



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO FUNCIONAL EN UN MODELO *IN VITRO* DE
INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE MOTILIDAD MEDIADO
POR ÁCIDO HIALURÓNICO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

KARLA DENISSE PORTILLA DOMÍNGUEZ



CDMX.2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO

VOCAL: ALBERTO ORTEGA VAZQUEZ

SECRETARIO: VANESSA VILLEGAS RUIZ

1er. SUPLENTE: JAVIER AXOSCO MARIN

2° SUPLENTE: MANUEL GUTIERREZ AGUILAR

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE ONCOLOGÍA EXPERIMENTAL, INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

DRA. VANESSA VILLEGAS RUIZ
ASESOR DEL TEMA

DR. SERGIO JUAREZ MENDEZ
SUPERVISOR TÉCNICO

KARLA DENISSE PORTILLA DOMINGUEZ
SUSTENTANTE

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Quiero agradecer en primer lugar a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por brindarme las herramientas necesarias para desarrollarme como QFB.

A mis asesores de tesis la Dra. Vanessa Villegas Ruiz y el Dr. Sergio Juárez Méndez, por compartir conmigo sus conocimientos, por apoyarme en cada paso de mi proyecto, por tener siempre la mejor disposición y paciencia.

A mis sinodales la Dra. Martha Patricia Coello Coutiño y el Dr. Alberto Ortega Vázquez por el tiempo que dedicaron a mi tesis y las observaciones realizadas que me permitieran mejorar la misma.

Por último al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT por el financiamiento del proyecto de investigación.

Índice

Abreviaturas	7
1.- Introducción	8
1.1.- Receptor de motilidad mediado por ácido hialurónico (<i>HMMR</i>)	8
1.1.2- <i>HMMR</i> en cáncer	8
1.1.3.- Mecanismo de señalización de <i>HMMR</i>	10
1.2.- Mecanismo de silenciamiento de genes mediante RNA de interferencia	12
1.2.1.- ShRNA (Short hairpin RNA)	13
1.3.- Expresión de <i>HMMR</i> en sujetos sanos	13
2.- Justificación	16
3.- Hipótesis	16
4.- Objetivos	16
5.- Materiales y métodos	17
5.1 Determinación del modelo experimental	17
5.1.1.-Extracción RNA	17
5.1.2.-Síntesis cDNA para PCR	17
5.1.3 PCR punto final	18
5.1.4.-Evaluación de la expresión de <i>HMMR</i> en líneas celulares transformadas	19
5.1.5.- RT-PCR en tiempo real	19
5.2 Bacterias competentes	20
5.2.1.- Transformación bacteriana	21
5.2.2.- Extracción DNA plasmídico	22
5.3.-Cultivo celular	24
5.4.- Western Blot (WB)	24
5.5.-Transfección	26
5.6.- Ensayo MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)	27
5.7.- Ensayo de la herida	28
5.8. Análisis estadístico.	28
6.- Resultados	29
6.1 Determinación del modelo experimental	29
6.1.2 Evaluación <i>HMMR</i> en líneas celulares	30

6.2.- Estrategia de silenciamiento	32
6.2.1 Transfección	32
6.3.- Expresión de <i>HMMR</i> y su interferencia	35
6.4.- Evaluación funcional de las células con menor cantidad de <i>HMMR</i>	38
7.- Discusión	41
8.- Conclusiones	45
9.- Perspectivas	45
10.- Bibliografía	46
Anexos	49
1.- Soluciones	49
2.- Western Blot	49
3.- Transformación bacteriana:	51
4.-Transfección:	52

Índice de figuras

Figura 1. Expresión de HMMR en cáncer de páncreas y tejido sano.....	9
Figura 2. Expresión de <i>HMMR</i> tiene impacto en la supervivencia.	10
Figura 3. Mecanismo de señalización HMMR en cáncer.	11
Figura 4. Expresión de HMMR en muestras de ALL..	14
Figura 5. Gráfico de Kaplan-Meier del efecto de la expresión de <i>HMMR</i> en la mortalidad.....	15
Figura 6. Vector de expresión..	22
Figura 7. Expresión del gen constitutivo <i>RPL4</i>	30
Figura 8. . Expresión del gen constitutivo <i>RPS18</i>	30
Figura 9. Expresión de <i>HMMR</i>	31
Figura 10. Expresión cuantitativa de HMMR en líneas celulares.	31
Figura 11. Curva de puromicina en células HEK-293, evaluada mediante MTT.. .	33
Figura 12. Selección de células transfectadas..	34
Figura 13. Expresión de RNA en células con HMMRi..	36
Figura 14. Análisis por Western Blot de la expresión de <i>HMMRi</i>	37
Figura 15. Expresión proteica en células con <i>HMMRi</i>	38
Figura 16. Viabilidad celular mediada por HMMRi.	39
Figura 17. Ensayo de herida.	40
Figura 18. Migración celular mediada por HMMRi..	41

