un modelo de hidrogeles de rigidez variable que imiten los diferentes escenarios posibles en términos de dureza del tejido, con el objetivo de evaluar la expresión de COX-2 a nivel transcripcional y proteico. Se logró la optimización del modelo con ciertas limitaciones, ya que los inconvenientes con la solución de NHS impactan en su reproducibilidad. De todos modos, se caracterizaron parcialmente por microscopía de fuerza atómica, demostrando que es un enfoque óptimo para evaluar el efecto de la rigidez del soporte al observarse un aumento de la rigidez con la concentración de bis-acrilamida. Se pudieron definir dos técnicas exitosas para la detección de COX-2, la retrotranscripción seguida de PCR punto final del ARNm y el Western Blot para la proteína. Para la primera técnica, no se pudieron establecer comparaciones cuantitativas. Para el Western Blot, esto sí fue posible aunque no se observaron diferencias significativas en la expresión de COX-2 entre soportes de diferente rigidez. Entendemos que estos resultados no deben *a priori* desestimar la hipótesis propuesta, sino que deben ser comprendidos en el contexto de las limitaciones del modelo, principalmente por su falta de reproducibilidad así como también tener en cuenta que los cultivos tridimensionales y los ensayos *in vivo* aportan una mayor relevancia fisiológica que los cultivos en monocapa pudiendo no estar controlando otras variables que afectan a los eventos de mecanotransducción. Se plantean nuevas propuestas a ensayar que pueden enriquecer el modelo, como ser el uso de Sulfo-SANPAH en lugar de NHS como entrecruzador, explorar en mayor profundidad el rol del colágeno e incorporar otras líneas celulares. En líneas generales se optimizó un modelo *in vitro* para el estudio de la influencia de la rigidez de la matriz sobre el comportamiento celular, siendo este el primer antecedente en el área de mecanostraducción en UADELabs; aportando por tanto, las bases para futuras líneas de investigación en esta materia en los laboratorio de la universidad.

7. CONCLUSION

A lo largo de la realización de esta tesis:

- Se logró optimizar el cultivo de la línea celular 4T1, generando de este modo un nuevo modelo biológico disponible para actividades de docencia e investigación en UADELabs,
- Se generaron soportes de cultivo celular alternativos a las placas de poliestireno convencionales, los cuales presentan mayor relevancia fisiológica en términos de valores de rigidez. Los mismos también quedarán a disposición para tareas de docencia e investigación en UADELabs,
- Se evaluó la expresión de COX-2 y Actina mediante RT-PCR y Western Blot,
- En nuestro modelo experimental y en las condiciones ensayadas la expresión de COX-2 en las células 4T1 de cáncer de mama no parece ser afectada por la rigidez del soporte de cultivo, aunque este resultado necesita de mayor evidencia empírica.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Acerbi, I., et al., *Human breast cancer invasion and aggression correlates with ECM stiffening and immune cell infiltration*. Integr. Biol., 2015. **7**: p. 1120-1134.
- Alberts, B., et al., *Biología Molecular de la célula*. Quinta edición ed. 2008. 608.
- Ali, S. and C. Coombes, *Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**: p. 101-112.
- Aslakson, C.J. and F.R. Miller, *Selective Events in the Metastatic Process Defined by Analysis of the Sequential Dissemination of Subpopulations of a Mouse Mammary Tumor*. Cancer Res., 1992. **52**(6): p. 1399-1405.
- Assoian, R. and Klein, E. *Growth Control by Intracellular Tension and Extracellular Stiffness*, Cell Press, 2008, 347–52 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2008.05.002>>.
- Bao, G. and S. Suresh, *Cell and molecular mechanics of biological materials* Nature Materials, 2003. **2**: p. 715-725.
- Bianchi, M, (2016) *Mecanotransducción celular. Correlación entre las propiedades mecánicas y la organización dinámica de proteínas de adhesión focal en células vivas*. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- BIO-RAD, *Manual de instrucciones de Mini-PROTEAN® Tetra Cell*. .
- BIO-RAD, *Manual de instrucciones de Mini-Trans Blot Cell*.
- Bosman, F.T. and I. Stamenkovic, *Functional structure and composition of the extracellular matrix*. J. Pathol, 2003. **200**: p. 423-428.
- Brandley, B.K., O.A. Weisz, and R.L. Schnaar, *Cell attachment and long-term growth on derivatizable polyacrilamide surfaces*. J Biol Chem., 1987. **262**(13): p. 6431-6437.
- Burnet, M. and B.m.j. 1957;1:779-86, *Cancer: a biological approach. I. The processes of control*. British Medical Journal, 1957. **1**: p. 779-786.
- Butcher, D.T., T. Alliston, and V.M. Weaver, *A tense situation: forcing tumor progression*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(2): p. 108-122.
- Chang, S.H. and e. al., *Role of prostaglandin E2-dependent angiogenic switch in cyclooxygenase 2-induced breast cancer progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(2): p. 591-596.
- Chang, S.H. and e. al., *The prostaglandin E2 receptor EP2 is required for cyclooxygenase 2-mediated mammary hyperplasia*. Cancer Res., 2005. **65**(11): p. 4496-4499.

Chen, E.P. and E.M. Smyth, *COX-2 and PGE₂-dependent immunomodulation in breast cancer*. Prostaglandins other lipid mediat., 2011. **96**: p. 14-20.

Condeelis, J. and J.E. Segall, *Intravital imaging of cell movement in tumours*. . Nat Rev Cancer, 2003. **3**: p. 921-930.

Cox, T.R. and J.T. Erler, *Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer*. Dis Model Mech, 2011. **4(2)**: p. 165-178.

Cretu, A., P. Castagnino, and R. Assoian, *Studying the effects of matrix stiffness on cellular function using Acrylamide-based hydrogels*. JoVE, 2010. **42**.

Denisin, A.K. and B.L. Pruitt, *Tuning the range of polyacrylamide gel stiffness for mechanobiology applications*. ACS Applied Materials & Interfaces 2016. **8(34)**: p. 21893-21902.

Dixon, A.D., *Dysregulated Post-Transcriptional control of COX-2 gene expression in cancer*. Current pharmaceutical design 2004. **10**: p. 635-646.

Erler, J.T. and V.M. Weaver, *Three-dimensional context regulation of metastasis*. Clin Exp Metastasis. , 2009. **26(1)**: p. 35-49.

Eroles, P., et al., *Molecular Biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways*. Cancer treatment reviews, 2012. **38**: p. 698-707.

Esbona et al., '*COX-2 Modulates Mammary Tumor Progression in Response to Collagen Density*', Breast Cancer Research, 2016, 1–15 <<http://dx.doi.org/10.1186/s13058-016-0695-3>>.

Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBCAN 2012*. Int. J. Cancer, 2015. **136(5)**: p. E359-E386.

Frantz, C., K.M. Stewart, and V.M. Weaver, *The extracellular matrix at a glance*. J. Cell Sci., 2010. **123 (24)**: p. 4195-4200.

Freshney, I.R., *Culture of Animal Cells: A manual of basic technique*. 2005, Wiley-Liss Pearson New Jersey. p. 1-11.

Garavito, R.M. and D.L. De witt, *The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins*. Biochimia et Biophysica Acta, 1999. **1441**: p. 278-287.

Greenhough, A., et al., *The COX-2/PGE₂ pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment*. Carcinogenesis, 2009. **30(3)**: p. 377-386.

Gupta, G.P., et al., *Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in*

lung metastasis. Nature, 2007. **446**: p. 765-770.

Haggard, H.W. and G.M. Smith, *Johannes Müller and the Modern Conception of Cancer*. Yale J Biol Med, 1938. **10(5)**: p. 419.b1-436.

Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**: p. 646-674.

Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**: p. 57-70.

Handorf, A.M., et al., *Tissue stiffness dictates development, homeostasis, and disease progression*. Organogenesis, 2015. **11(1)**: p. 1-15.

Harper, K.A. and A.J. Tyson-Capper, *Complexity of COX-2 gene regulation*. Biochem. Soc. Trans., 2008. **36**: p. 543-545.

Harris, R.E., *Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung*. Inflammopharmacology 2009. **17(2)**: p. 55-67.

Hinz, B. and K. Brune, *Cyclooxygenase-2-10 years later*. JPET, 2002. **300**: p. 367-375.

Howe, L.R., *Inflammation and Breast cancer. Cyclooxygenase/prostaglandin signaling and breast cancer*. Breast cancer research 2007. **9**: p. 210-218.

Howlander N, N.A., Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds), SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/, based on November 2014 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2015

Hu, M. and e. al., *Role of COX-2 in epithelial-stromal cell interactions and progression of ductal carcinoma in situ of the breast*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106(9)**: p. 3372-3377.

Hytonen, V.P. and B. Wehrle-Haller, *Mechanosensing in cell-matrix adhesions- Converting tension into chemical signals*. Exp Cell Res., 2016. **343(1)**: p. 35-41.

I.A.R.C., *World Cancer Report 2014*. Lyon, Fance: IARC, 2014.

Insua-Rodriguez, J. and Oskarsson, T., *The extracelular matrix in breast cancer*. Adv. Drug Deliv. Rev, 2015. 97:41-55.

Kang, Y.J., et al., *Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation*. Progress in Lipis Research, 2007, p. 108 - 125

Kass, L., et al., *Mammary epithelial cell: influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis*. Int. J. Biochem. Cell Biol., 2007. **39(11)**: p. 1987-1994.

Kawamori, T. and e. al., *Chemopreventive effects of ONO-8711, a selective prostaglandin E receptor EP(1) antagonist, on breast cancer development*. Carcinogenesis, 2001. **22(12)**: p. 2001-2004.

Klein, E.A., et al., *Cell adhesion, cellular tension, and cell cycle control*. Methods Enzymol., 2007. **426**: p. 155-175.

Klein, E.A., et al., *Cell-cycle control by physiological matrix elasticity and in vivo tissue stiffening*. Curr Biol., 2009. **19(18)**: p. 1511-1518.

Kumar, S. and V.M. Weaver, *Mechanics, malignancy, and metastasis: The force journey of a tumor cell*. Cancer Metastasis Rev., 2009. **28(1-2)**: p. 113-127.

Li, F. and e. al., *Cellular mechanism of mechanotranscription in colonic smooth muscle cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012. **303(5)**: p. G646-656.

Minn, A.J. and e. al., *Genes that mediate breast cancer metastasis to lung*. Nature, 2005. **436(7050)**: p. 518-524.

Nelson, C.M. and M.J. Bissell, *Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer*. Annu Rev Cell Dev Biol., 2006. **22**: p. 287-309.

Nguyen, D.X., P.D. Bos, and J. Massague, *Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**: p. 274-284.

Nowell, P.C., *The clonal evolution of tumor cell population*. Science, 1976. **194**: p. 23-28.

Nunez, F., et al., *Wnt/beta-catenin signaling enhances cyclooxygenase-2 (COX2) transcriptional activity in gastric cancer cells*. PLoS One, 2011. **6**: p. e18562.

Obermajer, N. and e. al., *PGE (2)-driven induction and maintenance of cancer-associated myeloid-derived suppressor cells*. Immuno. Invest., 2012. **41(6-7)**: p. 635-657.

Paszek, M.J. and V.M. Weaver, *The tension mounts: mechanics meets morphogenesis and malignancy*. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia, 2004. **9**: p. 325-342.

Paszek, M.J., et al., *Tensional homeostasis and the malignant phenotype*. Cancer Cell, 2005. **8**: p. 241-254.

Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**: p. 747-752.

Provenzano, P.P., et al., *Matrix density-induced mechanoregulation of breast cell phenotype, signaling and gene expression through a FAK-ERK linkage.* . *Oncogene*, 2009. **28(49)**: p. 4326-4343.

Pulaski BA, *Ostrand-Rosenberg S Mouse 4T1 breast tumor model Coligan JE Kruisbeek AM Margulies DHet al eds. Current protocols in immunology 2003 20.2.1 John Wiley and Sons, Inc New York)*

Ramiao, N.G., et al., *Biomechanical properties of breast tissue, a state-of-the-art review.* *Biochem Model Mechanobiol*, 2016. **15(5)**: p. 1307-1323.

Reinhart-King, C.A., M. Dembo, and D.A. Hammer, *Endothelial cell traction forces on RGD-derivatized polyacrylamide substrata.* . *Langmuir*, 2003. **19**: p. 1573–1579.

Reinvanbark, A.G., S.M. O'Connor, and W.B. Coleman, *Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine.* *The American Journal of Pathology*, 2013. **183(4)**: p. 1113-1124.

Ristimaki, A. and e. al., *Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer.* *Cancer Res.*, 2002. **62(3)**: p. 632-635.

Rubashkin, MG et al., 'Force engages vinculin and promotes tumor progression by enhancing PI3-kinase activation of phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate', *Cancer Res*, 2015, 4597–4611 <<http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3698>.Force>.

Russo, J. and I.H. Russo, *Development of the human breast.* *Maturitas*, 2004. **49(1)**: p. 2-15.

Schedin, P. and P.J. Keely, *Mammary Gland ECM remodeling, stiffness, and mechanosignaling in normal development and tumor progression.* *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2011. **3(1)**: p. a003228.

Shi, X.Z. and e. al., *Pathophysiology of motility dysfunction in bowel obstruction: role of stretch-induced COX-2.* *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011. **300(1)**: p. G99-G108.

Shieh, A.C., *Biomechanical forces shape the tumor microenvironment.* *Ann Biomed Eng*, 2011. **39(5)**: p. 1379-1389.

Smyth, E.M., et al., *Prostanoids in health and disease.* *J Lipid Res.*, 2009. **50 (Suppl)**: p. S423-428.

Song, S.H., et al., *Transcriptional silencing of cyclooxygenase-2 by hyper-methylation of the 5CpG island in human gastric carcinoma cells.* *Cancer Res.*, 2001. **61**: p. 4628-4635.

Soslow, R.A., et al., *COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic and mammary tumors.* *Cancer*, 2000. **89**: p. 2637-2644.

Syed, S., A. Karadaghy, and S. Zustiak, *Simple Polyacrilamide-based multiwell stiffness assay for the study of the stiffness-dependent cell responses*. J. Vis. Exp, 2015. **97**.

Taylor, M. et al., *Lysyl Oxidase Contributes to Mechanotransduction-Mediated Regulation of Transforming Growth Factor- β Signaling in Breast Cancer Cells*, Neoplasia, 2011, 406–18 <<http://dx.doi.org/10.1593/neo.101086>>.

Tlsty, T.D. and L.M. Coussens, *Tumor stroma and regulation of cancer development*. Annu Rev Pathol, 2006. **1**: p. 119-150.

Tsatsanis, C., et al., *Signalling networks regulating cyclooxygenase-2*. . Int. J. Biochem. Cell Biol., 2006. **38**: p. 1654-1661.

Valastyan, S. and R.A. Weinberg, *Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms*. Cell, 2011. **147**: p. 275-292.

Wakatsuki, T., et al., *Cell mechanics studied by a reconstituted model tissue*. Biophys J., 2000. **79(5)**: p. 2353-2368.

Wang, D. and R.N. Dubois, *Eicosanoids and cancer*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**: p. 181-193.

Wang, D. and R.N. Dubois, *Prostaglandins and cancer*. Gut, 2006. **55(1)**: p. 115-122.

Wang, Y.L. and R.J. Pelham, *Preparation of a flexible, porous polyacrylamide substrate for mechanical studies of cultured cells*. Methods Enzymol., 1998. **298**: p. 489-496.

Wang, Y.L. y Discher, D. E., *Methods in cell biology*, Vol 83, Cell Mechanics - Cap.2

Weis, S.M. and D.A. Cheresh, *Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets*. Nat Med, 2011. **17**: p. 1359-1370.

Willis, R.A., *Pathology of tumors*. 1953.

Yeung, T., et al., *Effects of substrate stiffness on cell Morphology, cytoskeletal structure, and adhesion*. Cytoeskeleton, 2004. **60**: p. 24-34.

Zarghi, A. and S. Arfaei, *Selective COX-2 Inhibitors: A review of their structure- activity relationships*. Iraninan Journal of Pharmaceutical Research, 2011. **10(4)**: p. 655-683.

9. ANEXOS

9.1. Anexo I: Técnica aséptica

La técnica aséptica involucra una combinación de procedimientos diseñados para reducir la probabilidad de contaminación. Una correcta técnica aséptica debe proveer una barrera ente los microorganismos en el ambiente fuera del cultivo y el cultivo puro. Para ello, todos los materiales que vayan a entrar en contacto con el cultivo celular deben estar estériles y su manipulación debe ser de tal modo que no haya contacto directo entre el cultivo y el ambiente no estéril que lo rodee (Freshney 2005). En los siguientes párrafos se hará referencia a los elementos y practicas asociadas con un ambiente aséptico:

Área de trabajo y equipamiento. La misma debe encontrarse en un lugar libre de corrientes aéreas provenientes de puertas o ventanas, no debe tener un alto tráfico de gente y encontrarse junto con equipos que generen corrientes de aire. En caso que los haya, deben colocarse de manera que las corrientes no comprometan el funcionamiento del flujo laminar. Igualmente, la actividad dentro del área debe restringirse únicamente al uso de cultivo de tejidos, no a cultivos microbiológicos o animales. También, es necesario que se mantenga limpia y libre de polvo, todos los aparatos dentro del área de cultivos deben limpiarse regularmente. Asimismo, actividades no estériles, tales como procesamientos de muestra, tinciones o extracciones deben llevarse a cabo en otra área. Todos los objetos que requieran de algún replazo deben ser limpiados antes de ser introducidos al área de cultivos celular y no deben ocurrir muchos movimientos de equipos mientras los investigadores se encuentren trabajando asépticamente.

La incubadora húmeda es una gran fuente de contaminación ya que es un ambiente favorable para el crecimiento de los microorganismos, por lo que debe higienizarse regularmente. Se suele recomendar una limpieza de la misma por semana o mensualmente, dependiendo de la frecuencia de uso y de la cantidad de operadores que entran en contacto con ella. Para proceder a su limpieza, es necesario quitar todos sus contenidos incluyendo los estantes y limpiarla en su totalidad con un detergente no tóxico. Los restos del detergente deben luego ser removidos con alcohol 70%. Una vez que el mismo se evapore, se deben reintroducir nuevamente los estantes y los cultivos a la incubadora. Igualmente, existe la

posibilidad de adicionar un fungicida en la bandeja húmeda del fondo para retrasar el crecimiento de hongos (Freshney 2005).

La superficie de trabajo: Debe mantenerse limpia y ordenada, para lo cual se recomienda seguir las siguientes instrucciones (Freshney 2005):

- Superficie vacía y rociada con alcohol 70%.
- Ingresar a la superficie únicamente los materiales que vayan a ser necesarios.
- Entre procedimientos, limpiar con alcohol 70%.
- El área de trabajo debe estar acomodada de la mejor manera para lograr un acceso sencillo a todos los elementos necesarios de manera cómoda y debe quedar un amplio espacio en el centro para poder trabajar.
- No debe haber obstrucciones entre el área central de trabajo y el filtro HEPA.
- El operador debe trabajar dentro de su rango de visión
- En el caso de un derrame, el mismo debe ser inmediatamente limpiado con alcohol 70%.
- Una vez finalizado el trabajo, quitar todo y limpiar el área con alcohol 70%.

El trabajo en flujo laminar garantiza un ambiente apto para el trabajo bajo condiciones de esterilidad ya que genera un flujo constante de aire filtrado que pasa sobre la superficie de trabajo. Para asegurar su correcto funcionamiento, se recomienda chequeos en los filtros primarios cada tres a seis meses. Además, cada seis meses se debe monitorear el principal filtro HEPA sobre la superficie de trabajo. Se pueden utilizar luces ultravioletas entre sus usos para esterilizar el aire y la superficie de trabajo (Freshney 2005).

La higiene personal: El operador debe lavarse las manos con el objetivo de remover la piel seca que pueda llegar a caer en el cultivo y de reducir los microorganismos adheridos. Se pueden utilizar guantes quirúrgicos y se recomienda el uso de cofias y delantales exclusivos para el trabajo en el área de cultivos. Además, si el operador consta de pelo largo este debe ser atado. Asimismo, se debe evitar hablar a la hora de manipular los cultivos (Freshney 2005).

Reactivos y medios: Cuando son recién comprados suelen venir estériles, pero no necesariamente sus botellas por fuera. Cualquier envoltorio, debe ser quitado fuera del flujo

laminar y las botellas o cajas siempre deben ser limpiadas con alcohol 70%, cada vez, antes de ingresarlas al flujo (Freshney 2005).

Cultivos: Si se importan células de un laboratorio externo, deben pasar un periodo de cuarentena. Deben manejarse por separado del resto de los stocks del laboratorio y deben ser mantenidas libres de antibiótico hasta que se pruebe que no están contaminadas. Luego, pueden ser incorporadas al stock principal. Con el objetivo de minimizar los riesgos de contaminación de los cultivos celulares, se recomienda, no dejar las placas de cultivo abiertas por extensos periodos de tiempo. Además, se debe tener cuidado en el transporte de las mismas hacia la incubadora, evitar torcerlas y agitarlas, para evitar la acumulación del medio entre la tapa y la base de la placa. Si es que sucede, se puede sacar la tapa y limpiar el medio cuidadosamente con papel estéril y alcohol 70% y a continuación reemplazar la tapa por una nueva. (Freshney 2005).



Por otro lado, siempre es necesario tener una buena técnica aséptica, lo que involucra:

- Rociar y limpiar toda la superficie de trabajo con alcohol 70%, antes durante y una vez finalizado el trabajo;
- Rociar las botellas, tubos, recipientes, y todo lo que vaya a ser ingresado al flujo laminar, con alcohol 70%. Es necesario resaltar que como el alcohol puede eliminar las etiquetas se recomienda utilizar un marcador resistente al mismo;
- Cuando se encuentren abiertas botellas u otros recipientes de reactivos o placas o tubos de cultivo, ni las manos ni otros ítems deben interponerse entre ellos o las pipetas estériles en uso y el filtro HEPA;
- Se recomienda el uso de pipetas estériles de vidrio o plásticas descartables para manipular líquidos. Además, debe generarse un lugar para descartarlas, o en el caso de las de vidrio, para luego enviarlas a esterilizar. Asimismo, aquellas que no son usadas deben ser guardadas en un contenedor libre de polvo;
- Muchas de las pipetas descartables tienen doble envoltorio, el primero de ellos debe ser quitado antes de introducir la misma en el flujo;
- No se debe pipetear con la boca. Lo mismo aumenta la posibilidad de contaminación con micoplasma, además de ser un riesgo innecesario para el operador;

- En el caso de utilizar pipetas de vidrios se debe poner un tapón de algodón en la parte superior para que las mismas se mantengan estériles. En el caso de las pipetas descartables ya lo traen incluido;
- Evitar volcar líquido desde un contenedor estéril a otro.