Abreviaturas

<i>HMMR</i>	Receptor de motilidad mediado por ácido hialurónico
HA	Ácido hialurónico
ALL	Leucemia linfoblástica aguda
RNA _m	RNA mensajero
ShRNA	Short Hairpin RNA
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa cuantitativa
DMSO	Dimetilsulfóxido
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
CL ₅₀	Concentración letal 50
<i>HMMR_i</i>	Receptor de motilidad mediado por ácido hialurónico interferido
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

1.- Introducción

1.1.- Receptor de motilidad mediado por ácido hialurónico (*HMMR*)

El receptor de la motilidad mediado por ácido hialurónico (*HMMR*) también conocido como CD168 o *RHAMM* es un gen codificante para proteína, cuya ubicación citogenética se encuentra en el cromosoma número 5, en el brazo largo en el segmento 34 (www.genecards.org). A nivel de RNA, lo encontramos con baja expresión en distintas partes del organismo, por ejemplo: testículos, regiones del cerebro, músculo cardíaco, recto, placenta, entre otros (www.genecards.org).

La proteína codificada por *HMMR* funcionalmente está involucrada en motilidad celular (Turley, Noble, & Bourguignon, 2002a). Cuenta con 3 dominios: un dominio correspondiente a la región C terminal, el cual se asocia con el centrosoma; un dominio de unión al ácido hialurónico (IHABP), que puede estar involucrado en la transformación celular, desarrollo de metástasis y en la regulación de ERK; y un dominio de unión correspondiente a la región N terminal, funcionalmente asociado con BRCA1 (www.genecards.org).

1.1.2- *HMMR* en cáncer

Clínicamente, se ha reportado la sobreexpresión de *HMMR* en pacientes con distintos tipos de cáncer como: colon, mama, páncreas, ovario, entre otros (www.proteinatlas.org). Una de las evidencias de esta sobreexpresión, la podemos observar en un estudio (Cheng, Sato, Kohi, Koga, & Hirata, 2015) llevado a cabo en pacientes con adenocarcinoma de páncreas, el cual muestra un ejemplo de la expresión de *HMMR* en tejido sano de páncreas, comparado con tejido con cáncer de páncreas (Figura1). Donde se observa una diferencia significativa de la expresión de *HMMR* a nivel de RNAm, siendo mayor en las muestras de tejido de cáncer de páncreas. Al observar este mismo comportamiento indistintamente en cáncer, se sugiere que la sobreexpresión de *HMMR* es independiente del tipo de cáncer.

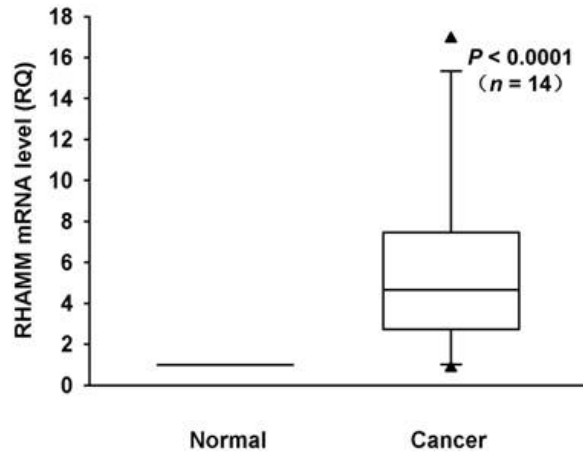


Figura 1. Expresión de HMMR en cáncer de páncreas y tejido sano. En la Figura observamos los niveles de RNAm de HMMR en tejido sano de páncreas y tejido de cáncer de páncreas, en donde se observa una sobreexpresión de HMMR en cáncer de páncreas. (Cheng et al., 2015)

Se ha identificado que la sobreexpresión de *HMMR* está asociada con mal pronóstico a la supervivencia, metástasis y progresión del cáncer. En este último, se ha observado la correlación de la expresión de *HMMR* con el estadio tumoral, mientras que, en la metástasis, la sobreexpresión de *HMMR* se correlaciona con una mayor migración e invasión celular. (Buttermore et al., 2017) (Mele et al., 2017a) (Abetamann, Kern, & Elsässer, 1996).