9.2. Anexo II: POEs

9.2.1. TÉCNICAS DE CULTIVOS CELULARES PARA EL TRABAJO CON LA LÍNEA CELULAR 4T1

 	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR	
Código del documento: LAB-PFI-001	Versión: 00	Fecha: 01-10-2017
Título del documento: TÉCNICAS DE CULTIVOS CELULARES PARA EL TRABAJO CON LA LÍNEA CELULAR 4T1		

1. PROPÓSITO

Los procedimientos contenidos en la presente POE se utilizan para el trabajo con la línea celular 4T1 en el laboratorio de Cultivos Celulares de la Fundación UADE.

2. ALCANCE

Los procedimientos descriptos a lo largo de este POE deben ser implementados por todos aquellos (alumnos, docentes, técnicos y/o investigadores) que con distintos fines, educativos o de investigación, deban trabajar con la línea celular 4T1.

3. RESPONSABILIDAD

Alumnos	<u>Todo alumno involucrado es responsable de:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Conocer, entender y aplicar los procedimientos aquí descriptos. • Desarrollar los procedimientos de forma manual llevando a cabo el manejo del instrumental de laboratorio. • Aplicar las normas de estandarización del trabajo de laboratorio. • Poner en práctica normas de bioseguridad.
Docentes	<u>Todo docente involucrado es responsable de:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Conocer, entender y explicar los procedimientos aquí descriptos • Acompañar y guiar a los alumnos durante el desarrollo de las actividades. • Estimular la capacidad del alumno de evaluar el resultado de una experiencia y sugerir cambios en parámetros y condiciones experimentales que los acerquen a resultados confiables. • Promover el trabajo riguroso en el laboratorio.

Técnicos de laboratorio	<p><u>Todo técnico de laboratorio involucrado es responsable de:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Proveer el material de laboratorio y reactivos necesarios para llevar a cabo el procedimiento • Preparar las soluciones que se utilizan (si fuera necesario) • Conocer las normas de bioseguridad y actuar conforme a lo establecido en caso de haber algún incidente
Investigadores	<p><u>Todo investigador involucrado es responsable de:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Conocer, entender y aplicar los procedimientos aquí descriptos • Consultar la bibliografía relacionada en caso de querer ajustar las condiciones acorde a su línea de investigación • Conocer y aplicar las normas de bioseguridad

4. SALUD, SEGURIDAD Y MEDIO AMBIENTE

- **AZUL DE TRIPAN**, reactivo posiblemente carcinogénico. Puede causar irritación al entrar en contacto con los ojos y la piel y su inhalación puede ser nociva. Para su manipulación debe de usarse guantes, gafas (en caso de posible salpicadura) y guardapolvo.
- **NITROGENO LÍQUIDO**, al entrar en contacto con la piel o los ojos puede causar quemaduras severas por congelamiento mientras que su inhalación puede llevar a la asfixia por desplazamiento del oxígeno. Para su manipulación, deben utilizarse guantes especiales adaptados a la utilización en el entorno criogénico y debe de utilizarse una máscara de protección facial.
- **DMSO**, puede ser dañino para la salud del operador por inhalación, ingesta o al entrar en contacto con la piel causando un gran espectro de síntomas. Para su manipulación se deben de utilizar guantes.
- **RPMI**, no es considerado un reactivo peligroso ni toxico para la salud sin embargo en personas susceptibles el mismo puede causar irritación al entrar en contacto con la piel o los ojos y no se recomienda ni su ingesta ni inhalación ya que puede ser nociva.
- **PBS**, debe evitarse su inhalación e ingesta como así también que entre en contacto con los ojos y la piel ya que puede provocar irritación.
- **Línea celular 4T1**, corresponde con un nivel de bioseguridad 1 por lo que debe trabajarse bajo las normas estipuladas por dicho nivel.

5. PROCEDIMIENTO

5.1 Generalidades

El mantenimiento de una línea celular y su manipulación durante una investigación o experimentación requiere de varios procedimientos rutinarios y habituales en un laboratorio de cultivos celulares. Cada uno de los cuales implica un protocolo diferente, sin embargo en

todos se debe de trabajar con una correcta técnica aséptica y bajo las normas de bioseguridad adecuadas garantizando de esta forma la ausencia de contaminación y la seguridad del operador. Cabe destacar, que una de las principales fuentes de peligros en el manipuleo, son las contaminaciones asociadas a las células o medios de cultivo con agentes patógenos y/o la tumorigenicidad. El principal riesgo para el ser humano que opera con células en cultivo, se debe a la presencia de bacterias, hongos, micoplasmas y virus. Para establecer las medidas apropiadas de protección, el trabajo en cultivo celular es clasificado de acuerdo con cuatro grupos de riesgo internacionalmente aceptados, teniendo en cuenta la probabilidad de que microorganismos de ciertos niveles de riesgo estén presentes en el cultivo celular. La línea 4T1 a la que se hace referencia en la presente POE se encuadra dentro del nivel 1 de bioseguridad (Ver ANEXO).

Como se mencionó, los principales contaminantes de un cultivo celular son los microorganismos. Los rasgos típicos de una contaminación por microorganismos son:

- **Cambio en el pH del medio**, pudiendo ser visualizado por un cambio en el color del medio ya que los mismos en su composición portan un indicador de pH. La contaminación bacteriana disminuye el pH mientras que las levaduras a menos que sea una contaminación muy grande, no producen un cambio significativo en el mismo. Las contaminaciones fúngicas, aumentan el pH.
- **Turbidez en el medio de cultivo**. Al observarse en el microscopio con un bajo aumento (100X) se pueden observar la morfología de la contaminación (bacterias, agrupaciones granulares entre los espacios intracelulares; levaduras, partículas ovoides o redondeadas; hongos, micelios filamentosos). Sin embargo, las contaminaciones por micoplasmas no pueden ser observadas al microscopio; solo se ve deterioro del cultivo celular y para su detección será necesaria una tinción de fluorescencia.

Es importante destacar que una vez iniciado el cultivo celular a partir de un cultivo primario o de una línea celular, como es este caso, será necesario el cambio periódico de medio de cultivo seguido de eventualmente un subcultivo (repique) si las células proliferan. El intervalo entre cambio de medio y subcultivo varía con la línea celular ya que el mismo depende de la tasa de actividad metabólica y de crecimiento. En este caso, para las células 4T1 el cambio de medio es cada 2 días y el repique debe realizarse de tal manera que las células no alcanzan un 80% de confluencia (diluciones de 1/6 -1/8). Los factores que indican la necesidad de cambio de medio son:

- Cambio en el pH del medio. Las células suelen detener su crecimiento cuando el pH cae por debajo de 6.5 perdiendo viabilidad. Esta variación en el pH como ya se dijo puede verse por cambio en el color del medio (Rojo→Naranja→Amarillo).
- Concentración celular. A mayor concentración celular, la tasa de metabolización del medio será mayor.
- Morfología celular. Debe chequearse siempre el estado de las células y que las mismas mantengan sus características fenotípicas como así también la ausencia de granularidad alrededor del núcleo, vacuolas en el citoplasma, etc.
- Tipo celular. Las células normales a alta confluencia dejaran de crecer por inhibición del contacto, pero células transformadas (como las 4T1) ó las embrionarias a altas densidades celulares, se deterioran rápido

Lo recomendable es para minimizar las modificaciones genéticas en líneas celulares continuas, la senescencia o transformación o también para tener disponibilidad de una línea celular en caso de que un cultivo se deba descartar por contaminación o por su pérdida accidental, las células se almacenan congeladas a -80°C para periodos cortos de tiempo o -160°C (nitrógeno líquido) para almacenar por largos periodos de tiempo sin deterioro celular. El congelado de las células debe de hacerse en forma paulatina, disminuyendo lentamente la temperatura a 1°C por minuto en presencia de un agente criopreservante como el dimetilsulfoxido (DMSO). Previo al congelado, el cultivo debe de llevarse a subconfluencia para tener una alta densidad celular. Cuando sea necesario, el vial de células congeladas se retira del nitrógeno líquido y en forma rápida se procede a su descongelado. Es recomendable llevar a cabo un recuento celular de la suspensión celular que se va a congelar para tener una idea de cuál es la concentración de células por vial. Dicho recuento se lleva a cabo en la Cámara de Neubauer y el colorante Azul de Tripán el cual es permeable en todas las células pero solo aquellas que son metabólicamente activas lo expulsan viéndose blancas al microscopio lo cual permite que al ser observada la cámara al microscopio puedan contarse únicamente las células viables.

5.2 Descongelado de línea celular 4T1

5.2.1 Reactivos y materiales

- Vial de células 4T1 en nitrógeno líquido
- Centrifuga
- Etanol 70%
- PBS 1X (Ver **Anexo III**)
- Medio RPMI 10% SFB (Ver **Anexo IV**)
- Falcon de 15 ml estéril
- Baño termostático a 37°C
- Estufa de cultivo a 37°C 5%CO
- Campana de Flujo Laminar Bioseguridad 1
- Toallas de papel
- Gradilla de Falcon de 15 y 50 ml
- Marcador de punta fina
- Pipeteador automático
- Pipetas descartables esteriles 10, 5 y 2 ml
- Descarte
- Placas p100

5.2.2 Consideraciones antes de comenzar

Esterilización de la zona y materiales de trabajo

- 1) Rociar con Etanol 70% los guantes.
- 2) Rociar con Etanol 70% la superficie horizontal de la campana de flujo laminar y secar con toalla de papel.
- 3) Rociar con Etanol 70% todos los materiales que se vayan a introducir en la campana: descartes, gradillas, pipeteros, falcon, placas de cultivo, etc.

5.2.3 Metodología

- 1) Retirar un vial de células del Nitrógeno líquido y descongelarlo rápido colocándolo en un baño termostático a 37°C o mantenerlo en la mano haciendo movimientos rotatorios leves.
- 2) En un falcon de 15 ml cargar con pipeta 8 ml de medio de cultivo completo termostatizado a 37°C.
- 3) Destapar el vial de células y con pipeta de 2 ml pasar las células al tubo falcon.
- 4) Centrifugar a 1200 rpm 10 minutos.
- 5) Descartar el sobrenadante por inversión y resuspender por pipeteo suave el pellet de células con 10 ml de medio de cultivo completo.
- 6) Plaquear en una p100.
- 7) Rotular con: nombre de la línea, pasaje y fecha.
- 8) Incubar a 37°C

5.3 Cambio de medio de un cultivo de células 4T1

5.3.1. Reactivos y materiales

- Cultivo de células 4T1 que manifieste necesidad de cambio de medio
- PBS 1X (Ver **Anexo III**)
- Medio RPMI 10% SFB (Ver **Anexo II**)
- Baño termostático a 37°C
- Gradilla para falcon de 15 y 50 ml
- Etanol 70%
- Estufa de cultivo a 37°C 5%CO
- Pipeteador automatico
- Guantes
- Pipetas descartables esteriles de 10, 5 y 2 ml.
- Toallas de papel
- Campana de Flujo laminar Bioseguridad 1
- Marcador de punta fina

- Descarte
- Guantes

5.3.2 Consideraciones antes de comenzar

Esterilización de la zona y materiales de trabajo

- 1) Rociar con Etanol 70% los guantes.
- 2) Rociar con Etanol 70% la superficie horizontal de la campana de flujo laminar y secar con toalla de papel.
- 3) Rociar con Etanol 70% todos los materiales que se vayan a introducir en la campana: descartes, gradillas, pipeteros, falcon, placas de cultivo, etc.

5.3.3 Metodología

- 1) Observar al microscopio la ausencia de contaminación
- 2) Retirar el medio de cultivo de la monocapa y descartarlo.
- 3) Realizar 2 lavados con 5 ml de PBS 1X previamente termostatizado a 37°C. en caso de trabajar con una p100 mientras que para un well de una MW6 se utilizaran 2 ml.
- 4) Agregar el volumen correspondiente de medio RPMI 10% SFB previamente termostatizado a 37°C. El volumen a agregar depende del tamaño de la placa de cultivo; para una p100 serán 10 ml mientras que para un well de una MW6 3 ml
- 5) Llevar a la estufa de cultivo.

<h2>5.4 Subcultivo de 4T1</h2>

5.4.1 Reactivos y materiales

- Cultivo de células 4T1 al 80% ó más de confluencia.
- PBS 1X (Ver **Anexo III**)
- Medio RPMI 10% SFB (Ver **Anexo II**)
- Tripsina 2X (Ver **Anexo IV**)
- Etanol 70%
- Toallas de papel
- Descarte
- Baño termostático a 37°C
- Falcon de 15 ml estéril
- Gradilla de falcon de 15 y 50 ml
- Pipeteador automático

- Pipetas descartables estériles de 10, 5 y 2 ml
- Estufa de cultivo a 37°C 5% CO
- Campana de Flujo Laminar Bioseguridad 1
- Marcador de punta fina
- Placas de cultivo p100
- Microscopio

5.4.2 Consideraciones antes de comenzar

Esterilización de la zona y materiales de trabajo

- 1) Rociar con Etanol 70% los guantes.
- 2) Rociar con Etanol 70% la superficie horizontal de la campana de flujo laminar y secar con toalla de papel,
- 3) Rociar con Etanol 70% todos los materiales que se vayan a introducir en la campana: descartes, gradillas, pipeteros, falcon, placas de cultivo, etc.

5.4.3 Metodología

- 1) Observar al microscopio el estado del cultivo: características morfológicas, ausencia de contaminación y grado de confluencia.
- 2) Retirar el medio de cultivo de la monocapa y descartarlo.
- 3) Realizar 2 lavados con PBS 1X previamente termostatizado a 37°C.
- 4) Agregar cantidad suficiente de tripsina para cubrir la monocapa; aproximadamente 1 ml para una p100.
- 5) Incubar en la estufa de cultivo a 37°C hasta observar levantamiento de las células (5 minutos aproximadamente)
- 6) Frenar la acción de la tripsina con 9 ml de medio RPMI 10% SFB.
- 7) Pipetear suavemente hasta obtener una suspensión celular homogénea evitando la formación de burbujas.
- 8) Colocar la suspensión celular en un falcon de 15 ml estéril.
- 9) Realizar las diluciones deseadas. Por Ej. para una dilución 1/10, tomar 1 ml de la suspensión y agregar 9 ml de medio RPMI 10% SFB. Pipetear suavemente la nueva suspensión en la placa para homogeneizar. Observar al microscopio la homogeneidad celular
- 10) Rotular la placa con nombre de la línea (4T1), número de pasaje (pX), fecha y nombre del operador.
- 11) Llevar a la estufa a 37°C

5.5 Recuento de células 4T1 en Cámara de Neubauer

5.5.1. Reactivos y materiales

- Cámara de Neubauer
- Eppendorf 1,5 ml estériles.
- Micropipetas p20 y tips estériles
- Azul tripan.
- Etanol 70%
- PBS 1X (Ver **Anexo III**)
- Medio RPMI 10% SFB (Ver **Anexo II**)
- Tripsina 2X (Ver **Anexo IV**)
- Falcon de 15 ml
- Baño termostático a 37°C
- Estufa de cultivo a 37°C 5% CO
- Campana de Flujo laminar Bioseguridad 1
- Toallas de papel
- Gradilla de falcon de 15 y 50 ml
- Gradilla de Eppendorf
- Marcador de punta fina
- Pipeteador automático
- Pipetas de 10, 5 y 2 ml
- Descarte
- Agua destilada
- Microscopio

5.5.1 Consideraciones antes de comenzar

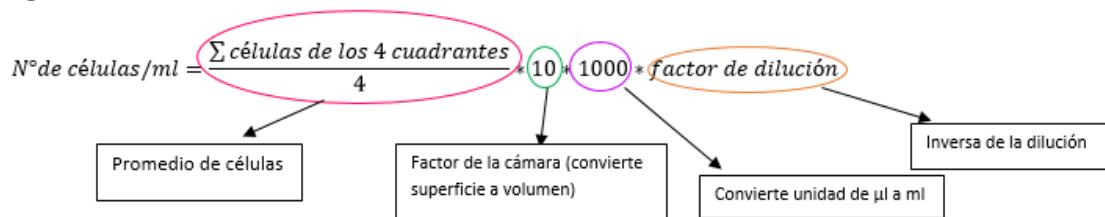
Esterilización de la zona y materiales de trabajo

- 1) Rociar con Etanol 70% los guantes.
- 2) Rociar con Etanol 70% la superficie horizontal de la campana de flujo laminar y secar con toalla de papel,
- 3) Rociar con Etanol 70% todos los materiales que se vayan a introducir en la campana: descartes, gradillas, pipeteros, falcon, placas de cultivo, etc.

5.5.3 Metodología

- 1) Retirar el medio de cultivo de la monocapa y descartar.
- 2) Realizar 2 lavados con PBS 1X previamente termostatizado a 37°C.

- 3) Agregar cantidad suficiente de tripsina para cubrir la monocapa; aproximadamente 1 ml para una p100.
- 4) Incubar en la estufa de cultivo a 37°C hasta observar levantamiento de las células (5 minutos aproximadamente).
- 5) Frenar la acción de la tripsina con 9 ml de medio RPMI 10%SFB.
- 6) Pipetear suavemente hasta obtener una suspensión celular homogénea evitando la formación de burbujas.
- 7) Colocar la suspensión celular en un falcon de 15 ml estéril.
- 8) Tomar una alícuota del resuspendido celular (5 µl) y pasarlo a un eppendorf estéril.
- 9) Agregar en el eppendorf 5 µl de Azul Tripan y 5 µl de medio RPMI 10% SFB.
- 10) Lavar la Cámara de Neubauer con agua destilada, secar bien y rociar con Etanol 70%. Mojar los bordes de la cámara con agua y colocar el vidrio encima.
- 11) Tomar 10 µl de solución de células con Azul Tripan y cargar la cámara.
- 12) Contar las células viables (incoloras) contenidas en cada cuadrante y estimar la concentración celular con la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de células/ml} = \frac{\sum \text{células de los 4 cuadrantes}}{4} * 10 * 1000 * \text{factor de dilución}$$


5.6 Congelado de línea celular 4T1

5.6.1. Reactivos y materiales

- Congelito
- Nitrógeno líquido
- Freezer -20°C
- DMSO
- 10% SFB
- Viales de plástico
- Centrifuga
- Cámara de Neubauer.
- Eppendorf 1,5 ml estériles.
- Micropipetas p20 y tips estériles.
- Azul tripan.
- Etanol 70%
- PBS 1X
- Medio RPMI 10% SFB

- Tripsina
- Falcon de 15 ml
- Baño termostático a 37°C
- Estufa de cultivo a 37°C 5% CO₂
- Cabina de bioseguridad
- Toallas de papel
- Gradilla de falcon de 15 y 50 ml
- Gradilla de Eppendorf
- Marcador de punta fina
- Pipeteador automático
- Pipetas de 10, 5 y 2 ml
- Descarte
- Agua destilada.
- Microscopio

5.6.1 Consideraciones antes de comenzar

Esterilización de la zona y materiales de trabajo

- 1) Rociar con Etanol 70% los guantes
- 2) Rociar con Etanol 70% la superficie horizontal de la campana de flujo laminar y secar con toalla de papel.
- 3) Rociar con Etanol 70% todos los materiales que se vayan a introducir en la campana: descartes, gradillas, pipeteros, falcon, placas de cultivo, etc.

5.6.2 Metodología

- 1) Chequear los siguientes ítems del cultivo:
 - a) Óptimo crecimiento en fase lag.
 - b) Crecimiento libre de contaminaciones
 - c) Presencia de características típicas de la línea celular.
- 2) Preparar la solución de congelamiento y mantener en hielo hasta su uso:
 - a) 20% SFB
 - b) 10% DMSO
 - c) 70% Medio de cultivo
- 3) Retirar el medio de cultivo de la monocapa y descartar.
- 4) Realizar dos lavados con PBS.
- 5) Agregar cantidad suficiente de tripsina 2X para cubrir la monocapa.
- 6) Incubar en estufa a 37°C durante 5 minutos o hasta observar levantamiento celular.
- 7) Frenar la acción de la tripsina con medio de cultivo suplementado con 10% SFB.
- 8) Pipetear hasta obtener una suspensión celular homogénea.

- 9) Colocar la suspensión en un falcon de 15 ml. Llevar a cabo el recuento de las células viables para estimar la concentración celular.
- 10) Centrifugar a 1200 rpm 5 minutos. Descartar el sobrenadante por inversión.
- 11) Resuspender el pellet de células en la solución de congelamiento.
- 12) Colocar 1,5 ml de la suspensión celular en vial de plástico.
- 13) Poner los viales en congelito y guardar a -80°C O.N
- 14) Pasar los viales a Nitrógeno Líquido.

5.7 Posibles problemas y soluciones durante el procedimiento

- **Contaminación del cultivo celular o de los reactivos:**
A pesar de la utilización de antibióticos en los medios de cultivo, la contaminación por microorganismos continúa siendo uno de los mayores problemas del cultivo de células. Las bacterias, los micoplasmas, las levaduras y las esporas de los hongos, pueden ser introducidas vía el operador, la atmósfera, la superficie de trabajo, las soluciones, etc. Una correcta y rigurosa técnica aséptica por parte del operador, conjuntamente con la utilización de soluciones y materiales probadamente estériles son imprescindibles para el manejo de los cultivos libres de contaminantes biológicos.
- **Ausencia de adherencia celular y spreading a la placa de cultivo:**
En caso de observar que las células no están adheridas ni haciendo spreading en la placa de cultivo, sino que permanecen redondeadas, puede pasar que uno se haya olvidado de agregarle suero fetal bovino al medio de cultivo o se haya utilizado un medio de cultivo equivocado.
- **Alta tasa de muerte celular tras descongelado:** se recomienda pasarlas a una placa de menor tamaño o descongelar un nuevo vial en una placa más chica.

6. REFERENCIAS

- Guía de trabajos prácticos de la materia Cultivos Celulares, en el marco del cuarto año de la Licenciatura en Biotecnología. Fundación UADE. 2015
- Freshney, R. Ian; “*Culture of animal cells : a manual of basic technique and specialized applications*”. 6ta. USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010. 732.

7. HISTORIA

Documento: Nuevo

8. ANEXOS

I. Nivel de Bioseguridad 1

Es adecuado para trabajos que involucran agentes bien caracterizados que no producen enfermedad en humanos adultos sanos, y que imponen un riesgo potencial mínimo

para el personal del laboratorio y el medio ambiente. El laboratorio no está necesariamente separado de los patrones de tránsito generales en el edificio. El trabajo se realiza generalmente sobre mesas de trabajo utilizando prácticas microbiológicas estándar. No es necesario el uso de equipos de contención especiales y en general no se los utiliza. El personal de laboratorio cuenta con una capacitación específica acerca de los procedimientos realizados en el laboratorio y es supervisado por un científico con capacitación general en microbiología. Las siguientes prácticas estándar y especiales, equipos de seguridad e instalaciones se aplican a los agentes asignados al Nivel de Bioseguridad 1:

A. Prácticas Microbiológicas Estándar

1. El acceso al laboratorio es limitado o restringido a criterio del director cuando se están llevando a cabo experimentos o trabajos con cultivos y especímenes.
2. Las personas se lavan las manos luego de manipular materiales viables, luego de quitarse los guantes y antes de retirarse del laboratorio.
3. No está permitido comer, beber, fumar, manipular lentes de contacto, maquillarse o almacenar alimentos para uso humano en áreas de trabajo. Las personas que usan lentes de contacto en laboratorios deben también utilizar antiparras o un protector facial. Los alimentos se almacenan fuera del área de trabajo en gabinetes o refrigeradores designados y utilizados con este único fin.
4. Está prohibido pipetear con la boca; se utilizan dispositivos pipeteadores mecánicos.
5. Se instituyen políticas para el manejo seguro de objetos cortantes o punzantes.
6. Todos los procedimientos se llevan a cabo con precaución a fin de minimizar la creación de salpicaduras o aerosoles.
7. Las superficies de trabajo se descontaminan como mínimo una vez por día y luego de todo derrame de material viable.
8. Todos los cultivos, stocks y otros desechos reglamentados se descontaminan antes de ser desechados mediante un método de descontaminación aprobado, como por ejemplo, mediante autoclave. Los materiales que se deben descontaminar fuera del laboratorio inmediato son colocados en un recipiente duradero, estanco y cerrado para su transporte desde el laboratorio. Los materiales que se deben descontaminar fuera del laboratorio inmediato se embalan de conformidad con las normas locales, estatales y federales aplicables antes de retirarlos del establecimiento.
9. Se debe colocar una señal de advertencia de riesgo biológico en la entrada del laboratorio cuando se encuentren presentes agentes infecciosos. La señal debe incluir el nombre del agente o agentes en uso y el nombre y número de teléfono del investigador.

10. Se encuentra en vigencia un programa de control de roedores e insectos.

B. Prácticas Especiales:

Ninguna.

C. Equipos de Seguridad (Barreras Primarias)

1. En general, no se requieren dispositivos o equipos de contención o equipamientos especiales, como gabinetes de seguridad biológica para las manipulaciones de agentes asignados al Nivel de Bioseguridad 1.

2. Se recomienda el uso de ambos, delantales o uniformes de laboratorio a fin de evitar que la ropa de calle se pueda contaminar o ensuciar.

3. Se deben usar guantes si existen lastimaduras en las manos o si la piel presenta alguna erupción. Deben existir alternativas disponibles al uso de guantes de látex empolvados.

4. Se debe utilizar protección ocular para los procedimientos en los que se puedan producir salpicaduras de microorganismos u otros materiales peligrosos.

D. Instalaciones del Laboratorio (Barreras Secundarias)

1. Los laboratorios deben tener puertas para el control de acceso.

2. Cada laboratorio contiene una pileta para el lavado de manos.

3. El laboratorio ha sido diseñado para que su limpieza sea sencilla. Las alfombras no son adecuadas para los laboratorios.

4. Las superficies de las mesas de trabajo son impermeables al agua y son resistentes al calor moderado y a solventes orgánicos, ácidos, álcalis y productos químicos utilizados para descontaminar la superficie de trabajo y los equipos.

5. Los muebles de laboratorio deben tener la capacidad de soportar cargas y usos previstos. Los espacios entre las mesas de trabajo, gabinetes y equipos deben ser accesibles para su limpieza.

6. Si el laboratorio tiene ventanas que se abren hacia el exterior, están provistas de mosquiteros

II. Preparación de medio RPMI. Control de esterilidad. Preparación de medio completo (10% SFB)

1) En un vaso de precipitados agregar 950 ml de agua bidestilada.

- 2) Agregar el contenido del sobre correspondiente al medio RPMI (*Gibco*) y disolver mezclando con varilla.
- 3) Agregar 2 gr de Bicarbonato de Sodio y continuar mezclando hasta que este último se disuelva.
- 4) En caso de ser necesario, ajustar el pH a 0,2-0,3 unidades por debajo del valor final con NaOH 1 N o HCl 1 N.
- 5) Ajustar el volumen a 1Lt.
- 6) Esterilizar por filtración (filtro de 0,2 μ M) en campana de flujo laminar utilizando un sistema de presión positiva (Bomba Millipore).
- 7) Alicuotar el medio en botellas o en falcon de 50 ml estériles.
- 8) Controles de esterilidad:
 - Bacteriano: En LB líquido y/o LB inocular o plaquear una alícuota del medio recién preparado y esterilizado. Incubar durante 24 hs a 37°C en estufa; en caso del caldo dejarlo a dicha temperatura bajo agitación.
 - Hongos y levaduras: En TCA agar plaquear una alícuota del medio recién preparado y esterilizado. Incubar durante 24 hs a 25°C en estufa.
**Dichos controles puede utilizarse para todos los reactivos que vayan a utilizarse en cultivos celulares (Suero, PBS, etc.)*
- 9) En caso de no observar crecimiento en los controles de esterilización, se procederá al uso del medio.
- 10) Preparación de medio completo:
 - Agregar a la alícuota de medio a utilizar Suero Fetal bovino (SFB) de tal manera que la concentración final sea 10%. Por ejemplo para 50 ml final de medio completo agregar 45 ml de medio RPMI y 5 ml de suero fetal bobino.

III. Preparación de PBS 1X

A partir de Sobres de PBS en polvo

Diluir el contenido del sobre en 1 lt de agua destilada. Alicuotar en botellas Shoot y esterilizar por autoclave.


PBS casero

- 1) Pesar en un vaso de precipitados de 1 Lt:
 - 8 gr-----NaCl
 - 0,2gr-----KCl
 - 0,2 gr-----KH₂PO₄
 - 1,15 gr----Na₂HPO₄anhídrida
- 2) Agregar agua bidestilada hasta alcanzar 1 lt.
- 3) Alicuotar en botellas shoot y esterilizar por autoclave

IV. Preparación de Tripsina 2X

En un falcon de 15 ml estéril y bajo Campana de Flujo Laminar diluir 3 ml de Tripsina 10X en 12 ml de PBS 1X.

9.2.2. FABRICACIÓN DE SOPORTES DE CULTIVO DE RIGIDEZ VARIABLE

 		PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR	
Código del documento: LAB-PFI-002		Versión: 00	Fecha: 01-10-2017
Título del documento: FABRICACIÓN DE SOPORTES DE CULTIVO DE RIGIDEZ VARIABLE			

1. PROPÓSITO

Los procedimientos contenidos en el presente POE se utilizan para fabricar soportes de cultivo que pueden ser fácilmente manipulados para variar su rigidez con el objetivo de crecer una línea celular sobre ellos y evaluar el impacto de esta variable en el crecimiento y otras características de la línea celular ensayada.

2. ALCANCE

Los procedimientos descriptos a lo largo de este POE deben ser implementados por todos aquellos (alumnos, docentes, técnicos y/o investigadores) que con distintos fines, educativos o de investigación, deban trabajar con soportes de cultivo celular de rigidez variable.

3. RESPONSABILIDAD

Alumnos	<p><u>Todo alumno involucrado es responsable de:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Conocer, entender y aplicar los procedimientos aquí descriptos. • Desarrollar los procedimientos de forma manual llevando a cabo el manejo del instrumental de laboratorio. • Aplicar las normas de estandarización del trabajo de laboratorio. • Poner en práctica normas de bioseguridad.
Docentes	<p><u>Todo docente involucrado es responsable de:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Conocer, entender y explicar los procedimientos aquí descriptos • Acompañar y guiar a los alumnos durante el desarrollo de las actividades. • Estimular la capacidad del alumno de evaluar el resultado de una experiencia y sugerir cambios en parámetros y condiciones experimentales que los acerquen a resultados confiables. • Promover el trabajo riguroso en el laboratorio.

Técnicos de laboratorio	<p><u>Todo técnico de laboratorio involucrado es responsable de:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Proveer el material de laboratorio y reactivos necesarios para llevar a cabo el procedimiento • Preparar las soluciones que se utilizan (si fuera necesario) • Conocer las normas de bioseguridad y actuar conforme a lo establecido en caso de haber algún incidente
Investigadores	<p><u>Todo investigador involucrado es responsable de:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Conocer, entender y aplicar los procedimientos aquí descriptos • Consultar la bibliografía relacionada en caso de querer ajustar las condiciones acorde a su línea de investigación • Conocer y aplicar las normas de bioseguridad

4. SALUD, SEGURIDAD Y MEDIO AMBIENTE

- **HIDRÓXIDO DE SODIO:** Alcali fuerte. Evitar contacto con la piel. Usar guantes
- **3-APTMS:** Irritante. Provoca lesiones cutáneas graves. En caso de contacto con los ojos lavar inmediata y constantemente con abundante agua y acudir a un médico. Usar guantes.
- **GLUTARALDEHIDO:** Corrosivo. Nocivo en caso de inhalación e ingestión. Causa irritación y quemaduras en ojos y piel. En caso de contacto con los ojos lavar inmediata y constantemente con abundante agua y acudir a un médico. Usar guantes y gafas protectoras.
- **ACRILAMIDA:** Nocivo en caso de inhalación e ingestión. Usar guantes.
- **BISACRILAMIDA:** Nocivo en caso de inhalación e ingestión. Usar guantes.
- **APS:** Nocivo en caso de inhalación e ingestión. Causa enrojecimiento e irritación en ojos y piel. En caso de contacto con los ojos lavar inmediata y constantemente con abundante agua y acudir a un médico. Usar guantes y gafas protectoras.
- **TEMED:** Inflamable. Nocivo en caso de ingestión e inhalación. Provoca quemaduras graves en piel y lesiones oculares graves. En caso de contacto con los ojos lavar inmediata y constantemente con abundante agua y acudir a un médico. Usar guantes y gafas protectoras.
- **NHS:** Nocivo en caso de ingestión e inhalación. Provoca irritación ocular grave. En caso de contacto con los ojos lavar inmediata y constantemente con abundante agua y acudir a un médico. Usar guantes y gafas protectoras.
- **SURFASIL:** Inflamable y corrosivo. Usar guantes. Manipular bajo campana.
- **CLOROFORMO:** Tóxico, irritante, carcinógeno y nocivo. Para una manipulación segura debe de trabajarse bajo campana extractora y con guantes.

5. PROCEDIMIENTO

5.1 Generalidades

El procedimiento empleado para la fabricación de soportes de rigidez variable se basa en la preparación de geles de poliacrilamida con distintas proporciones de acrilamida y bisacrilamida. De este modo se puede controlar su dureza. Para facilitar su manipulación y posterior manejo en cultivo estos geles son polimerizados sobre cubreobjetos de vidrio, los cuales necesitan ser activados para que los geles puedan quedar efectivamente unidos. Con este fin, los cubreobjetos son expuestos a NaOH para volverlos más reactivos. Luego el agregado de 3-APTMS, que se une por enlaces Si-O-Si, deja grupos amino libres que reaccionarán con el glutaraldehído agregado posteriormente y actuará como entrecruzador entre el 3-APTMS y el gel de poliacrilamida.

Por otro lado se polimerizan los geles con NHS en superficie, el cual se integra en el gel en formación y se une a los grupos aldehído del glutaraldehído sobre el cubreobjetos. A su vez, deja grupos amino expuestos para poder recubrir con la proteína de matriz extracelular de interés, que en el caso del procedimiento aquí descrito se trata de colágeno, para proveerle las uniones necesarias a la célula en cultivo.

Paralelamente, un segundo set de cubreobjetos es siliconizado para ser agregado encima del otro vidrio con el gel en formación, de modo que se obtiene un sándwich que facilita la polimerización y luego la remoción de este segundo cubreobjeto.

5.2 Preparación

5.2.1. Reactivos y materiales

- Pinzas
- Juego de pipetas, p1000, p200, p20, p10
- Tips amarillos, azules y blancos en racks
- Tubos Eppendorf de 1.5 ml
- Aguja curva
- Agua destilada
- Cubreobjetos redondos de 25 mm Ø o cuadrados de 24x24mm
- Etanol absoluto
- Vaso de precipitados de 50 ml
- Parafilm
- NaOH
- 3-APTMS
- Glutaraldehído
- Surfasil
- Agua destilada
- Acrilamida
- Bisacrilamida
- APS

- TEMED
- NHS
- PBS
- Colágeno
- Agarosa
- Microondas
- Servilletas
- Placas MW6
- Heladera 4°C
- Vórtex
- Fósforos y mechero
- Hielo
- Flujo laminar
- Placas p150

5.2.2. Consideraciones antes de comenzar

1. Esterilizar cubreobjetos: Tomar con pinza, sumergir brevemente en un vaso de precipitados con etanol absoluto y pasar por llama
2. Preparar NaOH 0,1 M (Ver **Anexo I**)
3. Preparar solución de acrilamida al 40% en agua destilada. Filtrar con papel de filtro y luego con filtro 0,2um y jeringa para esterilizar. (Ver **Anexo II**)
4. Preparar solución de bisacrilamida al 1% en agua destilada. Filtrar con papel de filtro y luego con filtro 0,2um y jeringa para esterilizar. (Ver **Anexo III**)
5. Preparar solución de APS al 10% en agua y esterilizar con filtro 0,2um y jeringa. (Ver **Anexo IV**)
6. Preparar glutaraldehído 0.5% en agua destilada. (Ver **Anexo V**)
7. Preparar solución al 10% de SurfaSil en cloroformo. (Ver **Anexo VI**)
8. Preparar solución saturada de NHS en cloroformo (Ver **Anexo VII**)

5.2.3 Metodología

1. Poner parafilm en placa
2. Poner los cubreobjetos sobre el parafilm y cubrir cada uno con 1ml de NaOH 0,1 M. Incubar 3 minutos a temperatura ambiente y luego aspirar. Secar con servilleta (*Figura 1a*).
3. Poner 0,5 ml de 3-APTMS en cada cubreobjeto. Incubar 3 minutos a temperatura ambiente y aspirar. Es muy importante cumplir el tiempo. Secar bien con servilleta.
4. Enjuagar los cubreobjetos con agua destilada. Sacarlos con pinzas y ponerlos con el lado tratado (aquel sobre el cual se agregó NaOH y 3-APTMS) hacia arriba en una nueva placa con parafilm. Repetir el lavado con agua destilada (3 veces en total). 5 minutos cada lavado agitando levemente. Secar bien con servilleta. Este paso es muy importante ya que si quedan residuos de reactivos previos, con el agregado del glutaraldehído en el próximo paso se puede generar un precipitado que obliga a descartar todo y comenzar de nuevo (*Figura 1b*)

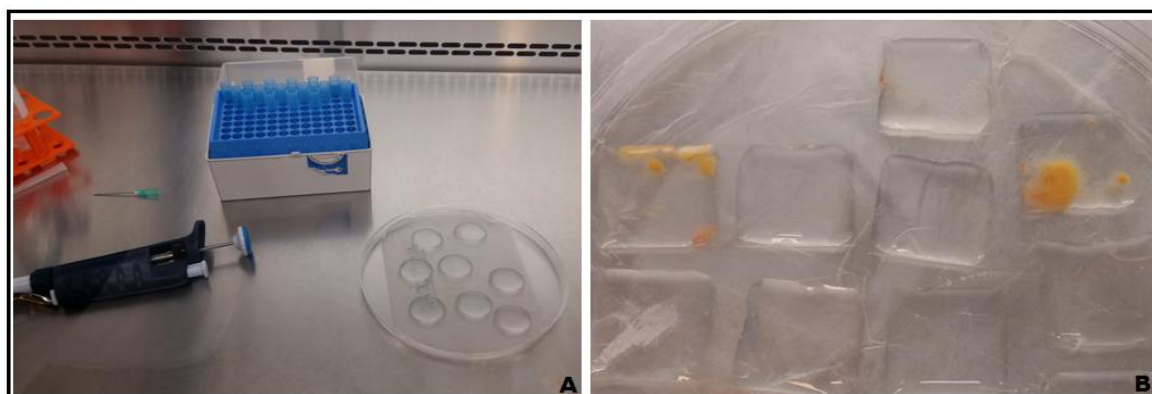


Figura 1. Protocolo de activación de los vidrios para la posterior adhesión de los hidrogeles. (A) En todos los pasos el reactivo debe cubrir bien la superficie del cubreobjeto, como así también es importante cumplir los tiempos de incubación y respetar los lavados entre reactivos. De lo contrario, se pueden observar interacciones indeseadas que obligan a descartar el trabajo realizado hasta el momento (B).

5. Cubrir cada cubreobjeto con 0,5 ml de glutaraldehído 0,5% e incubar 30 minutos a temperatura ambiente. Repetir paso iv. Secar bien con servilleta. En este punto se puede parar y dejar los cubreobjetos activados por varios días en un área seca.
6. Siliconizar en simultáneo el resto de los cubreobjetos esterilizados: sumergir los cubreobjetos en una solución de SurfaSil en cloroformo e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos agitando suavemente. Secar con servilleta. Los cubreobjetos siliconizados se pueden reutilizar.
7. Agarrar con pinzas los cubreobjetos y ponerlos sobre una gradilla de eppendorf o sobre un parafilm en el flujo laminar con la cara tratada hacia arriba.
8. Preparación de hidrogeles: Tomar los volúmenes detallados en la siguiente tabla, conservando el orden de adición de reactivos que se presenta y mezclar en un eppendorf.

REACTIVOS	RIGIDEZ			
	0,3 (Stiff)	0,15	0,06	0,03 (Soft)
Agua	630 µl	750 µl	822 µl	846 µl
Acrilamida	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl
Bis-Acrilamida	240 µl	120 µl	48 µl	24 µl
APS	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl
TEMED	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl

9. Tomar 150 µl y colocarlos sobre el cubreobjeto activado. Tomar 26 µl de la solución saturada de NHS y colocar sobre la solución del gel.
10. Poner el cubreobjeto siliconizado arriba del que tiene el gel antes que empiece a polimerizar. Dejar a temperatura ambiente hasta que polimerice.
11. Agarrar el sándwich con guantes y deslizar el vidrio de arriba.
12. Guardar el cubreobjeto siliconizado.

13. Poner los cubreobjetos con el gel en los pocillos de una placa MW de 6 wells. Agregar 2 ml de PBS (antes o después de poner el cubreobjeto con el gel).
14. Lavar 3 veces con PBS por 5 minutos agitando levemente.
15. Cubrir cada gel con 2 ml de una solución de colágeno de aproximadamente 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS.
16. Incubación OverNight (ON) a 4°C
17. Retirar la solución de colágeno
18. Lavar una vez con PBS cada well
19. Agregar 2 ml de agarosa 1% fundida a cada pocillo de una nueva placa MW de 6. Dejar polimerizar sin taparla a temperatura ambiente dentro de un flujo laminar apagado, para evitar vibraciones
20. Pasar los hidrogeles inmovilizados (cubreobjetos con gel) a la placa MW de 6 con agarosa. Tratar que los geles queden pegados a la agarosa para así evitar que se muevan.
21. Plaquear 10⁵. Tener en cuenta que en los geles blandos se debe de plaquear el doble.

5.2 Almacenamiento de los geles obtenidos

Se pueden conservar sumergidos en PBS en 4°C antes de agregar la proteína de matriz extracelular. De todas formas recomendamos el uso de geles recién preparados ya que con el tiempo los geles pierden agua y eso puede modificar su rigidez.

5.3 Resultados

Se obtienen geles de distinta rigidez sobre cubreobjetos de vidrio de fácil manipulación. Sobre ellos se pueden cultivar células y tomar muestras de las mismas, ya sea a través de extracción de proteínas o de ARN total. También se pueden llevar a cabo tinciones, principalmente con faloidina, específica para citoesqueleto de actina, para evaluar las diferencias morfológicas.

5.4 Posibles problemas y soluciones durante el procedimiento

- Luego de cada paso es muy importante la remoción total de los restos del reactivo anterior. Hay casos en los que se aclara que es necesario lavar repetidas veces con agua. En el resto de los pasos en que el lavado no es necesario, y también luego del lavado es muy importante aspirar bien y secar con servilleta para eliminar el exceso. De este modo, cada reactivo se agrega en el orden correcto en que se espera que reaccione. Por ejemplo, si queda un exceso de 3-APTMS, en el próximo paso que es el agregado de

glutaraldehído, se puede formar un precipitado blanco y en ese caso es necesario desechar el cubreobjeto y comenzar nuevamente.

- Se recomienda el uso de parafilm sobre una placa p150 para contener mejor los líquidos que se utilizan, aunque se pueden probar otras variantes.
- Mantener siempre la cara tratada del cubreobjeto hacia arriba, para que en el momento del agregado del gel que debe polimerizar, el mismo se adhiera a la superficie. Si el gel se resbala, probablemente esté sobre la cara incorrecta.
- Los geles más rígidos polimerizan en menos tiempo que los geles blandos. De todas formas, se recomienda no esperar demasiado para evitar que se rompa el gel.
- Es importante el uso de una solución de proteína de matriz extracelular (en este caso colágeno) de la concentración especificada, ya que soluciones más diluidas pueden no ser suficientes para la unión celular. Mientras que soluciones más concentradas pueden ser contraproducentes, formando precipitados que “secuestran” una gran proporción de las células sembradas y no permiten una correcta interpretación de resultados.

9. REFERENCIAS

1. Schedin, P. and P.J. Keely, *Mammary gland ECM remodeling, stiffness, and mechanosignaling in normal development and tumor progression*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(1): p. a003228.
2. Ristimaki, A., et al., *Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer*. Cancer Res, 2002. **62**(3): p. 632-5.
3. Li, F., et al., *Cellular mechanism of mechanotranscription in colonic smooth muscle cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012. **303**(5): p. G646-56.
4. Esbona, K., et al., *COX-2 modulates mammary tumor progression in response to collagen density*. Breast Cancer Res, 2016. **18**(1): p. 35.
5. Kadow, C.E., et al., *Polyacrylamide hydrogels for cell mechanics: steps toward optimization and alternative uses*. Methods Cell Biol, 2007. **83**: p. 29-46.
6. Cretu, A., P. Castagnino, and R. Assoian, *Studying the effects of matrix stiffness on cellular function using acrylamide-based hydrogels*. J Vis Exp, 2010(42).
7. Aslakson, C.J. and F.R. Miller, *Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor*. Cancer Res, 1992. **52**(6): p. 1399-405.
8. Klein, Eric A. et al., *Cell adhesion, cellular tension, and cell cycle control*. Methods in Enzymology, 2007. **426**: p. 155-175.
9. Fung YC, *Biomechanics: mechanical properties of living tissues*. Springer (1993)

10. Ramião, N.G., Martins, P.S., Rynkevic, R. et al. Biomech Model Mechanobiol (2016). doi:10.1007/s10237-016-0763-8

10. HISTORIA

Documento: Nuevo

11. ANEXOS

I. Preparación de NaOH 0,1 M

Para 200 ml de solución, diluir 0,7999 gr de NaOH en 200 ml de Agua destilada.

II. Preparación de Acrilamida 40%

Para 50 ml de solución, diluir 20 gr de acrilamida en agua destilada.

III. Preparación de Bis-Acrilamida 1%

Para 50 ml de solución, diluir 0,5 gr de bis-acrilamida en agua destilada.

IV. Preparación de APS 10%

Para 3 ml de solución, diluir 0,3 gr de persulfato de amonio en agua bidestilada.

V. Preparación de glutaraldehído 0,5%

Partiendo de glutaraldehído 25%, para 50 ml de solución diluir 1 ml de dicho glutaraldehído en 49 ml de agua bidestilada.

VI. Preparación de Surfasil 10% en cloroformo

Para 30 ml de solución, diluir 3 ml en 27 ml de cloroformo.