Por otro lado, a partir de la asociación que tiene la expresión de *HMMR* con la supervivencia, se ha reportado el impacto pronóstico de ésta. Un ejemplo es en cáncer gástrico, en donde se observó que aquellos pacientes con sobreexpresión de *HMMR*, tenían un porcentaje de supervivencia significativamente menor (Figura 2) comparado con aquellos en los que se encontraba una baja expresión.

Además, existía una correlación con las características clínico patológicas en donde aquellos pacientes con sobreexpresión de *HMMR*, presentaron invasión tumoral y desarrollo de metástasis a ganglios linfáticos (Ishigami et al., 2011).

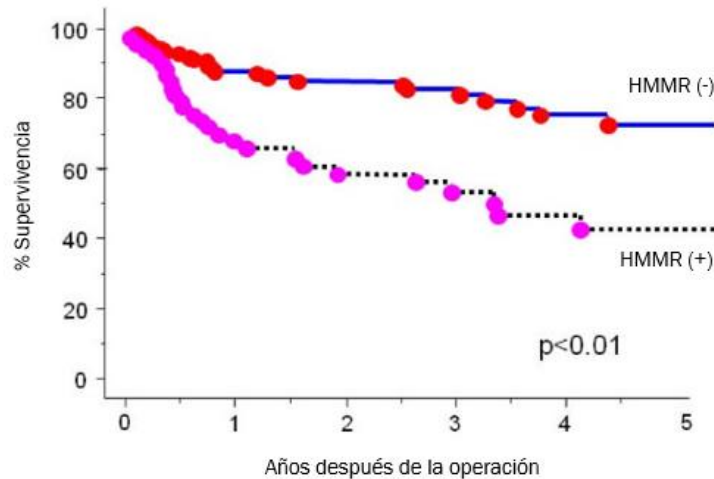


Figura 2. Expresión de *HMMR* tiene impacto en la supervivencia. En la Figura se observa una Gráfica de Kaplan-Meier donde muestra diferencia significativa, y se observa menor supervivencia en aquellos pacientes con mayor expresión de *HMMR* (Ishigami et al., 2011)

1.1.3.- Mecanismo de señalización de *HMMR*

Podemos encontrar a *HMMR* en distintos compartimentos, los cuales, incluyen la superficie celular e intracelular (Maxwell et al., 2003). Dependiendo el sitio donde se encuentre localizado, será la función que lleve a cabo y las proteínas con las que va a interactuar, (Figura 3).

HMMR intracelular lo podemos ubicar tanto en el citoplasma como en el núcleo, y se ha observado que predomina en citoplasma (Maxwell et al., 2011). En el citoplasma, *HMMR* interactúa con el complejo ERK/MEK mediante su extremo amino terminal, posteriormente se lleva a cabo la unión con tubulina, en donde las MAPK fosforilan a proteínas asociadas a tubulina que regulan la dinámica de los microtúbulos, promoviendo inestabilidad dinámica de la interfase de los microtúbulos (Tolg et al., 2010).

En el núcleo, existe la interacción entre las proteínas TPX2 y *HMMR*, de manera directa mediante el amino terminal y de manera indirecta mediante su secuencia carboxilo terminal, la cual, promueve el ensamblaje de los microtúbulos para la formación del huso mitótico (Chen et al., 2014).