VII. Preparación de solución satura de NHS en cloroformo

A 10 ml de cloroformo agregar NHS hasta observar saturación de la solución

9.2.3. EXTRACCIÓN DE ARN Y/O PROTEINAS DE CÉLULAS CRECIDAS SOBRE SOPORTE DE RIGIDEZ VARIABLE

 	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR	
Código del documento: LAB-PFI-003	Versión: 00	Fecha: 01-10-2017
Título del documento: EXTRACCIÓN DE ARN Y/O PROTEINAS DE CÉLULAS CRECIDAS SOBRE SOPORTE DE RIGIDEZ VARIABLE		

1. PROPÓSITO

Los procedimientos contenidos en la presente POE se utilizan para llevar a cabo la extracción de ARN y/o proteínas de células crecidas sobre soportes de cultivo de rigidez variable, con el objetivo de tomar muestras para luego evaluar cambios en la expresión génica mediante otras técnicas.

2. ALCANCE

Los procedimientos descriptos a lo largo de este POE deben ser implementados por todos aquellos (alumnos, docentes, técnicos y/o investigadores) que con distintos fines, educativos o de investigación, deban llevar a cabo la extracción de proteínas y/o ARN total a partir de líneas celulares en cultivo.

3. RESPONSABILIDAD

Alumnos	<u>Todo alumno involucrado es responsable de:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Conocer, entender y aplicar los procedimientos aquí descriptos. • Desarrollar los procedimientos de forma manual llevando a cabo el manejo del instrumental de laboratorio. • Aplicar las normas de estandarización del trabajo de laboratorio. • Poner en práctica normas de bioseguridad.
Docentes	<u>Todo docente involucrado es responsable de:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Conocer, entender y explicar los procedimientos aquí descriptos • Acompañar y guiar a los alumnos durante el desarrollo de las actividades. • Estimular la capacidad del alumno de evaluar el resultado de una experiencia y sugerir cambios en parámetros y condiciones experimentales que los acerquen a resultados confiables.

	<ul style="list-style-type: none"> Promover el trabajo riguroso en el laboratorio.
Técnicos de laboratorio	<p><u>Todo técnico de laboratorio involucrado es responsable de:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Proveer el material de laboratorio y reactivos necesarios para llevar a cabo el procedimiento Preparar las soluciones que se utilizan (si fuera necesario) Conocer las normas de bioseguridad y actuar conforme a lo establecido en caso de haber algún incidente
Investigadores	<p><u>Todo investigador involucrado es responsable de:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Conocer, entender y aplicar los procedimientos aquí descriptos Consultar la bibliografía relacionada en caso de querer ajustar las condiciones acorde a su línea de investigación Conocer y aplicar las normas de bioseguridad

4. SALUD, SEGURIDAD Y MEDIO AMBIENTE

- **TRIS-HCL:** Irritante. Causa irritación en los ojos, piel y sistema respiratorio. Para su manipulación se recomienda el uso de guantes.
- **SDS:** Solido inflamable y tóxico por inhalación e ingesta (nocivo), causa irritación por contacto tanto a nivel cutáneo como respiratorio. Durante su manipulación se recomienda evitar la formación de polvo, acercarlo a llamas u otra fuente de calor. Trabajar con guantes y barbijo.
- **DTT:** Nocivo en caso de ingesta, contacto con la piel o inhalación. Se recomienda manipulación con guantes; no hay peligro si se manipula de forma adecuada.
- **TRIZOL (Invitrogen).** Tóxico y mutagénico. Puede causar toxicidad al entrar en contacto con la piel, ojos, ingesta, inhalación; así también irritación y quemaduras. Hay que manipularlo con cuidado y utilizando siempre guantes, gafas y máscara de protección.
- **CLOROFORMO.** Tóxico, irritante, carcinógeno y nocivo. Para una manipulación segura debe de trabajarse bajo campana extractora y con guantes.
- **ALCOHOL ISOPROPILICO.** Inflamable. Este reactivo puede ocasionar irritación al estar en contacto con los ojos y la piel. Manipular con cuidado y el equipo de protección adecuado (guantes, gafas)

5. PROCEDIMIENTO

5.1 Generalidades

El perfil de expresión de proteínas que presenta una célula en determinado momento depende del conjunto de genes que se estén activando y esto está relacionado directamente con las señales que recibe la célula, de su micro ambiente y de las características celulares que le son propias. Para evaluar la expresión génica por tanto podemos trabajar a nivel de ARN y/o proteínas llevando a cabo una RT-PCR y/o un Western Blot respectivamente. Por tanto, la extracción de ARN y/o proteínas es un procedimiento muy utilizado en los laboratorios de biología molecular.

Extracción de Proteínas (5.2)

Existen diversos métodos para ello que dependen tanto del material de procedencia como de la localización de las proteínas en la célula. Si la proteína se localiza en el citosol, su liberación sólo requiere la apertura de la célula por ruptura (lisis), el método más sencillo y suave de efectuar.

El método al cual se va a hacer foco en esta POE es la extracción de proteínas totales utilizando el buffer reductor de Laemmli. Este último está compuesto por los siguientes reactivos (acompañados de su función):

- Tris-HCl 12 Mm: tampón que mantiene el pH entre 7-9.
- Glicerol 5%: incrementa la densidad de la muestra por lo que puede entrar correctamente en la calle del gel de poliacrilamida donde luego van a separarse las proteínas por peso molecular.
- SDS 0,4%: permite la permeabilización de la membrana celular como la desnaturalización de las proteínas en su estructura primaria y al calentar la muestra a 100°C las recubre de cargas negativas.
- DTT 20 mM: agente reductor que rompe los enlaces disulfuro.
- Azul de Bromofenol 0,02%: colorante que permite visualizar claramente la entrada de la muestra en el well de gel y el frente de corrida durante la electroforesis
- Agua destilada.

Una vez realizada la extracción se recomienda el crackeo de la muestra a 100°C durante 5 minutos para garantizar la completa desnaturalización de las proteínas y la asignación a las mismas de cargas negativas.

Extracción de ARN total (5.3)

Los métodos para extracción de ARN se basan en el uso de desnaturalizantes fuertes como sales de guanidina para lisar la célula, solubilizar sus componentes y desnaturalizar las ARNasas endógenas simultáneamente. Las sales de guanidina como el isotiocianato de guanidina, son agentes caotrópicos que destruyen la estructura tridimensional de las proteínas. El uso de estas sales seguido de una extracción con fenol:cloroformo a bajo pH y otros pasos de purificación, permiten la separación del ARN (Chomczynski and Sacchi, 1997). Actualmente existen en el mercado, reactivos monofásicos como el TRIzol que ofrecen una solución rápida y fácil para la primera parte del proceso. Estos contienen el agente caotrópico junto con fenol acidificado, de modo que sólo basta con resuspender la muestra deseada en un

determinado volumen y agregar cloroformo. Así, aparecen dos fases (acuosa y orgánica) quedando el ARN en la fase acuosa, el cual se recupera por precipitación con alcohol isopropílico.

5.2 Extracción de proteínas totales de células crecidas sobre soportes de rigidez variable

5.2.1. Reactivos y materiales

- Parafilm
- Micropipetas
- Tips
- Tubos Eppendorfs 15, ml
- Guantes
- Hielo
- Congelito pequeño
- Marcador de punta fina
- Termomixer a 100°C
- Buffer reductor 1X
- Cultivo de células crecidas sobre soportes de rigidez variable
- PBS 1X
- Pipeteador automático
- Pipetas descartables
- Campana de Flujo Laminar. Bioseguridad 1
- Etanol 70%

5.2.2. Consideraciones antes de comenzar

Antes de comenzar se debe esterilizar con etanol 70% la superficie de trabajo y entrar los materiales y reactivos necesarios a la campana de flujo laminar.

5.2.3 Metodología

- 1) Pegar un rectángulo de parafilm del tamaño necesario sobre la superficie horizontal de la campana de flujo laminar.
- 2) Retirar el medio de cultivo de las células plaquedas sobre soportes de rigidez variable.
- 3) Lavar dos veces con PBS
- 4) Colocar sobre el parafilm 150 µl de Buffer de lisis reductor 1X.
- 5) Tomar con pinzas el cubreobjeto donde están adheridas las células y colocarlo boca abajo (con las células hacia abajo) sobre el buffer de lisis reductor 1X.
- 6) Incubar 1 minuto.
- 7) Retirar el cubreobjeto y repetir los pasos 5 y 6 con las otras réplicas técnicas de la misma condición.

- 8) Traspasar con micropipeta el extracto de proteínas totales a un tubo eppendorf limpio y estéril previamente rotulado.
- 9) Incubar durante 5 minutos los extractos de proteínas a 100°C
- 10) Almacenar a -20°C hasta su utilización.

5.3 Extracción de ARN total de células crecidas sobre soportes de rigidez variable

5.3.1 Reactivos y Materiales

- Parafilm
- Micropipetas
- Tips
- Tubos Eppendorfs 1,5 ml
- Guantes
- Hielo
- Congelito pequeño
- Marcador de punta fina
- TRIzol
- Cloroformo
- Cultivo de células crecidas sobre soportes de rigidez variable
- Microcentrífuga
- Pipeteador automatico
- Pipetas descartables
- Campana de Flujo Laminar. Bioseguridad 1
- Etanol 75%
- Isopropanol
- Agua ARNasa, ADNasa free
- Freezer -70°C

5.3.2 Consideraciones antes de comenzar

Antes de comenzar se debe esterilizar con etanol 70% la superficie de trabajo y entrar los materiales y reactivos necesarios a la campana de flujo laminar. También se recomienda rociar las superficies e implementos de trabajo con “RNase away” o productos similares, para asegurarse la eliminación de cualquier ARNasa. Trabajar siempre con guantes.

5.3.3 Metodología

- 1) Retirar el medio de cultivo de cada well y descartar

- 2) Lavar dos veces con PBS
- 3) Agregar 1 ml de TRIzol e incubar 5 minutos a temperatura ambiente
- 4) Homogeneizar la suspensión suavemente (pipetear up and down con p1000)
- 5) Tomar todo el volumen y pasar el extracto al siguiente well, correspondiente a la segunda réplica técnica dentro de la misma condición. Repetir la incubación de 5 minutos, homogeneizar y pasar a la tercera réplica técnica.
- 6) Tomar todo el volumen de la última réplica y pasar la muestra así obtenida a un eppendorf estéril. En este paso se puede guardar a -80°C para proseguir otro día o bien, continuar con la extracción.
- 7) Agregar 200 μL de cloroformo por 1ml de TRIzol. Agitar vigorosamente por 15 segundos.
- 8) Incubar unos minutos (2 a 3) a TA. Centrifugar a 12000g por 15 minutos a 2°C a 8°C
- 9) Trasferir la fase acuosa (la de arriba) a un tubo fresco. No tocar la interfase (Guardar la parte orgánica si se desea separar ADN o proteínas más tarde)
- 10) Agregar 500 μl de isopropanol
- 11) Incubar por 10 minutos a 15°C a 30°C . Centrifugar a 12000g por 10 minutos a 2°C a 8°C
- 12) Remover sobrenadante. Lavar el pellet de ARN: agregar 1ml de etanol 75%
- 13) Vortexear y centrifugar a no más de 7500g por 5 minutos a 2 a 8°C .
- 14) Descartar sobrenadante. Secar al aire por 5 a 10 minutos.
- 15) Resuspender el ARN en agua ARNasa free pipeteando up and down. Incubar por 10 minutos a $55-60^{\circ}\text{C}$. Guardar en -70°C para uso futuro.

5.4 Almacenamiento de las muestras de proteína y/o ARN

- Las muestras de proteína pueden almacenarse a -20°C hasta el momento de ser utilizadas.
- Las muestras de ARN pueden almacenarse a -70°C hasta el momento de ser utilizadas.

5.5 Resultados

- Se obtiene un lisado de proteínas totales, de coloración azul (debido a la presencia de azul de bromofenol en el buffer reductor). Las mismas ya se encuentran desnaturalizadas y listas para correr un gel SDS-PAGE (ver **POE Electroforesis en Geles Desnaturalizantes de Poliacrilamida**), ya sea con el objetivo de visualizar y cuantificar la cantidad de proteína total de las muestras (ver **POE Cuantificación de Proteínas por SDS-PAGE**) o para hacer un western blot y buscar una proteína en particular (ver **POE Western Blot**).
- Se obtiene ARN total concentrado en el volumen de elución final. El mismo puede ser cuantificado por espectrofotometría (recomendable) y visualizado en un gel de agarosa. Asimismo, está listo para aplicaciones sucesivas, como por ejemplo RT-PCR y/o RT-qPCR para identificar la expresión de un ARNm particular.

<h3>5.6 Posibles problemas y soluciones durante el procedimiento</h3>

- Extracción de proteínas:
 - Formación de burbujas: Pipetear cuidadosamente para evitar la formación ya que se reduce el volumen de muestra disponible.
- Extracción de ARN:
 - Bajo rendimiento/poco ARN: la homogeneización o lisis pueden haber sido incompletas. Bajar la cantidad de muestra de partida en caso de que sea demasiada para la cantidad de TRIzol utilizada o por el contrario ajustar la cantidad de TRIzol utilizado.
 - Poco ARN al finalizar: si el pellet no se redisolvió completamente, intentar homogeneizar nuevamente pipeteando up and down y llevando a 50-60°C
 - ARN contaminado: asegurarse siempre de tomar la fase acuosa (la de arriba) y evitar tomar líquido de la interfase o de la fase orgánica.

6. REFERENCIAS

- Cretu, A., P. Castagnino, and R. Assoian, Studying the effects of matrix stiffness on cellular function using acrylamide-based hydrogels. *J Vis Exp*, 2010(42).
- Guía de trabajos prácticos de la materia Ingeniería Genética II en el marco del cuarto de año de la carrera de Biotecnología, Fundación UADE. 2015.
- Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970. 227(5259): p. 680-5.
- Molecular Cloning – A Laboratory Manual. Sambrook, J. 4ta edición.

7. HISTORIA

Documento: Nuevo

8. ANEXO

I. Preparación de PBS 1X

A partir de Sobres de PBS en polvo

Diluir el contenido del sobre en 1 lt de agua destilada. Alicuotar en botellas Shoot y esterilizar por autoclave.



PBS casero

- i. Pesar en un vaso de precipitados de 1 Lt:
 - 8 gr-----NaCl
 - 0,2gr-----KCl
 - 0,2 gr-----KH₂PO₄
 - 1,15 gr----Na₂HPO₄anhídrida
- ii. Agregar agua bidestilada hasta alcanzar 1 lt.
- iii. Alicuotar en botellas shoot y esterilizar por autoclave

II. Preparación de buffer reductor Laemmli 1X

- 0,12 ml-----Tris-HCl 1M
- 1 ml-----Glicerol 50%
- 0,4 ml-----SDS 10%
- 0,1 ml-----DTT 2M
- 0,2 ml-----Azul de bromofenol 1%
- 8,18 ml ----- Agua destilada

9.2.4. TINCION CELULAR CON FALOIDINA Y REACTIVO DE HÖESCHT

 		PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR	
Código del documento: LAB-PFI-004		Versión: 00	Fecha: 01-10-2017
Título del documento: TINCION CELULAR CON FALOIDINA Y REACTIVO DE HÖESCHT			

1. PROPÓSITO

Los procedimientos contenidos en el presente POE se utilizan para llevar a cabo tinciones subcelulares, con el objetivo de evaluar la morfología de la línea celular en estudio y/o de determinar la presencia de contaminación por micoplasma, ya sea como ensayo de caracterización de la línea así como también para evaluar el impacto de una variable de interés.

2. ALCANCE

Los procedimientos descriptos a lo largo de este POE deben ser implementados por todos aquellos (alumnos, docentes, técnicos y/o investigadores) que con distintos fines, educativos o de investigación, deban llevar a cabo tinciones subcelulares para observar en microscopía de fluorescencia.

3. RESPONSABILIDAD

Alumnos	<p><u>Todo alumno involucrado es responsable de:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Conocer, entender y aplicar los procedimientos aquí descriptos. • Desarrollar los procedimientos de forma manual llevando a cabo el manejo del instrumental de laboratorio. • Aplicar las normas de estandarización del trabajo de laboratorio. • Poner en práctica normas de bioseguridad.
Docentes	<p><u>Todo docente involucrado es responsable de:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Conocer, entender y explicar los procedimientos aquí descriptos • Acompañar y guiar a los alumnos durante el desarrollo de las actividades. • Estimular la capacidad del alumno de evaluar el resultado de una experiencia y sugerir cambios en parámetros y condiciones experimentales que los acerquen a resultados confiables.

	<ul style="list-style-type: none"> Promover el trabajo riguroso en el laboratorio.
Técnicos de laboratorio	<p><u>Todo técnico de laboratorio involucrado es responsable de:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Proveer el material de laboratorio y reactivos necesarios para llevar a cabo el procedimiento Preparar las soluciones que se utilizan (si fuera necesario) Conocer las normas de bioseguridad y actuar conforme a lo establecido en caso de haber algún incidente
Investigadores	<p><u>Todo investigador involucrado es responsable de:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Conocer, entender y aplicar los procedimientos aquí descriptos Consultar la bibliografía relacionada en caso de querer ajustar las condiciones acorde a su línea de investigación Conocer y aplicar las normas de bioseguridad

4. SALUD, SEGURIDAD Y MEDIO AMBIENTE

- **PARAFORMALDEHIDO:** Inflamable. Nocivo en caso de inhalación e ingestión. Causa irritación y quemaduras en ojos y piel. Usar guantes.
- **TWEEN 20:** Puede generar irritación leve en ojos y piel.
- **FALOIDINA:** Nocivo en caso de ingestión e inhalación. Causa irritación en ojos y piel. Usar guantes.

5. PROCEDIMIENTO

5.1 Generalidades

Ciertas moléculas, en virtud de su estructura química, tienen la capacidad de emitir luz a longitudes de onda específicas luego de la absorción de una longitud de onda menor y de mayor energía. Este proceso es llamado fluorescencia y las moléculas que exhiben este comportamiento se denominan fluorocromos. Todos los fluorocromos tienen un espectro de absorción y de emisión de luz característico. Luego de la absorción de fotones de la longitud de onda de excitación, los fluorocromos se excitan a un estado mayor e inestable de energía. Esta inestabilidad se traduce posteriormente en la emisión de fotones de una menor energía a una menor longitud de onda.

Un fluorocromo puede interactuar con un componente celular -ya sea en forma directa o conjugado a otra sustancia capaz de unirse a estructuras celulares, como por ejemplo un anticuerpo que reconoce de forma específica una proteína. Este fluorocromo puede ser

utilizado en el laboratorio para detectar mediante microscopía componentes subcelulares específicos.

La principal proteína que compone el citoesqueleto de una célula es la actina. Los filamentos de actina pueden ser fácilmente marcados utilizando las falotoxinas (aisladas del hongo Amanita) unidas a un fluorocromo. El miembro más común de esta familia de compuestos tóxicos es la faloidina. La faloidina se une selectivamente y estabiliza los filamentos de actina polimerizados, no así a la actina monomérica. Esta propiedad convierte a la faloidina en un compuesto más útil para la visualización del esqueleto celular en lugar de utilizar anticuerpos acoplados a fluorocromos.

La faloidina se obtiene comercialmente como un polvo liofilizado y es reconstituida en metanol o DMSO (dimetilsulfóxido). Las células son impermeables a la faloidina, por lo que los tejidos o células a ser marcadas deben ser fijadas y posteriormente permeabilizadas con un detergente (ej: Tritón). Las células a ser marcadas deben ser fijadas con aldehídos (ej; paraformaldehído) o acetona helada, pero no con metanol, ya que éste destruye los sitios de unión de la faloidina a la actina.

La tinción fluorescente de los ácidos nucleicos de las células es una práctica frecuente y muy útil como contratinción para apreciar la arquitectura celular a la hora de determinar el estado del ciclo celular de células individuales, para realizar dobles tinciones o para determinar 2 poblaciones celulares en un tejido en función de la morfología nuclear. Hay una gran cantidad de fluorocromos que se unen de manera específica al ADN. El fluorocromo bisbenzimidazol colorante de Hoescht, se une con alta afinidad al ADN, además de ser altamente fotoestable. Las células son permeables a este fluorocromo que posee una longitud de onda de 370 nm y emisión alrededor de 450 nm.

Otro uso muy común de la tinción nuclear es aquel para determinar la presencia de microorganismos en cultivos celulares como el micoplasma. Este tipo de contaminación no puede ser detectada simplemente al observar las células por microscopio, pero sí puede detectarse mediante tinción fluorescente. A través de este método se logra ver a los micoplasmas, si es que se encuentran presentes, como filamentos delgados en el citoplasma de las células, al ser observadas en una magnificación de 400X. A pesar de que el núcleo de las células deseadas también se tiñe, se diferencian de la contaminación por su mayor tamaño.

5.2 Preparación

5.2.1. Reactivos y materiales

- Pinzas
- Juego de pipetas, p1000, p200, p20, p10
- Tips amarillos, azules y blancos en racks
- Tubos Eppendorf de 1.5 ml
- Aguja curva
- Paraformaldehído 4%

- PBS 1X (Ver anexo I)
- Triton X-100 0,1% en PBS ó Tween 20 (Ver Anexo II)
- Faloidina
- Reactivo de Hoescht
- Parafilm
- Papel aluminio
- Gelvatol / Mowiol
- Portaobjetos
- Esmalte transparente
- Microscopio de fluorescencia

5.2.2 Metodología

- a. Retirar el medio de cultivo de cada well.
- b. Agregar 2 ml de paraformaldehido 4% a la monocapa celular.
- c. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- d. Realizar dos lavados con PBS de 5 minutos.
- e. Permeabilizar las células incubándolas 5 minutos con 0,1% de Triton X-100 en PBS.
También puede utilizarse Tween 20
- f. Lavar dos veces con PBS.
- g. A partir de este punto los cultivos deben de protegerse de la luz: agregar 50 µl de Faloidina y 10 µl de Hoescht; mezclar en parafilm y poner las células de cara al colorante.
- h. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente y cubierto con un papel de aluminio que no deje pasar la luz.
- i. Retirar los colorantes.
- j. Realizar dos lavados con PBS de 5 minutos.
- k. Observar con microscopio de fluorescencia la tinción para rectificar que los lavados hayan sido adecuados. Si están bien lavados por tanto se procede a seguir con el protocolo, caso contrario se repiten los lavados.
- l. Colocar una gota de gelvatol (Manitol) en un portaobjetos.
- m. Retirar los cubreobjetos con las células del MW con pinzas y montar boca abajo sobre la gota de gelvatol.
- n. Dejar secar
- o. Sellar con esmalte transparente
- p. Observar al microscopio de fluorescencia y tomar fotografías con ambos filtros en el mismo campo.

5.2 Almacenamiento

Los preparados sellados adecuadamente pueden mantenerse durante varios meses, guardados en un lugar seco, oscuro y a temperatura ambiente. Aunque se recomienda observar y tomar fotos de ser necesario, inmediatamente o poco tiempo después de haber hecho la técnica.

5.3 Resultados

Se obtienen imágenes en las que se puede apreciar el citoesqueleto de actina (*Figura 1A*) y/o el núcleo celular (*Figura 1B*).

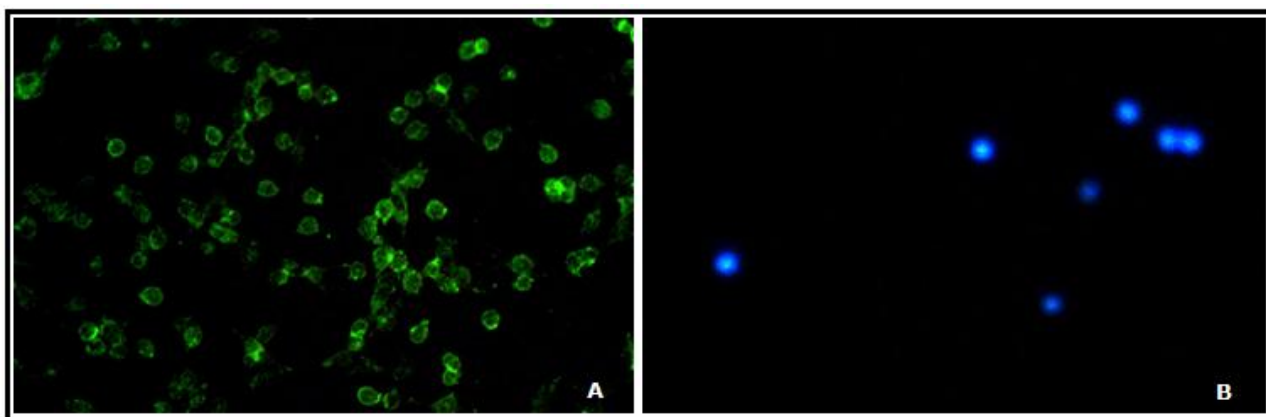


Figura 1. Microscopia de fluorescencia para citoesqueleto y núcleo celular. (A) Se observa el citoesqueleto de actina mediante la tinción con Faloidina. (B) Se observan los núcleos celulares mediante tinción con Colorante de Hoescht

Posibles problemas y soluciones durante el procedimiento

- Ausencia de tinción:
 - Chequear estado de los reactivos
 - Asegurarse de que los lavados no sean muy agresivos
 - Respetar los tiempos de incubación y el orden de agregado de reactivos
 - Asegurarse de que los cubreobjetos con las células estén al resguardo de la luz a partir del momento de la adición de los fluorocromos
 - Chequear el uso de los filtros correctos en el microscopio de fluorescencia
- Demasiada tinción:
 - Antes de sellar, repetir los lavados para eliminar exceso de fluorocromos y así bajar la intensidad de la señal
 - Ajustar la nitidez de la imagen a nivel del microscopio, de la cámara del mismo, o del software

6. REFERENCIAS

Guía de trabajos prácticos de la materia Cultivos Celulares, en el marco del cuarto año de la Licenciatura en Biotecnología.

7. **HISTORIA**

Documento: Nuevo

8. **ANEXOS**

I. **Preparación de PBS 1X**

A partir de Sobres de PBS en polvo

Diluir el contenido del sobre en 1 lt de agua destilada. Alicuotar en botellas Shoot y esterilizar por autoclave.



PBS casero

- i. Pesar en un vaso de precipitados de 1 Lt:
 - 8 gr-----NaCl
 - 0,2gr-----KCl
 - 0,2 gr-----KH₂PO₄
 - 1,15 gr----Na₂HPO₄anhídrida
- ii. Agregar agua bidestilada hasta alcanzar 1 lt.
- iii. Alicuotar en botellas shoot y esterilizar por autoclave

II. **Preparación de Tween-20 0,1%**

Para 50 ml, diluir 50 µl de Tween-20 en 49,950 ml de PBS 1X.

9.2.5. ELECTROFORESIS EN GELES DESNATURALIZANTES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

 		PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR	
Código del documento: LAB-PFI-005		Versión: 00	Fecha: 01-10-2017
Título del documento: ELECTROFORESIS EN GELES DESNATURALIZANTES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)			

1. PROPÓSITO

Los procedimientos contenidos en la presente POE se utilizan para la separación de proteínas en función de su peso molecular por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida partiendo de un extracto de proteína total o de proteínas purificadas para por ejemplo evaluar expresión mediante Western Blot o estimar la concentración de alguna de ellas mediante densitometría.

2. ALCANCE

Los procedimientos descriptos a lo largo de este POE deben ser implementados por todos aquellos (alumnos, docentes, técnicos y/o investigadores) que con distintos fines, educativos o de investigación, deban llevar a cabo la separación de proteínas en función de su peso molecular por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.

3. RESPONSABILIDAD

Alumnos	<p><u>Todo alumno involucrado es responsable de:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Conocer, entender y aplicar los procedimientos aquí descriptos. • Desarrollar los procedimientos de forma manual llevando a cabo el manejo del instrumental de laboratorio. • Aplicar las normas de estandarización del trabajo de laboratorio. • Poner en práctica normas de bioseguridad.
Docentes	<p><u>Todo docente involucrado es responsable de:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Conocer, entender y explicar los procedimientos aquí descriptos • Acompañar y guiar a los alumnos durante el desarrollo de las actividades. • Estimular la capacidad del alumno de evaluar el resultado de una experiencia y sugerir cambios en parámetros y condiciones experimentales que los acerquen a resultados confiables. • Promover el trabajo riguroso en el laboratorio.

Técnicos de laboratorio	<p><u>Todo técnico de laboratorio involucrado es responsable de:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Proveer el material de laboratorio y reactivos necesarios para llevar a cabo el procedimiento • Preparar las soluciones que se utilizan (si fuera necesario) • Conocer las normas de bioseguridad y actuar conforme a lo establecido en caso de haber algún incidente
Investigadores	<p><u>Todo investigador involucrado es responsable de:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Conocer, entender y aplicar los procedimientos aquí descriptos • Consultar la bibliografía relacionada en caso de querer ajustar las condiciones acorde a su línea de investigación • Conocer y aplicar las normas de bioseguridad

4. SALUD, SEGURIDAD Y MEDIO AMBIENTE

- **ACRILAMIDA:** Nocivo en caso de inhalación e ingestión. Usar guantes.
- **BISACRILAMIDA:** Nocivo en caso de inhalación e ingestión. Usar guantes.
- **APS:** Nocivo en caso de inhalación e ingestión. Causa enrojecimiento e irritación en ojos y piel. En caso de contacto con los ojos lavar inmediata y constantemente con abundante agua y acudir a un médico. Usar guantes y gafas protectoras.
- **TEMED:** Inflamable. Nocivo en caso de ingestión e inhalación. Provoca quemaduras graves en piel y lesiones oculares graves. En caso de contacto con los ojos lavar inmediata y constantemente con abundante agua y acudir a un médico. Usar guantes y gafas protectoras.
- **TRIS:** Irritante. Causa irritación en los ojos, piel y sistema respiratorio. Para su manipulación se recomienda el uso de guantes, barbijo y gafas protectoras para evitar la entrada en contacto con el organismo.
- **GLICINA.**
- **SDS:** Solido inflamable y tóxico por inhalación e ingesta (nocivo), causa irritación por contacto tanto a nivel cutáneo como respiratorio. Durante su manipulación se recomienda evitar la formación de polvo, acercarlo a llamas u otra fuente de calor. Trabajar con guantes y barbijo.
- **TRIS-HCL:** Irritante. Causa irritación en los ojos, piel y sistema respiratorio. Para su manipulación se recomienda el uso de guantes
- **DTT:** Nocivo en caso de ingesta, contacto con la piel o inhalación. Se recomienda manipulación con guantes; no hay peligro si se manipula de forma adecuada.
- **ÁCIDO ACÉTICO:** Inflamable y corrosivo. Puede provocar quemaduras graves y la toxicidad se relaciona con sus propiedades altamente corrosivas. Se recomienda su

manipulación con guantes y evitar la inhalación del mismo como así también evitar el contacto con bases y sustancias oxidantes.

- **COOMASIE BLUE.** Nocivo e irritante. Se debe trabajar con guantes impermeables y con gafas.
- **METANOL.** Inflamable y toxico en caso de ingesta, inhalación o contacto con la piel. Para su manipulación se recomienda el uso de guantes y mantenerlo alejado de fuentes de calor.

5. PROCEDIMIENTO

5.1 Generalidades

En esta POE se refiere únicamente a los geles de poliacrilamida desnaturalizantes y de sistema buffer discontinuo. El SDS-PAGE es una variante de la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) que sólo separa a las proteínas por su peso molecular. El gel de PAGE es una malla que se forma por la polimerización inducida de los monómeros acrilamida y bis-acrilamida. La acrilamida tiende a formar polímeros lineales mientras que la bis-acrilamida por sus características químicas, permite la formación de ramas generando una red de tamaño de poro uniforme. La inducción de la polimerización está dada por TEMED y APS, ambos oxidantes. El tamaño del poro del gel puede ser regulado por la concentración relativa de los monómeros. Tras la polimerización de gel, la muestra es cargada en calles pequeñas o wells y la entrada al gel se produce por electroforesis. La electroforesis consiste en la aplicación de un campo eléctrico al gel el cual permite la migración de las proteínas cargadas a través del mismo. Para este tipo de gel (desnaturalizante), la migración depende de que las proteínas estén desnaturalizadas y cargadas negativamente por la exposición al detergente aniónico SDS. Esto permite que las propiedades eléctricas de las proteínas se hagan uniformes garantizando por tanto que la migración dependa solo del tamaño y no de la secuencia de aminoácidos. El SDS presente en el buffer de muestra o reductor, se intercala en la proteína cuando la misma esta desnaturalizada por temperatura impidiendo el replegamiento mientras que el SDS de los buffers mantiene el medio saturado.

Al tratarse de geles del tipo “sistema de buffer discontinuo”, los mismos se componen de dos tipos de geles:

- Gel stacking o de apilamiento: pH 6,8 y tamaño de poro amplio
- Gel running o de separación: pH 8,8 y tamaño de poro más pequeño.

La principal diferencia entre ellos además de la concentración de acrilamida y bis-acrilamida es el pH del buffer de cada gel. En este sistema, la muestra pasa primero por el gel stacking el cual con su pH alcalino permite la formación de un sándwich entre los iones cloruro, la proteína e iones glicina que concentra a las proteínas en una banda delgada. Cuando las proteínas entran en el gel running al aumentar el pH los iones glicina y cloruro migran por delante de las proteínas permitiendo que las mismas se separen en función de su tamaño.

La corrida del gel se hace a un voltaje constante alrededor de los 120 volt hasta que el frente de corrida llegue al final del mismo pero no se caiga. Una vez terminada la corrida, se llevara

a cabo la tinción del gel con Coomassie blue o la transferencia del mismo a una membrana de nitrocelulosa dependiendo de cuál es el objetivo final del ensayo cuantificación ó western blot.

El Coomassie Blue es un colorante que se une a los residuos básicos e hidrofóbicos de las proteínas en un medio alcalino con un límite de detección de 8 a 10 nanogramos para algunas proteínas mientras que de 25 nanogramos para otras. Tras la tinción (aproximadamente 1 hora) se debe llevar a cabo el lavado con solución desteñidora para eliminar los remanentes de colorante. El resultado final es un gel donde las proteínas se observan como bandas nítidas de color azul.

5.2 Preparación

5.2.1. Reactivos y materiales

- Juego de pipetas, p1000, p200, p20 y p10
- Tips azules, amarillos y blancos.
- Tubos Eppendorf de 1.5 ml
- Microcentrífuga
- Freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Guantes
- Etanol 70%
- Acrilamida/Bisacrilamida (Ver **Anexo I**)
- Peines para geles
- Soportes para armar geles
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)
- Persulfato de amonio (APS) 10% (Ver **Anexo II**)
- Extracto de proteína total en buffer reductor 1X ó muestras de proteína purificadas a analizar en buffer reductor 1X previamente crackeadas
- Fuente con agua
- Marcadores indelebles
- Vidrios con espaciadores de 1mm de espesor
- Cuba de electroforesis
- Fuente de poder
- Gradillas para tubos eppendorf y para falcon de 15 y 50 ml.
- Buffer de corrida 10x (Ver **Anexo III**)
- Buffer Stacking 4X (Ver **Anexo IV**)
- Buffer Separador 4X (Ver **Anexo V**)
- Agua destilada
- Solución de Tinción Coomassie Blue (Ver **Anexo VI**)
- Solución desteñidora para Coomassie Blue (Ver **Anexo VII**)

- Contenedor plástico pequeño

5.2.2. Consideraciones antes de comenzar

- Limpiar con etanol 70% la mesada y los materiales a utilizar.
- Recordar que los geles deben de manipularse con guantes ya que la acrilamida y bis acrilamida es neurotóxica.
- Determinar el porcentaje apropiado de acrilamida y bis-acrilamida para el gel separador o running. Por ejemplo para la correcta resolución de bandas de colágeno se recomienda utilizar un porcentaje de poliacrilamida de 7.5% mientras que para COX-2 12%

Rango efectivo de separación de proteínas en geles de poliacrilamida	
Rango de tamaños separables (kDa)	% acrilamida-bisacrilamida en el gel separador
36-205	5
24-205	7.5
14-205	10
14-66*	12.5
14-45*	15

las proteínas más grandes no se mueven significativamente en el gel

Tabla1: Rango de separación de proteínas en geles SDS-PAGE

5.2.3. Metodología

Preparación de los SDS-PAGE

- 1) Armar los vidrios para los geles colocando el vidrio con espaciador y el vidrio sin espaciador juntos y ajustan al soporte para el armado de geles
- 2) Rotular 2 falcon de 15 ml como: gel de stacking y gel separador
- 3) Agregar los componentes necesarios para cada gel de acuerdo a lo establecido en la tabla 2 (Todo menos el APS que se agrega último cuando los reactivos están correctamente mezclados).

Reactivo	Gel de stacking (5%)(μ l) (2geles)	Gel separador (12%) (μ l) (2geles)	Gel separador (7,5%) (μ l) (2 geles)
Agua bidestilada	3450	3580	4980
Acrilamida:Bisacrilamida (30:0.8 p/v)	830	3840	2400
Buffer de separación 4X	----	2500	2500
Buffer de stacking 4X	630	----	
TEMED	10	20	20
Persulfato de amonio (APS) 10%	50	60	60

- 4) Agregar APS a la solución del gel separador y colocar rápidamente la mezcla en el espacio que queda entre los vidrios; por encima agregar agua para no dejar el gel expuesto al ambiente y lograr una superficie pareja.
- 5) Esperar la completa polimerización. Chequear si el gel ha polimerizado observando lo que quedó en el Falcon de 15 ml y se retirará el agua por volcado. Secar bien con una toalla de papel.
- 6) Agregar APS al gel de stacking y colocar rápidamente por encima del gel separador.
- 7) Insertar rápidamente el peine de elección para que de lugar a las calles o wells.
- 8) Esperar la completa polimerización. Chequear si el gel ha polimerizado observando lo que quedo en el falcon de 15 ml.
- 9) Retirar el peine.

Siembra y corrida del SDS-PAGE

- 10) Preparar el buffer de corrida 1X por dilución del buffer de corrida 10X en agua destilada
- 11) Colocar el gel dentro de la cuba de electroforesis y llenar la misma con el volumen apropiado de buffer de corrida 1X.
- 12) Sembrar 5 ul del marcador de peso molecular
- 13) Sembrar 20 ul de muestra en cada calle.
- 14) Conectar la cuba a la fuente de poder y correr a 120 Volt durante 1 hora o hasta observar que el frente de corrida llegue al final del gel.
- 15) Finalizada la corrida, desmontar el sistema desechando el buffer de corrida.
- 16) Abrir cuidadosamente los vidrios y manipular con cuidado el gel.
- 17) Avanzar con la transferencia o la tinción con Coomassie Blue.

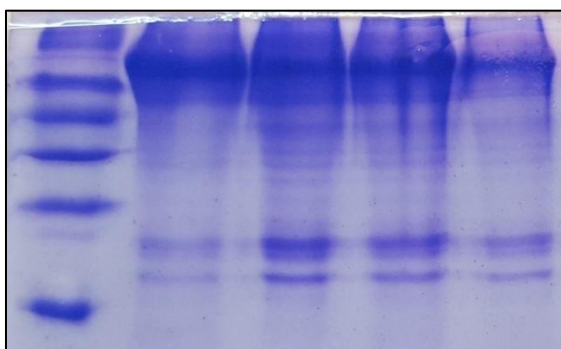
Tinción con Coomassie Blue

- 18) En un contenedor de plástico pequeño, colocar el gel.
- 19) Enjuagar con agua para retirar remanentes del buffer.
- 20) Agregar la solución de Coomassie Blue e incubar durante 1 hora.
- 21) Retirar la solución y realizar los lavados que sean necesarios con la solución desteñidora.

5.3. Resultados

Como resultado de este tipo de electroforesis se pueden obtener:

- A) SDS-PAGE teñido con Coomassie Blue:



B) SDS-PAGE para transferir a una membrana de nitrocelulosa

5.4. Posibles problemas y soluciones durante el procedimiento

- **Problemas en la preparación de los geles**

Dificultad en la polimerización de la solución de los geles: lenta o ausente. Se puede deber al olvido accidental de algún reactivo como por ejemplo el APS o el TEMED ó al mal estado de alguno de los reactivos incluyendo a la poliacrilamida.

Pocillos de los geles mal polimerizados. Puede dificultar la siembra de la muestra.

Polimerización irregular (no se obtiene una superficie lisa) del gel separador; esto suele ocurrir cuando se agrega agua, para evitar el contacto con el oxígeno, en forma brusca exclusivamente sobre una única sector del gel llevando a la aparición de irregularidades en el mismo. Se lo puede evitar agregando el agua en forma suave y pareja a lo largo de la superficie del gel y golpeando suavemente el soporte contra la mesada.

- **Problemas durante y después la corrida de la electroforesis**

Bajo voltaje durante la corrida: se puede deber a un mal estado de los buffers que no permiten la mantención del voltaje apropiado o puede haber una fuga de buffer por algún sitio como por ejemplo dentro de la cámara de electroforesis que lleva a que las calles del gel no estén cubiertas del mismo.

Bandas de proteínas difusas: pueden deberse a un alto voltaje durante la corrida como así también a una degradación de la muestra.

6. REFERENCIAS

- Guía de trabajos prácticos de la materia Ingeniería Genética II, en el marco del cuarto año de la licenciatura en Biotecnología, Fundación UADE. 2015

- ii. Mahamood, Tahriny Yang, Ping-Chang; “*Western Blot: Technique, theory and trouble shooting*”. N Am J Med Sci. 2012 Sep; 4(9): 429–434.
- iii. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
- iv. Sambrook J, Russell DW, *SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins*. Cold Spring Harb Protoc. 1 Septiembre 2006 (4)
- v. Roy, Suvra y Kumar ,Vikash; “*A Practical Approach on SDS PAGE for Separation of Protein*”. IJSR. Agosto 2014

7. HISTORIA

Documento: Nuevo

8. ANEXOS

I. Preparación de Solución de Acrilamida-BisAcrilamida (30 acrilamida -0,8% bisacrilamida p/v)

29,2 gr-----Acrilamida
 0,8 gr-----Bis-Acrilamida
 Agua bidestilada c.s.p 100 ml

Utilizar guantes, barbijos y lentes ya que la acrilamida monomérica es neurotóxica y muy volátil.

Guardar en heladera

II. Preparación de APS 10%

0,5 gr de persulfato de amonio en 5 ml de agua bidestilada.
 Alicuotar en eppendorf de a 1 ml y guardar a -20°C

III. Preparación de Buffer de corrida 10X

30 gr -----Tris (250 mM)
 144 gr ---- Glicina (1920 mM)
 10 gr----- SDS (10%)
 Agua bidestilada c.s.p1 Lt.
 Ajustar pH a 8,3

IV. Preparación de Buffer stacking 4X

3 gr Tris en 20 ml de agua bidestilada
 Agregar HCl hasta pH 6.8
 2 ml de SDS 10%
 Agua bidestilada c.s.p 50 ml
 Puede guardarse a T.A o en heladera

V. Preparación de Buffer de separación 4X

9,1 gr Tris en 20 ml de agua bidestilada.
Agregar HCl hasta pH 8,8
2 ml de SDS 10%
Agua bidestilada c.s.p 50 ml
Puede guardarse a T.A o en heladera

VI. Preparación de Solución de Tinción Coomasie Blue

0,25 gr-----Coomasie Blue
10 ml-----Ácido acético
45 ml-----Etanol o metanol
Agua bidestilada c.s.p 100 ml
Esta solución se guarda en frasco de color caramelo y tras cada uso se puede recuperar y reusar nuevamente.

VII. Preparación de Solución de Desteñido para Coomasie Blue

20 ml-----Metanol
15 ml-----Ácido acético glacial
65 ml-----Agua bidestilada
Esta solución se puede recuperar y reusar nuevamente.

9.2.6. CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS POR SDS-PAGE

 		PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR	
Código del documento: LAB-PFI-006		Versión: 000	Fecha: 01-10-2017
Título del documento: CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS POR SDS-PAGE			

1. PROPÓSITO

Los procedimientos contenidos en el presente POE se utilizan para cuantificar proteínas con geles de poliacrilamida SDS-PAGE a partir de la comparación con una curva patrón y un posterior análisis de densitometría con un software adecuado.

2. ALCANCE

Los procedimientos descriptos a lo largo de este POE deben ser implementados por todos aquellos (alumnos, docentes, técnicos y/o investigadores) que con distintos fines, educativos o de investigación, deban llevar a cabo una cuantificación de proteínas.

3. RESPONSABILIDAD

Alumnos	<p><u>Todo alumno involucrado es responsable de:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Conocer, entender y aplicar los procedimientos aquí descriptos. • Desarrollar los procedimientos de forma manual llevando a cabo el manejo del instrumental de laboratorio. • Aplicar las normas de estandarización del trabajo de laboratorio. • Poner en práctica normas de bioseguridad.
Docentes	<p><u>Todo docente involucrado es responsable de:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Conocer, entender y explicar los procedimientos aquí descriptos • Acompañar y guiar a los alumnos durante el desarrollo de las actividades. • Estimular la capacidad del alumno de evaluar el resultado de una experiencia y sugerir cambios en parámetros y condiciones experimentales que los acerquen a resultados confiables. • Promover el trabajo riguroso en el laboratorio.
Técnicos de laboratorio	<p><u>Todo técnico de laboratorio involucrado es responsable de:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Proveer el material de laboratorio y reactivos necesarios para llevar

	<p>a cabo el procedimiento</p> <ul style="list-style-type: none"> • Preparar las soluciones que se utilizan (si fuera necesario) • Conocer las normas de bioseguridad y actuar conforme a lo establecido en caso de haber algún incidente
Investigadores	<p><u>Todo investigador involucrado es responsable de:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Conocer, entender y aplicar los procedimientos aquí descriptos • Consultar la bibliografía relacionada en caso de querer ajustar las condiciones acorde a su línea de investigación • Conocer y aplicar las normas de bioseguridad

4. SALUD, SEGURIDAD Y MEDIO AMBIENTE

- **ACRILAMIDA:** Nocivo en caso de inhalación e ingestión. Usar guantes.
- **BISACRILAMIDA:** Nocivo en caso de inhalación e ingestión. Usar guantes.
- **APS:** Nocivo en caso de inhalación e ingestión. Causa enrojecimiento e irritación en ojos y piel. En caso de contacto con los ojos lavar inmediata y constantemente con abundante agua y acudir a un médico. Usar guantes y gafas protectoras.
- **TEMED:** Inflamable. Nocivo en caso de ingestión e inhalación. Provoca quemaduras graves en piel y lesiones oculares graves. En caso de contacto con los ojos lavar inmediata y constantemente con abundante agua y acudir a un médico. Usar guantes y gafas protectoras.
- **TRIS:** Irritante. Causa irritación en los ojos, piel y sistema respiratorio. Para su manipulación se recomienda el uso de guantes, barbijo y gafas protectoras para evitar la entrada en contacto con el organismo.
- **GLICINA.**
- **SDS:** Solido inflamable y tóxico por inhalación e ingesta (nocivo), causa irritación por contacto tanto a nivel cutáneo como respiratorio. Durante su manipulación se recomienda evitar la formación de polvo, acercarlo a llamas u otra fuente de calor. Trabajar con guantes y barbijo.
- **TRIS-HCL:** Irritante. Causa irritación en los ojos, piel y sistema respiratorio. Para su manipulación se recomienda el uso de guantes
- **DTT:** Nocivo en caso de ingesta, contacto con la piel o inhalación. Se recomienda manipulación con guantes; no hay peligro si se manipula de forma adecuada.
- **ÁCIDO ACÉTICO:** Inflamable y corrosivo. Puede provocar quemaduras graves y la toxicidad se relaciona con sus propiedades altamente corrosivas. Se recomienda su manipulación con guantes y evitar la inhalación del mismo como así también evitar el contacto con bases y sustancias oxidantes.
- **COOMASIE BLUE.** Nocivo e irritante. Se debe trabajar con guantes impermeables y con gafas.

- **METANOL.** Inflamable y toxico en caso de ingesta, inhalación o contacto con la piel. Para su manipulación se recomienda el uso de guantes y mantenerlo alejado de fuentes de calor.

5. PROCEDIMIENTO

5.1 Generalidades

La cuantificación de proteínas es una práctica muy común en los laboratorios, cuando se quiere conocer dentro de que rango se está trabajando con una muestra incógnita, que bien puede ser una proteína particular purificada o proteína total extraída de células en cultivo. Para ello existen varios procedimientos de complejidad variable. Dentro de los más sencillos y factibles, encontramos el método de Bradford y la cuantificación con geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

En principio, ambos métodos tienen puntos en común:

- *La necesidad de una curva de calibración:* es necesario estimar un rango de concentraciones dentro del cual puede caer la muestra a determinar, para hacer una curva de concentraciones conocidas de una proteína patrón, y así poder extrapolar los resultados a esa curva y calcular la concentración a partir de ella.
- *El uso de azul de Coomasie:* el azul de Coomasie interacciona con los aminoácidos básicos e hidrofóbicos de las proteínas en un medio alcalino, con un límite de detección de 8 a 10 nanogramos para algunas proteínas mientras que de 25 nanogramos para otras. Esta unión provoca un cambio en el máximo de absorción de 465 a 595 nm, lo cual es útil si la cuantificación involucra espectrofotometría. De la misma manera, podemos decir que la cantidad de Coomasie interaccionando con una muestra es proporcional a la cantidad de proteína en la misma, ya que son más aminoácidos disponibles. De este modo, también es útil correrlo en un gel de poliacrilamida y observar la intensidad de las bandas luego de la tinción.

El método de Bradford se caracteriza por la preparación de la curva de calibración y de la muestra incógnita (se pueden hacer diluciones de la misma si se considera que está demasiado concentrada), seguido de la mezcla con azul de Coomasie. Esto se deja interaccionar por un tiempo y se lleva al espectrofotómetro y se mide en la longitud de onda mencionada. Así se obtienen las absorvancias de la curva y la muestra, se ajusta a una recta y se extrapola la concentración proteica.

Por otro lado, el SDS-PAGE es una variante de la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) que sólo separa a las proteínas por su peso molecular. El tamaño del poro del gel puede ser regulado por la concentración relativa y la proporción de acrilamida y bisacrilamida. Esto es importante porque el porcentaje de dureza dependerá del peso de las proteínas que se están corriendo. Para este tipo de gel (desnaturalizante), la migración

depende de que las proteínas estén desnaturalizadas y cargadas negativamente por la exposición al detergente aniónico SDS. Esto permite que las propiedades eléctricas de las proteínas se hagan uniformes garantizando por tanto que la migración dependa solo del tamaño y no de la secuencia de aminoácidos. El SDS presente en el buffer de muestra o reductor, se intercala en la proteína cuando la misma esta desnaturalizada por temperatura impidiendo el replegamiento mientras que el SDS de los buffers mantiene el medio saturado. Por ello tanto la muestra como todos los puntos de la curva deben estar desnaturalizados. Una vez terminada la corrida, se lleva a cabo la tinción del gel con azul de Coomassie. El resultado final es un gel donde las proteínas se observan como bandas nítidas de color azul. Como se explicaba anteriormente, las diferencias en la cantidad sembrada en cada caso serán visibles como bandas más oscuras o más claras.

Para hacer la cuantificación más exacta, se puede recurrir a programas de procesamiento de imágenes como el ImageJ, que es de código abierto, gratuito y ampliamente usado en la comunidad científica para múltiples aplicaciones relacionadas al análisis de parámetros varios en imágenes. De este modo, tomando una fotografía del gel y procesando la imagen con el programa, se obtienen datos de densitometría para cada banda, que también ajustan a una curva a partir de la cual se puede extrapolar la concentración de la muestra incógnita.

5.2 Preparación

5.2.1 Reactivos y materiales

- Juego de pipetas, p1000, p200, p20, p10
- Tips amarillos, azules y blancos en racks
- Tubos Eppendorf de 1.5 ml
- Guantes
- Etanol 70%
- Acrilamida/Bisacrilamida (Ver **Anexo I**)
- Peines para geles
- Soportes para armar geles
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)
- Persulfato de amonio (APS) 10% (Ver **Anexo II**)
- Extracto de proteína total en buffer reductor 1X ó muestras de proteína purificadas a analizar en buffer reductor 1X previamente crackeadas
- Fuente con agua
- Marcadores indelebles
- Vidrios con espaciadores de 1mm de espesor
- Cuba de electroforesis
- Fuente de poder
- Gradillas para tubos eppendorf y para falcon de 15 y 50 ml.
- Buffer de corrida 10x (Ver **Anexo III**)
- Buffer Stacking 4X (Ver **Anexo IV**)

- Buffer Separador 4X (Ver **Anexo V**)
- Agua destilada
- Solución de Tinción Coomassie Blue (Ver **Anexo VI**)
- Solución desteñidora para Coomassie Blue (Ver **Anexo VII**)
- Contenedor plástico pequeño
- PBS 1X (Ver **Anexo VIII**)
- Seroalbúmina Bovina (BSA) en polvo
- Muestra incógnita: solución concentrada de colágeno (y diluciones de la misma, de ser necesario)

5.2.2 Consideraciones antes de comenzar

- Limpiar con etanol 70% la mesada y los materiales a utilizar.
- Recordar que los geles deben de manipularse con guantes ya que la acrilamida y bis acrilamida es neurotóxica.
- Determinar el porcentaje apropiado de acrilamida y bis-acrilamida para el gel separador o running. En este caso, para la correcta resolución de bandas de colágeno y BSA se recomienda utilizar un porcentaje de poliacrilamida de 7.5%

5.2.3 Metodología

- Preparación de las soluciones:* En el caso de esta POE se busca cuantificar colágeno a partir de una muestra concentrada y se toma como proteína patrón BSA. Con esto en mente, se preparan soluciones que contengan 4; 2; 1 y 0,5 µG finales de BSA. Por otro lado, como se sospecha que la solución incógnita está muy concentrada, se hacen diluciones 1/10; 1/100; 1/1000. En todos los casos, las diluciones se hacen en PBS. Las cantidades de proteína de la curva patrón y la necesidad de diluciones de la muestra se deben ajustar al comenzar cada ensayo dependiendo las circunstancias y los objetivos.
- Las muestras así preparadas se mezclan con buffer reductor y se llevan a 100°C para lograr su desnaturalización (Ver **POE Extracción de Proteínas**).
- Preparación de geles:* Como ya ha sido mencionado, en este caso se prepara un gel 7,5% debido al peso del colágeno y de la BSA. Según la proteína a separar se debe ajustar el porcentaje. Para mayor información y detalle sobre cómo preparar los geles, ver **POE Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida**.

Reactivo	Gel de stacking (5%) (µl) (2geles)	Gel separador (7,5%) (µl) (2 geles)
Agua bidestilada	3450	4980
Acrilamida:Bisacrilamida (30:0.8 p/v)	830	2400
Buffer de separación 4X	----	2500

<i>Buffer de stacking 4X</i>	630	
<i>TEMED</i>	10	20
<i>Persulfato de amonio (APS) 10%</i>	50	60

- iv. Sembrar 20 µL de las muestras y 5 µL de un marcador de peso molecular adecuado. Correr a 150 Volt hasta observar que el frente de corrida llegue al final del gel.
- v. En un contenedor de plástico pequeño, colocar el gel.
- vi. Enjuagar con agua para retirar remanentes del buffer.
- vii. Agregar la solución de Coomassie Blue e incubar al menos durante 1 hora. Observar y determinar si le hace falta más tiempo de incubación.
- viii. Retirar la solución y realizar los lavados que sean necesarios con la solución desteñidora. Repetir hasta que el background sea mínimo o nulo y las bandas sean nítidas.
- ix. *Fotografiar o escanear. Abrir imagen en software ImageJ:*
 - Pasar imagen a 8bit (Image → Type → 8bit)
 - Analyze → Gels → Clickear la herramienta de selección y delimitar con un rectángulo la primera banda → Opción “Select first lane”; luego con la opción “Select Next Lane” se puede seleccionar de la misma manera todo el resto de las bandas presentes (*Figura 1*). Si hay calles con doble banda, asegurarse de que el rectángulo tome ambas bandas, ya que la cuantificación es sobre proteína total, entonces es necesario tomar todas las subunidades.

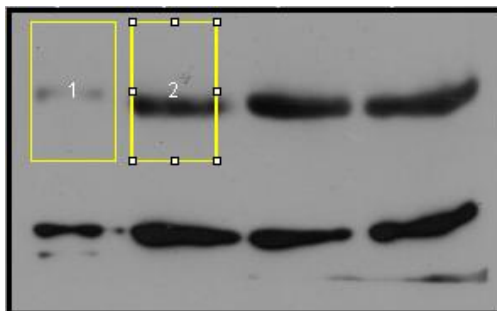


Figura 1. Ejemplo de selección de las bandas a cuantificar con el programa de edición de imagen ImageJ

- Cuando se seleccionaron todas las bandas, ir a Analyze → Gels → Plot lanes. Esta opción devuelve un gráfico que transforma la intensidad de las bandas en un histograma con picos cuya área bajo la curva es proporcional a la intensidad de la banda, es decir a la cantidad de proteína. Se debe marcar con la herramienta básica de dibujo de manera tal que todos los picos queden cerrados.
- Seleccionar el área dentro de los picos con la herramienta de la varita mágica (*Figura 2*)

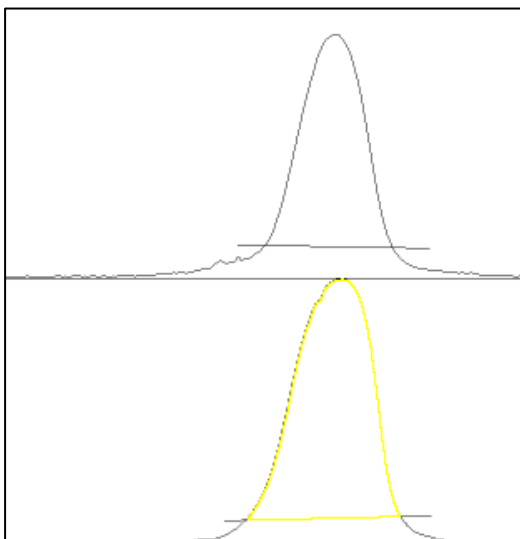


Figura 2. Curvas de intensidad obtenidas con el programa Image J. Luego son convertidas a datos de densidad óptica (DO) para poder normalizar valores de muestras y/o elaborar curvas de calibración.

- Esto nos devuelve datos en OD que pueden ser fácilmente utilizados en Excel para la construcción de la curva
- x. Excel:
 - Insertar la tabla con las ODs
 - Graficar las ODs vs la concentración o cantidad total de proteína patrón
 - Activar la opción de regresión lineal en la curva graficada, para que ajuste a una recta. También es necesario conocer la ecuación de esa recta para poder extrapolar la concentración de la muestra a partir del dato de la OD y el coeficiente R^2 para comprobar que ajusta bien a esa recta.
 - Calcular la concentración de la muestra.

5.3 Almacenamiento

Se pueden conservar los geles dentro de un folio con unas gotas de agua para que no se seque, aunque es recomendable tomar la fotografía o escanearlo en un corto tiempo, ya que esta forma de almacenamiento no lo conservará por mucho tiempo y las bandas pueden perder nitidez.

5.4 Resultados

- A. El primer resultado que se obtiene es el gel que luego de correr y ser teñido, es desteñido para quitar el exceso de colorante (*Figura 3*). En este caso el gel fue dejado más tiempo en

la solución desteñidora para mejorar la nitidez y el contraste. El orden de siembra fue marcador, curva patrón en orden decreciente y 3 diluciones decrecientes de la muestra incógnita.

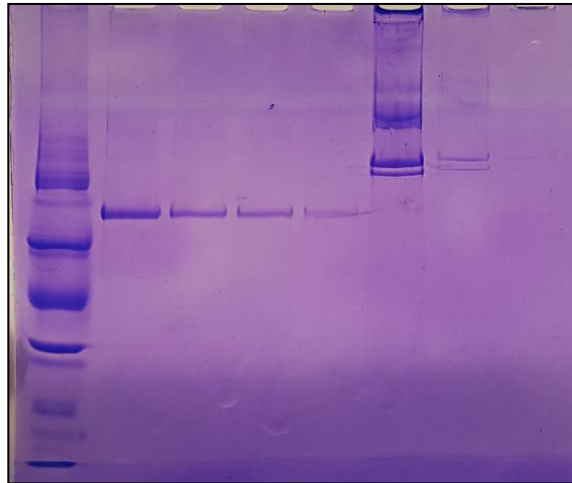


Figura 3. Gel teñido con Coomassie Blue y desteñado luego de exponer a solución desteñidora.

B. El segundo resultado puede ser la imagen en 8bit ya procesada por el software ImageJ (Figura 4)

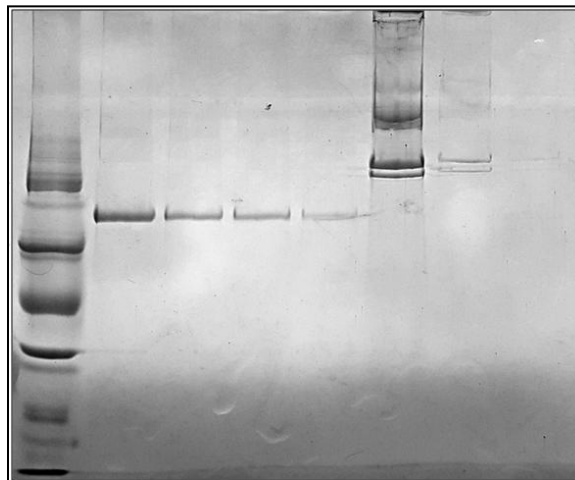
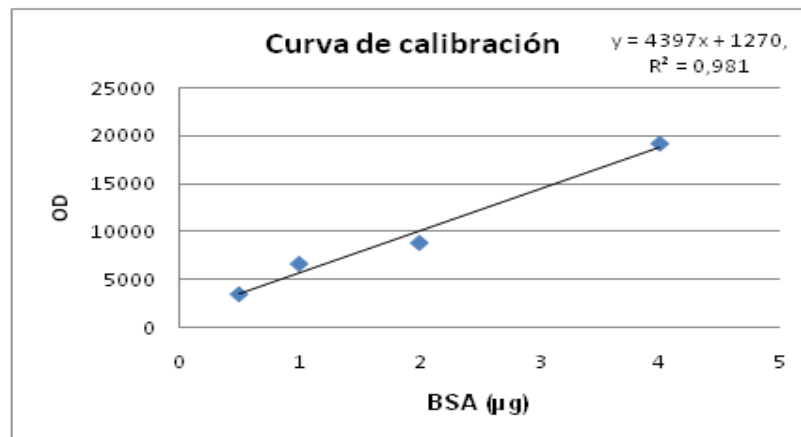


Figura 4. Imagen del mismo gel de la figura 3, luego de ser procesada con el programa ImageJ.

C. Por último se obtienen todos los parámetros que arroja el programa, que posibilitan el armado de la curva de calibración y la extrapolación de datos para averiguar la concentración de la muestra incógnita.



5.5 Posibles problemas y soluciones durante el procedimiento

- No se observan bandas luego de la tinción:
 - El tiempo de incubación con el azul de Coomasie no fue suficiente. Dejar más tiempo.
 - Las muestras están demasiado diluídas. En el caso de la curva, usar otras concentraciones. En el caso de la muestra, concentrar o cambiar el método de cuantificación por uno con límite de detección más bajo.
- Bandas muy juntas, no se resolvieron bien:
 - Correr más tiempo el gel
 - Chequear que la concentración sea la correcta para los pesos de las proteínas que se están corriendo y repetir si es necesario
- Demasiado background no permite una buena delimitación y cuantificación de las bandas
 - Dejar más tiempo en la solución desteñidora para retirar el exceso de Coomasie blue
- Las bandas de la muestra incógnita están por fuera del rango con respecto a la curva patrón (bandas demasiado intensas):
 - Preparar otras concentraciones de curva patrón
 - Diluir la muestra.

6. REFERENCIAS

Guía de trabajos prácticos de la materia Cultivos Celulares, en el marco del cuarto año de la Licenciatura en Biotecnología.

7. HISTORIA

Documento: Nuevo

8. ANEXOS

I. Preparación de Solución de Acrilamida-BisAcrilamida (30 acrilamida -0,8% bisacrilamida p/v)

29,2 gr-----Acrilamida
 0,8 gr-----Bis-Acrilamida
 Agua bidestilada c.s.p 100 ml

Utilizar guantes, barbijos y lentes ya que la acrilamida monomérica es neurotóxica y muy volátil.

Guardar en heladera

II. Preparación de APS 10%

0,5 gr de persulfato de amonio en 5 ml de agua bidestilada.
 Alicuotar en eppendorf de a 1 ml y guardar a -20°C

III. Preparación de Buffer de corrida 10X

30 gr -----Tris (250 mM)
 144 gr ---- Glicina (1920 mM)
 10 gr----- SDS (10%)
 Agua bidestilada c.s.p 1 Lt.
 Ajustar pH a 8,3

IV. Preparación de Buffer stacking 4X

3 gr Tris en 20 ml de agua bidestilada
 Agregar HCl hasta pH 6.8
 2 ml de SDS 10%
 Agua bidestilada c.s.p 50 ml
 Puede guardarse a T.A o en heladera

V. Preparación de Buffer de separación 4X

9,1 gr Tris en 20 ml de agua bidestilada.
 Agregar HCl hasta pH 8,8
 2 ml de SDS 10%
 Agua bidestilada c.s.p 50 ml
 Puede guardarse a T.A o en heladera

VI. Preparación de Solución de Tinción Coomasie Blue

0,25 gr-----Coomasie Blue
 10 ml-----Ácido acético
 45 ml-----Etanol o metanol
 Agua bidestilada c.s.p 100 ml

Esta solución se guarda en frasco de color caramelo y tras cada uso se puede recuperar y reusar nuevamente.

VII. Preparación de Solución de Desteñido para Coomasie Blue

20 ml-----Metanol

15 ml-----Ácido acético glacial

65 ml-----Agua bidestilada

Esta solución se puede recuperar y reutilizar

VIII. Preparación de PBS 1X

A partir de Sobres de PBS en polvo

Diluir el contenido del sobre en 1 lt de agua destilada. Alicuotar en botellas Shoot y esterilizar por autoclave.

PBS casero

i. Pesar en un vaso de precipitados de 1 Lt:

8 gr-----NaCl

0,2gr-----KCl


0,2 gr-----KH₂PO₄

1,15 gr----Na₂HPO₄anhídrida

ii. Agregar agua bidestilada hasta alcanzar 1 lt.

iii. Alicuotar en botellas shoot y esterilizar por autoclave.

9.2.7. WESTERN BLOT PARA LA DETECCIÓN DE COX-2 Y ACTINA

 		PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR	
Código del documento: LAB-PFI-007	Versión: 000	Fecha: 01-10-2017	
Título del documento: WESTERN BLOT PARA LA DETECCIÓN DE COX-2 Y ACTINA			

1. PROPÓSITO

Los procedimientos contenidos en la presente POE se utilizan para llevar a cabo la detección de la proteína COX-2 mediante un Western Blot ya sea, entre otras cosas, como ensayo de caracterización para determinar si una línea expresa dicha proteína o como parte de un ensayo para evaluar el efecto de una variable de interés sobre la expresión de la misma.

2. ALCANCE

Los procedimientos descriptos a lo largo de este POE deben ser implementados por todos aquellos (alumnos, docentes, técnicos y/o investigadores) que con distintos fines, educativos o de investigación, deban llevar a cabo la detección de COX-2 por Western Blot.

3. RESPONSABILIDAD

Alumnos	<p><u>Todo alumno involucrado es responsable de:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Conocer, entender y aplicar los procedimientos aquí descriptos. • Desarrollar los procedimientos de forma manual llevando a cabo el manejo del instrumental de laboratorio. • Aplicar las normas de estandarización del trabajo de laboratorio. • Poner en práctica normas de bioseguridad.
Docentes	<p><u>Todo docente involucrado es responsable de:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Conocer, entender y explicar los procedimientos aquí descriptos • Acompañar y guiar a los alumnos durante el desarrollo de las actividades. • Estimular la capacidad del alumno de evaluar el resultado de una experiencia y sugerir cambios en parámetros y condiciones experimentales que los acerquen a resultados confiables. • Promover el trabajo riguroso en el laboratorio.

Técnicos de laboratorio	<p><u>Todo técnico de laboratorio involucrado es responsable de:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Proveer el material de laboratorio y reactivos necesarios para llevar a cabo el procedimiento • Preparar las soluciones que se utilizan (si fuera necesario) • Conocer las normas de bioseguridad y actuar conforme a lo establecido en caso de haber algún incidente
Investigadores	<p><u>Todo investigador involucrado es responsable de:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Conocer, entender y aplicar los procedimientos aquí descriptos • Consultar la bibliografía relacionada en caso de querer ajustar las condiciones acorde a su línea de investigación • Conocer y aplicar las normas de bioseguridad

4. SALUD, SEGURIDAD Y MEDIO AMBIENTE

- **ACRILAMIDA:** Nocivo en caso de inhalación e ingestión. Usar guantes.
- **BISACRILAMIDA:** Nocivo en caso de inhalación e ingestión. Usar guantes.
- **APS:** Nocivo en caso de inhalación e ingestión. Causa enrojecimiento e irritación en ojos y piel. En caso de contacto con los ojos lavar inmediata y constantemente con abundante agua y acudir a un médico. Usar guantes y gafas protectoras.
- **TEMED:** Inflamable. Nocivo en caso de ingestión e inhalación. Provoca quemaduras graves en piel y lesiones oculares graves. En caso de contacto con los ojos lavar inmediata y constantemente con abundante agua y acudir a un médico. Usar guantes y gafas protectoras.
- **TRIS:** Irritante. Causa irritación en los ojos, piel y sistema respiratorio. Para su manipulación se recomienda el uso de guantes, barbijo y gafas protectoras para evitar la entrada en contacto con el organismo.
- **SDS:** Solido inflamable y tóxico por inhalación e ingesta (nocivo), causa irritación por contacto tanto a nivel cutáneo como respiratorio. Durante su manipulación se recomienda evitar la formación de polvo, acercarlo a llamas u otra fuente de calor. Trabajar con guantes y barbijo.
- **METANOL:** Inflamable y toxico en caso de ingesta, inhalación o contacto con la piel. Para su manipulación se recomienda el uso de guantes y mantenerlo alejado de fuentes de calor.
- **ÁCIDO ACÉTICO:** Inflamable y corrosivo. Puede provocar quemaduras graves y la toxicidad se relaciona con sus propiedades altamente corrosivas. Se recomienda su manipulación con guantes y evitar la inhalación del mismo como así también evitar el contacto con bases y sustancias oxidantes.
- **ROJO PONCEAU:** Puede provocar irritación cutánea, ocular y de las vías respiratorias. Debe de manipularse con cuidado y guantes evitando su inhalación.

5. PROCEDIMIENTO

5.1 Generalidades

El Western Blot, es una técnica introducida por Burnette en 1980, de gran uso en biología molecular y celular, la cual permite la identificación de una proteína específica a partir de una mezcla compleja.

Todo procedimiento de 'Western blotting' consta de 5 etapas:

1. Inmovilización de proteínas sobre la membrana mediante transferencia.
2. Saturación de todos los lugares de unión de proteínas de la membrana no ocupados para evitar la unión no específica de anticuerpos, que son proteínas (Bloqueo).
3. Incubación del 'blot' con anticuerpo primarios contra la/s proteína/s de interés.
4. Incubación del 'blot' con anticuerpos secundarios, o reactivos que actúan de ligando del anticuerpo primario, unidos a enzimas u otros marcadores.
5. Revelado de la unión específica.

Las proteínas son separadas en función de su peso molecular mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (Ver POE) siendo luego transferidas a una membrana mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel el cual hace que las proteínas se muevan del gel a la membrana. En la presente POE haremos referencia a la *electrotransferencia* o *electroblotting*; descrito en forma original por Towbin. La membrana se la coloca entre el gel y el electrodo positivo en un sándwich el cual consiste en apilar sucesivamente sobre una esponja plana papel de filtro, el gel, la membrana, más papel de filtro y finalmente otra esponja plana debiendo todo estar embebido en buffer de transferencia. Lo más importante es:

- Garantizar el contacto directo entre el gel y la membrana.
- Asegurarse que el gel quede hacia el ánodo (-) y la membrana hacia el cátodo (+). El buffer de transferencia tiene pH básico por lo que las proteínas están cargadas negativamente. Durante la transferencia migraran hacia el cátodo. Si uno pusiera la membrana hacia el ánodo, las proteínas se perderán.

El proceso puede provocar calentamiento de la solución por lo que se recomienda refrigerar el sistema. Es importante incorporar en el gel a transferir un control de la transferencia que habitualmente es un marcador de peso molecular que al transferirlo se tiñe sobre la membrana permitiendo evaluar que la transferencia de toda la gama de pesos moleculares haya sido correcta. Otra manera de chequear que el proceso haya sido exitoso es por Tinción con Rojo Ponceau de la membrana (reversible).

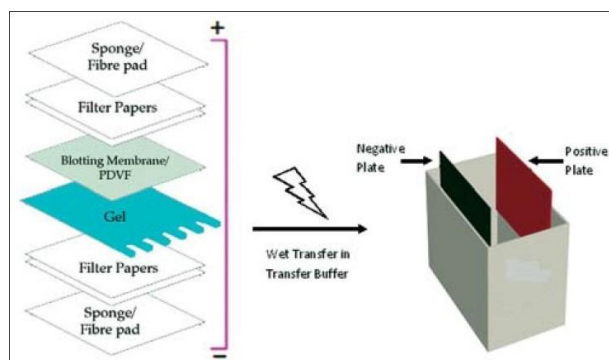


Figura 1. “Western Blot: Technique, theory and trouble shooting” (Mahamood, Tahrin and Yang, Ping-Chang;)

Una vez finalizada la transferencia se procede con el bloqueo de la membrana para prevenir la unión no específica del sistema de detección, con el riesgo asociado de tener un elevado 'background' o falsos positivos. Las soluciones de bloqueo que son compatibles con casi cualquier sistema de detección son las soluciones de leche descremada 0% libre de grasas (en PBS ó PBS-Tween) y las soluciones de albúmina sérica bovina (BSA). El factor esencial a tener en cuenta es elegir un sistema de bloqueo compatible con el sistema de detección empleado.

Sobre la membrana bloqueada se lleva a cabo la detección específica de la o las proteínas de interés mediante principios inmunoquímicos: la proteína fijada en la membrana puede reaccionar con anticuerpos específicos y ser detectada mediante la acción de enzimas u otros reveladores unidos a los anticuerpos. Los principales sistemas de revelado son:

- Enzimas que catalizan una reacción en la cual se forma un precipitado de color o se emite luz.
- Radioquímicos, emiten radiaciones ionizantes.

En esta POE se utilizará el sistema de detección por *enzimas y sustratos quimioluminiscentes*. La reacción quimioluminiscente ocurre cuando la energía de una reacción química se emite en forma de luz. Se emplea la peroxidasa de rábano (HRP) para catalizar la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno. Inmediatamente después de la oxidación el luminol se encuentra en un estado excitado del que pasa a la situación basal, reducida, más estable, emitiendo luz. La luz emitida tiene una longitud de onda de 428 nm, con un máximo de emisión entre 15 y 20 minutos después de iniciada la reacción y una emisión que se puede prolongar de 2 a 3 horas. Si esta reacción se produce sobre una membrana en contacto con una película de autorradiografía ésta queda impresionada. El ancho de la banda se corresponde con la cantidad de proteína presente en el extracto. El proceso de revelado debe llevarse a cabo en cuarto oscuro. La ventaja de dicho sistema es que permite eliminar los anticuerpos ('striping') y volver a analizar la membrana con otros.

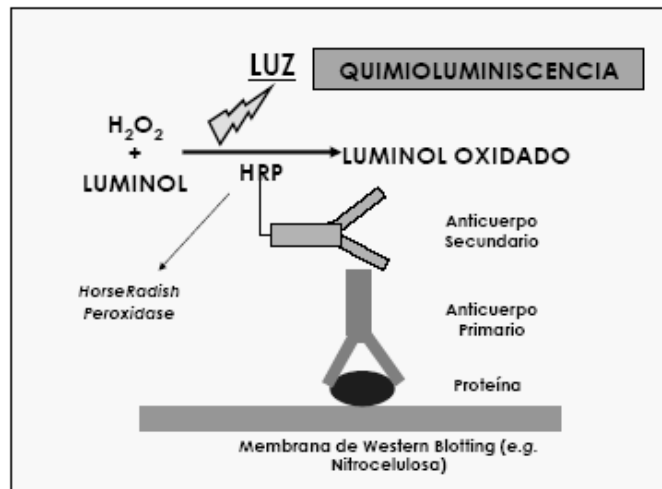


Figura 2. Guía de trabajos prácticos de la materia Ingeniería Genética II, Fundación UADE.

5.2 Preparación

5.2.1. Reactivos y materiales

- Acrilamida/Bis-Acrilamida
- APS
- TEMED
- Equipo para transferencia y PAGE (Fuente de poder, cubas, etc.)
- Membrana de nitrocelulosa
- Juego de pipetas, p1000, p200, p20 y p10
- Tips azules, amarillos y blancos en racks.
- Kit del reactivo ECL Plus (Ver **Anexo V**)
- PBS- Tween 0,05% (Ver **Anexo I**)
- Gradilla para tubos eppendorf y falcon de 15 y 50 ml.
- Marcador de Peso molecular Rainbow
- Solución Rojo Ponceau (Ver **Anexo VI**)
- Papel whatman
- Buffer de corrida 10X
- Buffer de transferencia (Ver **Anexo II**)
- Buffer stacking4X
- Buffer de separación 4X
- Solución de Bloqueo (Ver **Anexo III**)
- Anticuerpo primario anti-COX2(Ver **Anexo IV**)
- Anticuerpo primario Actina

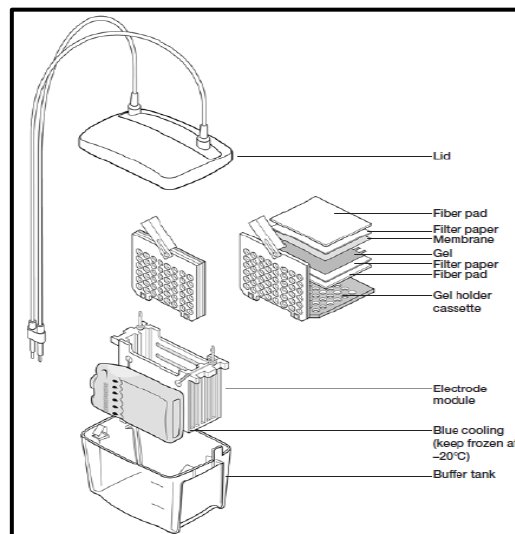
- Anticuerpo secundario marcado con HRP
- Guantes
- Cajas de plástico para realizar el revelado
- Revelador
- Fijador
- Pinzas
- Tijera
- Contenedores
- Luz roja
- Placas radiograficas
- Marcadores indelebles
- Agua destilada
- Agitador

5.2.2. Metodología

1. Electroforesis de las muestras (extracto de proteínas en buffer reductor 1X y crackeadas) en SDS-PAGE 12% (Ver POE **electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida** y POE **extracción de proteínas y/ó ARN de células cultivas en soportes de rigidez variable**).

2. Transferencia

- a. Previo a finalizar la transferencia comenzar a preparar los materiales para la transferencia y colocarlos sobre la mesada: cuba, fuente de poder, pinzas, almohadillas, contenedores plásticos perforados, hielo, etc.
- b. Preparar 1 lt de buffer de transferencia 1X (Ver **Anexo II a**)
- c. Cortar papeles Whatman que excedan el tamaño del gel a transferir en 1 cm de cada lado.
- d. Cortar la membrana de nitrocelulosa aproximadamente del mismo tamaño del gel a transferir. Recordar manipular siempre con guantes
- e. Armado del sándwich; poner embebidos en el buffer de transferencia los siguientes elementos sobre el contenedor de plástico perforado con la orientación adecuada (membrana hacia el cátodo y gel hacia el ánodo):
 - Almohadilla
 - Papeles Whatman (4 aprox)
 - Gel recientemente desmontado después de la electroforesis
 - Membrana de nitrocelulosa
 - Papeles whatman (4 aprox)
 - Almohadilla
- f. Insertar dentro de la cuba para electroforesis con la orientación adecuada junto con el hielo y el buffer de transferencia 1X.



- g. Conectar a la fuente de poder y correr a 90 V 1 h
- h. Una vez terminada la transferencia desmontar el sándwich y puede chequearse la transferencia por Tinción con Rojo Ponceau. Colocar la membrana en un contenedor de plástico pequeño y agregar la solución Rojo Ponceau. Dejar incubando unos minutos y retirarla. Observar, fotografiar y lavar con agua para retirar el colorante.

3. *Bloqueo*

- a. Preparar la solución de bloqueo (Ver **Anexo III**)
- b. Colocar la membrana con la cara donde fueron las proteínas hacia arriba, agregar la solución de bloqueo e incubar durante 1 h en agitación a temperatura ambiente.
- c. Transcurrida la hora, retirar la solución de bloqueo y enjuagar con PBS-Tween 0,05%.

4. Incubación Anticuerpo primario anti-COX2 y anti-Actina. Incubación con anticuerpo secundario. Revelado.

- a. Incubar el anticuerpo primario anti-COX2 en 5% de leche descremada en PBS-Tween 0,05% según la dilución recomendada por el fabricante, 1 h en agitación a temperatura ambiente.
- b. Transcurrida la hora, retirar la solución del anticuerpo primario. Lavar con PBS-Tween 0,05%.
- c. Incubar el anticuerpo primario anti-actina en 5% de leche descremada en PBS-Tween 0,05% según la dilución recomendada por el fabricante, 1 h en agitación a temperatura ambiente.
- d. Transcurrida la hora, retirar la solución del anticuerpo. Lavar con PBS-Tween 3 veces por 3 minutos cada vez

- e. Incubar el anticuerpo secundario en 5% de leche descremada en PBS-Tween 0,05% según la dilución recomendada por el fabricante, 1 h en agitación a temperatura ambiente.
- f. Transcurrida la hora, retirar la solución del anticuerpo. Lavar con PBS-Tween 0,05% 5 veces por 3 minutos cada vez
- g. Cubrir la membrana con 500 µl de sustrato luminiscente, Kit ECL, preparado de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Ver **Anexo V**).
- h. Realizar el revelado en cuarto oscuro
- i. Colocar la membrana en la placa reveladora cubierta con un plástico y exponerla a una placa radiográfica.
- j. Tras la exposición, revelar y fijar la placa:
 - Sumergir la placa en un recipiente con solución reveladora y agitar
 - Pasar la placa a un recipiente con agua y agitar durante unos minutos.
 - Por último, colocar la placa en un recipiente con solución fijadora y agitar.
 - Dejar secar.

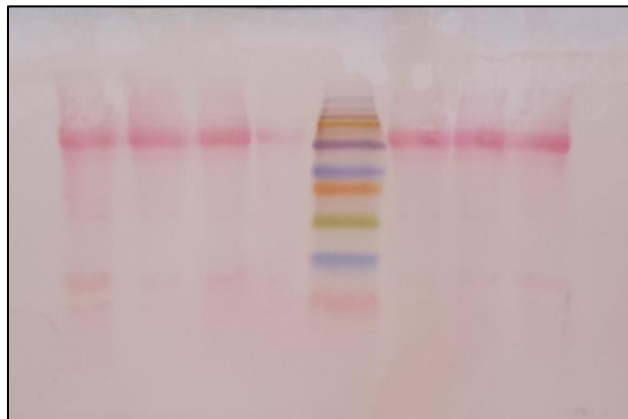
En función de la intensidad de las bandas, exponer más o menos tiempo.

5.3 Almacenamiento

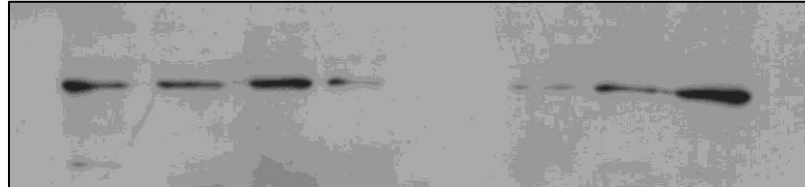
- La membrana luego de su transferencia puede guardarse en la heladera (2°C-8°C) entre dos papeles whatman.
- La membrana strippeada puede guardarse en la heladera en PBS-Tween 0,05% dentro de un plástico sellado. Esto es recomendable cuando quiere repetirse el western con otros anticuerpos. Para el stripping debe de incubarse la membrana a 60°C con la solución de stripping (ver anexo).

5.4 Resultados

- Tinción con Rojo Ponceau



- Revelado



5.5 Posibles problemas y soluciones durante el procedimiento

- **Ausencia de señal.** El no observar bandas tras el revelado de un western blot puede deberse a diferentes inconvenientes entre ellos se encuentran:

Anticuerpo primario y secundario son incompatibles; en este caso el anticuerpo secundario no es capaz de reconocer al primario llevando a la ausencia de señal quimioluminiscente durante el revelado. Se soluciona utilizando un anticuerpo secundario apropiado, ej. Si el anticuerpo primario es de ratón el secundario debe ser anti-ratón.

Unión ineficiente de anticuerpo secundario a la proteína de interés; se recomienda utilizar una mayor concentración de anticuerpo o incubar durante un más tiempo.

Anticuerpo primario no reconoce a la proteína de interés; se recomienda recurrir a la datasheet del anticuerpo que está siendo utilizado y correr un control positivo para ver si con este hay reacción.

Proteína de interés muy diluida en la muestra; puede solucionarse sembrando un mayor volumen de la misma o realizando pools de la muestra para incrementar la concentración. Lo recomendable es sembrar entre 20-30 µg por calle de la proteína y si está disponible un control positivo para la misma.

Transferencia de baja eficiencia; esto se puede prever realizando la tinción reversible de rojo ponceau que da una idea de la cantidad de proteína transferida.

Lavados excesivos; tras cada paso de incubación (anticuerpos primarios y secundario) la membrana se lava para eliminar los remanentes. El realizar muchos lavados puede conducir a una disminución en la señal. Esto último se puede solucionar disminuyendo el número o la duración de los lavados.

Anticuerpos por debajo de la concentración apropiada; leer cuidadosamente las recomendaciones del proveedor para diluir el anticuerpo.

Reactivo de detección en mal estado; probar con controles positivos (algún gen housekeeping de uso frecuente y alta expresión en la línea celular utilizada) para establecer que la falta de señal es por el reactivo y no por ausencia de esa proteína.

- **Mucho background.** Tras el revelado, observar un alto background representado por manchas negras en diferentes zonas de la placa puede deberse entre otras cosas a:

Bloqueo insuficiente; en estos caso se recomienda aumentar el tiempo de incubación de la membrana con la solución de bloqueo así también considerar cambiar dicha solución.

Concentración de anticuerpo primario alta

Lavado insuficiente tras las incubaciones.

- **Bandas de baja intensidad.**

Anticuerpos muy diluidos; lo recomendable es aumentar la concentración y utilizarla según lo establecido por el fabricante en la datasheet.

Baja concentración de la proteína de interés; lo que se puede hacer es sembrar más muestra en el gel, realizar un pool de muestras para aumentar así su concentración o incrementar el tiempo de revelado para así ver banda de mayor nitidez.

- **Bandas irregulares.** Suelen ser producto de una mala transformación como consecuencia de la presencia de burbujas de aire entre el gel y la membrana

6. REFERENCIAS

1. Burnette, Neal W; “*Western Blotting*”: *Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A*”. AnalyticalBiochemistry. Mayo 1981 112 (2): 195–203.
2. Guía de trabajos prácticos de la materia Ingeniería Genética II, en el marco del cuarto año de la Licenciatura en Biotecnología. 2015. Fundación UADE.
3. Mahamood, Tahrin and Yang, Ping-Chang; “*Western Blot: Technique, theory and trouble shooting*”. N Am J MedSci. 2012 Sep; 4(9): 429–434.
4. JoVE Science Education Database. Basic Methods in Cellular and Molecular Biology. *The Western Blot*. JoVE, Cambridge, MA, doi: 10.3791/5065 (2016).
5. <http://www.abcam.com/protocols/western-blot-troubleshooting-tips>

7. HISTORIA

Documento: Nuevo

8. ANEXO

I. Preparación de PBS-Tween 0,05%

Para 100 ml de solución, diluir 50 µL de Tween 20 en 49,950 ml de PBS 1X.

II. Preparación de Buffer de Transferencia 10X

144 gr-----Glicina
 30 gr-----Tris
 Agua bidestilada c.s.p 1 Lt

a) *Preparación de buffer de transferencia 1X:*

100 ml-----Buffer de transferencia 10X.

200 ml----- Metanol

700 ml-----Agua destilada.

Este último se puede reutilizar hasta 3 veces y se recomienda guardarlos en Heladera.

III. Preparación de solución de bloqueo

La solución de bloque es 5% de leche descremada en PBS-Tween 0,05% por lo tanto para 50 ml de dicha solución se deben disolver 2.5 gr de leche en polvo descremada en 50 ml de PBS-Tween 0,05%

IV. Anticuerpo primario policlonal COX-2

Anticuerpo policlonal producido en ratas contra COX-2 (isotipoIgG) siendo reactivo en: ratón, rata, humanos y hámster Sirio.

Para mayor información:

<http://www.abcam.com/cox2-cyclooxygenase-2-antibody-ab15191.html>

V. Kit ECL Pierce

Sustrato quimioluminiscente mejorado para la detección de la actividad de la peroxidasa de rábano picante (HRP) en inmunotransferencias. Su alta sensibilidad permite la detección de picogramos de antígeno (proteína de interés) mediante una detección fácil y sencilla con placas radiográficas.

Los reactivos de detección del kit denominados 1 y 2 (peroxidasa y luminol) deben mezclarse en una relación 1:1. Por ejemplo, para 500 µl final mezclar 250 µl de cada reactivo. Se recomiendan 125 µl de mezcla por cm² de membrana.

VI. Solución de tinción Rojo Ponceau



5 mg-----Polvo colorante Rojo Ponceau

5 ml-----Ácido acético

Agua bidestilada c.s.p 100 ml.

Esta solución se puede recuperar y usar repetidas veces. Guardar en frasco color caramelo a temperatura ambiente

9.2.8. RT-PCR PARA LA DETECCIÓN DE COX-2 Y HPRT

 		PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR	
Código del documento: LAB-PFI-008		Versión: 000	Fecha: 01-10-2017
Título del documento: RT-PCR PARA LA DETECCIÓN DE COX-2 Y HPRT			

1. PROPÓSITO

Los procedimientos contenidos en la presente POE se utilizan para llevar a cabo la detección del ARN mensajero de COX-2 mediante una retrotranscripción (RT), seguida de una PCR punto final ya sea, entre otras cosas, como ensayo de caracterización para determinar si una línea expresa dicho gen o como parte de un ensayo para evaluar el efecto de una variable de interés sobre la expresión de la misma.

2. ALCANCE

Los procedimientos descriptos a lo largo de este POE deben ser implementados por todos aquellos (alumnos, docentes, técnicos y/o investigadores) que con distintos fines, educativos o de investigación, deban llevar a cabo la detección de COX-2 por RT-PCR.

3. RESPONSABILIDAD

Alumnos		<p><u>Todo alumno involucrado es responsable de:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Conocer, entender y aplicar los procedimientos aquí descriptos. • Desarrollar los procedimientos de forma manual llevando a cabo el manejo del instrumental de laboratorio. • Aplicar las normas de estandarización del trabajo de laboratorio. • Poner en práctica normas de bioseguridad.
Docentes		<p><u>Todo docente involucrado es responsable de:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Conocer, entender y explicar los procedimientos aquí descriptos • Acompañar y guiar a los alumnos durante el desarrollo de las actividades. • Estimular la capacidad del alumno de evaluar el resultado de una experiencia y sugerir cambios en parámetros y condiciones experimentales que los acerquen a resultados confiables. • Promover el trabajo riguroso en el laboratorio.
Técnicos de laboratorio		<p><u>Todo técnico de laboratorio involucrado es responsable de:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Proveer el material de laboratorio y reactivos necesarios para llevar

	a cabo el procedimiento <ul style="list-style-type: none"> • Preparar las soluciones que se utilizan (si fuera necesario) • Conocer las normas de bioseguridad y actuar conforme a lo establecido en caso de haber algún incidente
Investigadores	<u>Todo investigador involucrado es responsable de:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Conocer, entender y aplicar los procedimientos aquí descriptos • Consultar la bibliografía relacionada en caso de querer ajustar las condiciones acorde a su línea de investigación • Conocer y aplicar las normas de bioseguridad

4. SALUD, SEGURIDAD Y MEDIO AMBIENTE

- **DTT:** Nocivo en caso de ingesta, contacto con la piel o inhalación. Se recomienda manipulación con guantes; no hay peligro si se manipula de forma adecuada.
- **TRIS:** Irritante. Causa irritación en los ojos, piel y sistema respiratorio. Para su manipulación se recomienda el uso de guantes, barbijo y gafas protectoras para evitar la entrada en contacto con el organismo.
- **Acetato:** Puede generar enrojecimiento al entrar en contacto con ojos y piel.
- **EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético):** El contacto con los ojos puede causar irritación moderada. El contacto repetido y prolongado con la piel puede causar irritación.
- **HIDRÓXIDO DE SODIO:** Alcali fuerte. Evitar contacto con la piel. Usar guantes
- **BROMURO DE ETIDIO:** Combustible. Sustancia fuertemente mutagénica, irritante a los ojos, piel, mucosa y tracto respiratorio. Manipular con cuidado.
- **Luz UV:** Puede provocar quemaduras, irritación, manchas y afecciones a nivel ocular. Además es altamente mutagénica, con lo cual puede llegar a generar cáncer de piel.

5. PROCEDIMIENTO

5.1 Generalidades

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa por su sigla en inglés) es una técnica de biología molecular desarrollada en 1983 por Kary Mullis. Su objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento particular a partir de un molde más escaso, es decir que en último término amplifica una porción de interés. El procedimiento de PCR consta de incrementos y descensos de temperatura en los cuales se permite la desnaturalización de las hebras del ADN molde para permitir el acceso de la enzima polimerasa y los demás reactivos, el pegado de los primers y la extensión de las hebras para generar nuevas copias, de modo que el producto final está enriquecido con el fragmento buscado.

Por otro lado, todas las células expresan un conjunto único de genes, ya sea por su función específica, o como respuesta ante un estímulo interno o externo. Los niveles de expresión de algún gen de interés se pueden evaluar a nivel transcripcional y/o proteico. Para el primer caso es necesario contar con ARN total, a partir del cual interesa aislar de alguna manera la fracción de ARN mensajeros (ARNm). Para ello existe una técnica conocida como retrotranscripción, que es una variante de la PCR, en la que la enzima retrotranscriptasa sintetiza ADNcopia (ADNc) a partir de moléculas de ARN. La enzima además necesita cebadores para comenzar la síntesis, los cuales pueden ser “random primers” u oligonucleótidos con bases de timina (oligodTs), que permitan levantar todo el conjunto de ARNm que se estaban expresando al momento en que fue tomada la muestra de interés, por la complementariedad con las bases de adenina características de este tipo de ARN.

El ADNc obtenido de esta manera será utilizado como molde de una PCR que contiene cebadores o primers específicos para amplificar o “levantar” fragmentos de la secuencia de interés. Por ello debe ser purificado para eliminar cualquier tipo de inhibidor que perjudique la reacción y no permita su detección.

Luego para visualizar el resultado es necesario emplear otra técnica conocida como electroforesis en gel de agarosa. Para ello se prepara un gel del polímero mencionado, se siembran los productos obtenidos en la PCR y se genera una corriente eléctrica que impulsa la movilidad de las muestras. Este fenómeno ocurre gracias a la carga negativa que el esqueleto de fosfatos le confiere al ADN, de modo que migrará hacia el electrodo positivo. El porcentaje del gel determina el entramado y tamaño del poro del mismo, por lo que se define a partir del tamaño de los fragmentos a separar. Finalmente para visualizar las bandas, es necesario utilizar agentes intercalantes como el bromuro de etidio, que fluorescen al ser irradiados con luz UV, cuya señal será proporcional a la cantidad de ADN presente, y para identificar cuáles son las bandas que se buscan, se emplea un marcador de peso molecular que posee bandas de cierto tamaño en un rango definido.

5.1 Preparación

5.2.1. Reactivos y materiales

- “RNase away”
- Oligonucleótidos (oligo-dTs)
- dNTPs 10uM
- Agua roux
- Micropipetas y tips
- Eppendorfs de 0.5 y 0.2 mL
- Bloque térmico

- Hielo
- First strand buffer
- Ditioneitol (DTT) 0.1M
- RNaseOUT
- Retrotranscriptasa SuperScript II
- NaOH 1M
- Buffer HEPES 1M
- Glucógeno 20 $\mu\text{G}/\mu\text{L}$
- Acetato de Sodio 3N
- Etanol absoluto
- Centrífuga refrigerada
- Etanol 70%
- Buffer 10X para enzima Taq polimerasa
- Enzima Taq polimerasa 5 U/ μL
- Primer COX-2 Fw 10uM
- Primer COX-2 Rw 10uM
- Primer HPRT Fw 10uM
- Primer HPRT Rw 10uM
- MgCl_2 50 mM
- Termociclador
- Agarosa
- Buffer de corrida TAE 1X (Tris, Acetato, EDTA)
- Microondas
- Erlenmeyer
- Cama, peines y cuba electroforética
- Lámpara UV
- Buffer de carga
- Agente intercalante (Bromuro de Etidio)
- Marcador de peso molecular 100-1000pb

5.2.2. Metodología

a) *Retrotranscripción*

1. Limpiar todos los materiales y superficies a emplear con RNase Away y etanol 70%
2. Preparar por cada muestra la siguiente mix (para mayor información sobre la muestra ver POE **extracción de proteínas y/o ARN de células cultivadas en soportes de rigidez variable**):

Reactivo	Volumen
<i>Oligo (dT)</i>	1 μ L
<i>dNTPs</i>	1 μ L
<i>Muestra de ARN</i>	3 μ G
<i>Agua roux</i>	Hasta 12 μ L

3. Incubar a 65°C por 5 minutos
4. Incubar en hielo por al menos 1 minuto
5. Preparar la siguiente mix y agregarla al tubo de trabajo de cada muestra:

Reactivo	Volumen
<i>First strand buffer</i>	4 μ L
<i>DTT 0.1M</i>	2 μ L
<i>RNaseOUT</i>	1 μ L

6. Mezclar pipeteando suavemente arriba y abajo. Incubar a 42°C por 2 minutos.
7. Agregar 1 μ L de Superscript II y mezclar pipeteando suavemente
8. Incubar a 42°C por 50 minutos
9. Incubar a 70°C por 15 minutos. Guardar en freezer o proceder a la purificación.

b) *Purificación de ADNc*

1. Tomar los 20 μ L del producto de la RT y pasar a un eppendorf de 1.5mL (esto es para usar luego en el bloque que tiene ese tamaño de gradilla)
2. Agregar a cada tubo 20 μ L de NaOH 1M y 40 μ L de agua free
3. Incubar a 65°C por 30 minutos
4. Agregar 20 μ L de HEPES 1M para normalizar el pH
5. Agregar a cada tubo: 2 μ L de glucógeno (20 μ G/ μ L), 9 μ L de Acetato de Sodio 3N y 300 μ L de Etanol Absoluto frío (Esta mezcla queda a -20°C ON. El acetato y el etanol van a precipitar al ADNc. Como es más difícil precipitarlo que al ADN genómico,

dado el tamaño que tiene, se agrega glucógeno que, como polímero, ayuda a la precipitación).

6. Centrifugar a máxima velocidad (12000g), a 4°C, durante 20 minutos
7. Descartar y lavar con etanol 70% frío
8. Centrifugar a máxima velocidad, a 4°C, durante 5 minutos
9. Descartar por volcado. Dejar secar el pellet al aire por no más de 15min.
10. Resuspender en 20µL de agua y guardar a -60°C hasta utilizar.

c) PCR

1. Diluir cada ADNc al ¼
2. Preparar la siguiente mix para cada muestra, tanto para el gen COX-2 como para el gen HPRT, teniendo en cuenta hacer todas las determinaciones por duplicado.

Reactivo	Volumen
<i>Buffer 10X</i>	2.5 µL
<i>dNTPs 10 uM</i>	0.5 µL
<i>Primer Fw 10uM</i>	0.5 µL
<i>Primer Rw 10uM</i>	0.5 µL
<i>MgCl₂ 50 mM</i>	2 µL
<i>Taq 5U/ µL</i>	0.2 µL
<i>Agua roux</i>	15.8 µL
<i>ADNc</i>	3 µL

3. Programar el termociclador con el siguiente ciclado de la *Tabla 1*. La elección de la temperatura de annealing (60°C) tiene que ver con la temperatura de melting de los primers a utilizar, cuya secuencia se detalla en la *Tabla 2*.

95°C	2 minutos	1 ciclo
95°C	1 minuto	35 ciclos
60°C	30 segundos	
72°C	30 segundos	
72°C	10 minutos	1 ciclo
4°C	<i>Hold</i>	

Tabla 1. *Ciclado para la RT-PCR*

Gen	Secuencia del cebador directo	Secuencia del cebador reverso
COX-2	TGAGTACCGCAAACGCTTCT	CAGCCATTTCTTCTCTCCTGT
HPRT	AGACTGAAGAGCTATTGTAAT	CAGCAGTCTGCGACCTTGAC

Tabla 2. *Secuencia de los primers correspondientes a COX-2 y HPRT*

4. Al finalizar, guardar en freezer hasta correr en gel de agarosa.

d) Electroforesis en gel de agarosa

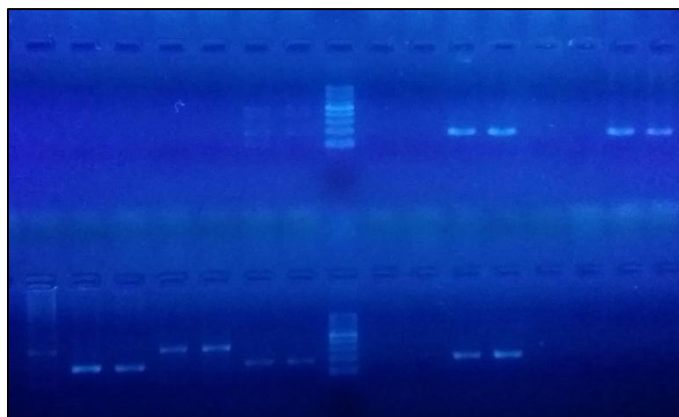
1. Armar la cama electroforética con los peines necesarios
2. Pesar la cantidad necesaria de agarosa, teniendo en cuenta el porcentaje de gel que se quiere preparar y el volumen final de buffer a utilizar. En este caso dado que el tamaño esperado de las bandas es de entre 100 a 1000 pb, se utiliza un gel de 2%, de modo que se pesan 2gr de agarosa para 100 ml de buffer de corrida. Mezclar y fundir en microondas. Volcar en la cama con los peines y esperar a que solidifique.
3. Sembrar cada una de las muestras en el orden deseado. En este caso se siembra una alícuota de 5µL + 1µL de buffer de carga, el cual posee entre otras cosas agentes densificantes para asegurar que la muestra cae en su correspondiente calle y no se difunde antes de correr.
4. Programar la fuente para que corra durante 35 minutos a 100V.
5. Finalizada la corrida llevar el gel al transiluminador UV y observar el resultado

5.3 Almacenamiento

- Los tubos con los productos de la RT y la PCR se pueden guardar en heladera (2°C-8°C) para períodos cortos de tiempo o en freezer (-20°C) para períodos más prolongados. El gel no se puede almacenar sino que debe ser descartado en bolsa roja (residuos patológicos).

5.4 Resultados

- Productos de RT-PCR sembrados en gel de agarosa y teñidos con bromuro de etidio



5.5 Posibles problemas y soluciones durante el procedimiento

- Falta de señal (ausencia de bandas):** Se puede deber a varios factores durante el proceso. No hay forma de chequear por separado ya que el resultado final es producto de todos los procedimientos llevados a cabo. De todas maneras, se puede poner el foco sobre: buena limpieza y uso de RNaseOUT para evitar la degradación del ARN molde; preparación de nuevas alícuotas de reactivos como oligodTs, primers específicos y dNTPs para descartar que sea un problema de los componentes de la reacción; conservar las enzimas en freezer hasta el mismo momento en que se utilizan y volver a guardar inmediatamente para evitar su degradación y pérdida de función; respetar las temperaturas de todo el protocolo, entre otras cosas. Además puntualmente para la electroforesis, chequear que el gel polimerizó correctamente y no tiene calles rotas para que no pierda la muestra que se siembra, recordar agregar bromuro de etidio u otro intercalante en el momento que corresponda ya que es la única forma de visualizar las bandas, y corroborar que los electrodos están ubicados de manera correcta de modo que las muestras corran por el gel y no para el lado contrario, donde terminan difundiéndose y perdiéndose.

6. **REFERENCIAS**

- Molecular Cloning – A Laboratory Manual. Sambrook, J. 4ta edición.

7. **HISTORIA**

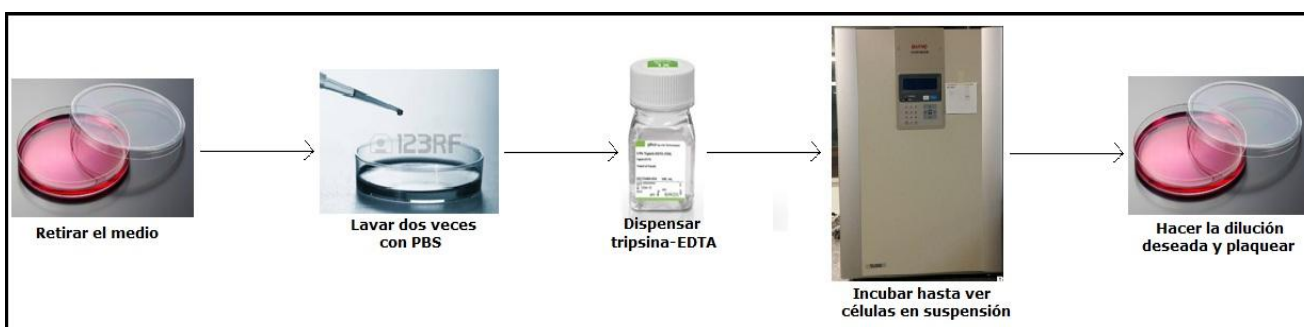
Documento: Nuevo

9.3. Anexo III: Esquemas de trabajo

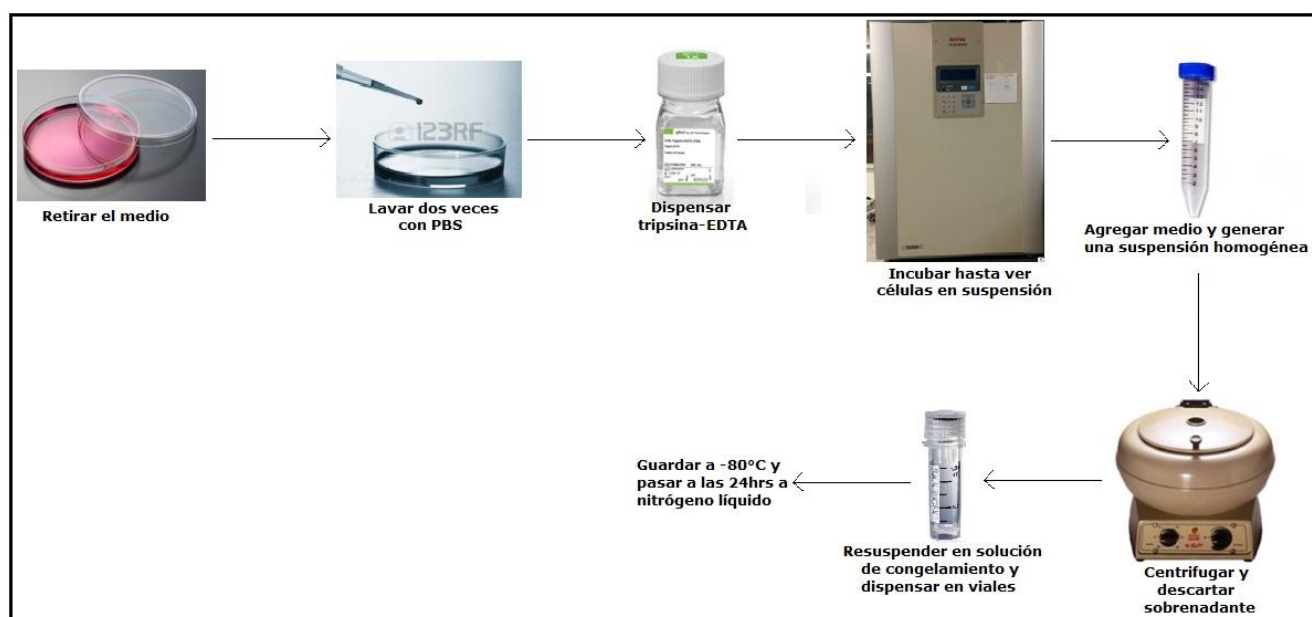
9.3.1. Esquema del procedimiento de descongelado



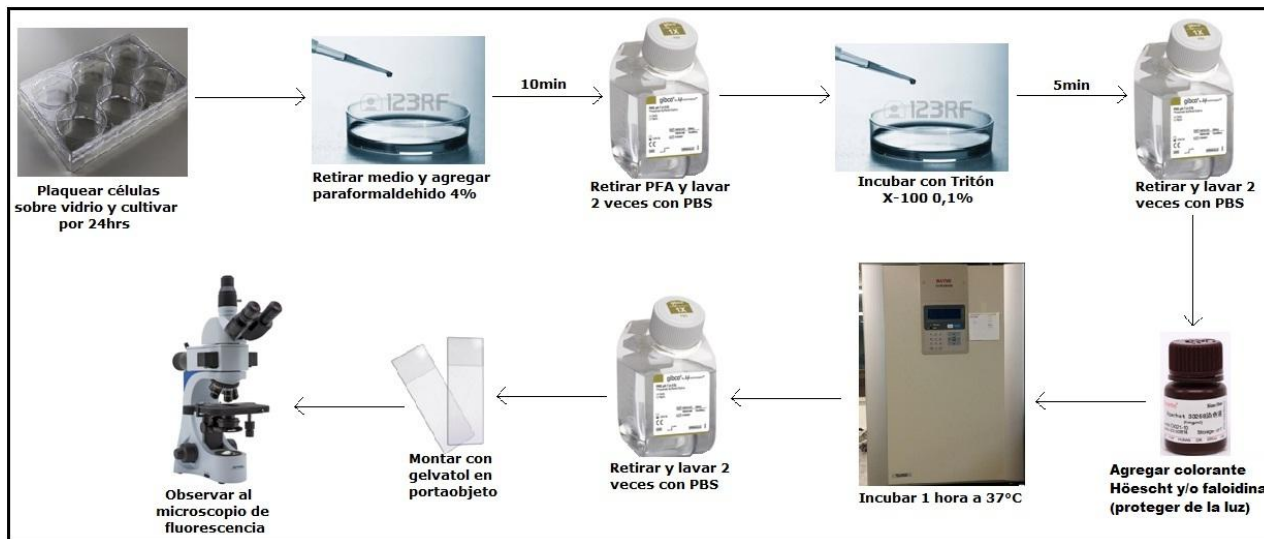
9.3.2. Esquema del procedimiento del repique en monocapa



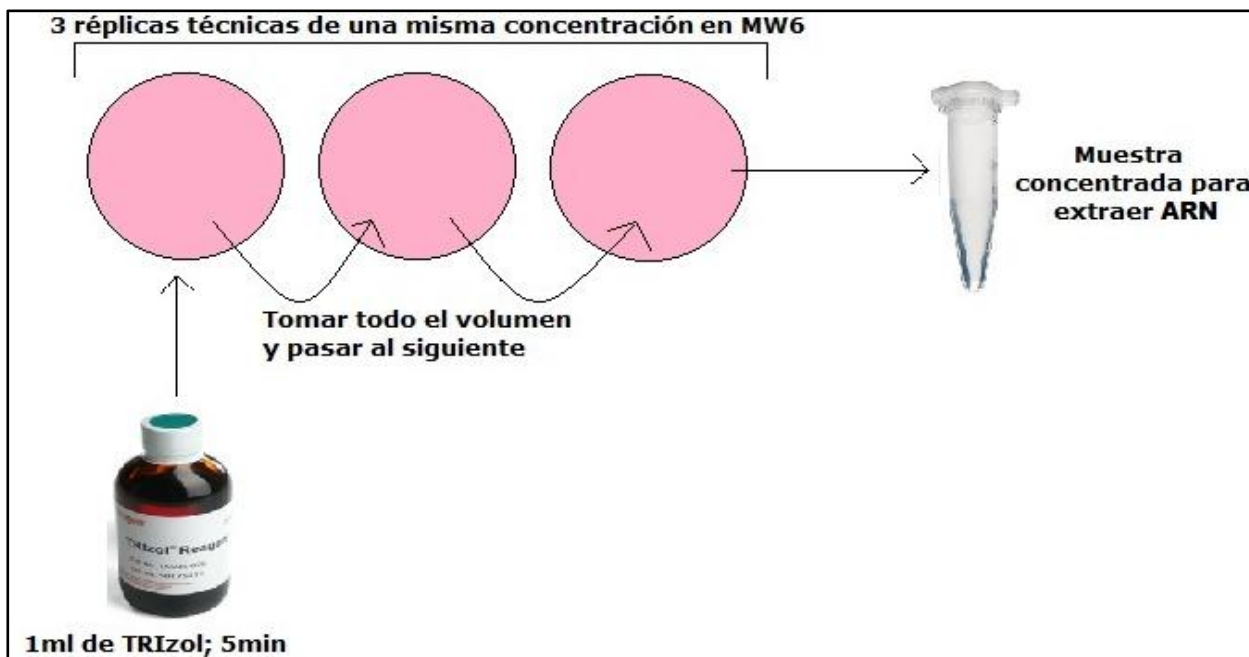
9.3.3. Esquema del procedimiento de congelado



9.3.4. Esquema del protocolo de tinción con colorante Hoescht y faloidina



9.3.5. Esquema del protocolo de toma de muestra de ARN



9.3.6. Esquema del protocolo de toma de muestra de proteínas