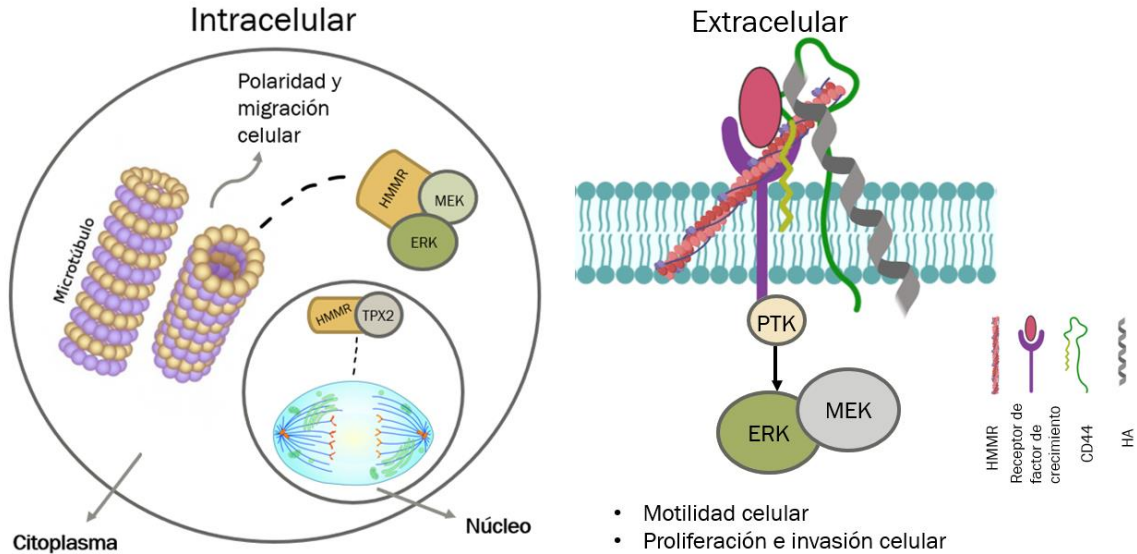


Figura 3. Mecanismo de señalización HMMR en cáncer. En la Figura observamos el mecanismo de HMMR tanto intracelular como en la superficie celular. Intracelularmente HMMR al interactuar con ERK y MEK proveerá propiedades de polaridad y migración celular, mientras que, en la superficie celular desencadena vías de señalización implicadas en la motilidad y proliferación celular.

Por otra parte, *HMMR* se puede exportar a la superficie celular mediante mecanismos no convencionales, ya que esta proteína carece de secuencias de señalización para exportación extracelular; sin embargo, estos mecanismos aún no han sido descritos con claridad (Radisky, Stallings-Mann, Hirai, & Bissell, 2009).

En la superficie celular, *HMMR* interactúa con HA (Ácido Hialurónico), uno de los principales componentes de la matriz extracelular, el cual, se encuentra en cantidades elevadas durante el desarrollo fetal (Tammi et al., 2008) y la cicatrización de heridas (Sironen et al., 2011). HA interactúa con CD44 (glicoproteína asociada a la adhesión celular), esta interacción va a mediar la activación de Src (necesaria para la motilidad celular) y de la proteína tirosina quinasa, que a su vez, desencadena la cascada de señalización de MEK1/ERK1,2 (complejo de proteínas cinasas) como consecuencia de la fosforilación de éstas proteínas. La activación de estas cascadas de señalización se ve implicada en la motilidad, proliferación e invasión celular (Turley et al., 2002a).

1.2.- Mecanismo de silenciamiento de genes mediante RNA de interferencia

El RNA de interferencia es un mecanismo celular endógeno en el cual, a partir de un RNA de doble hebra se lleva a cabo el silenciamiento de genes a nivel postranscripcional, mediante la complementariedad de un RNA pequeño (como los siRNA y los miRNA) con el RNAm blanco (Heigwer, Port, & Boutros, 2018).

Para que se lleve a cabo el silenciamiento génico, el RNA de doble hebra es procesado a RNA pequeño (cuya longitud aproximada es de 21-26 nucleótidos) por la ribonucleasa de tipo III “Dicer”. Estos RNA pequeños se unen al complejo RISC, compuesto por TRBP y Ago2; en donde la cadena anti-sentido del RNA pequeño, funge como guía para la unión mediante complementariedad de bases con el RNAm blanco induciendo así la represión transcripcional. (Naqvi, Islam, Choudhury, & Haq., 2009).

Existen distintas clases de RNA pequeños no codificantes con la capacidad de inducir silenciamiento génico, entre los más conocidos podemos encontrar a los siRNA (“small interference RNA”) y a los miRNA (microRNA), cuyas principales diferencias radican en:

- Sus precursores – los siRNA provienen generalmente de moléculas de RNA dúplex, mientras que los miRNA son principalmente procesados a partir de transcritos en horquilla.
- El número de RNA pequeños que se forman – cada siRNA precursor genera más de un siRNA dúplex, mientras que, para el miRNA, a partir de cada molécula precursora de horquilla únicamente se genera un miRNA (Ahmadzada, Reid, & McKenzie, 2018).

Tanto los siRNA como los miRNA son moléculas endógenas, sin embargo, no es la única manera de inducir el silenciamiento génico, ya que es posible utilizar moléculas exógenas, siendo los *short hairpin (ShRNA)* un ejemplo de éstos.

1.2.1.- ShRNA (Short hairpin RNA)

Como su nombre lo indica, éste es un RNA de horquilla corta, generado dentro de la célula mediante un vector plasmídico. Los ShRNA consisten de dos secuencias de RNA complementarias de 19-22 pb, unidas por una horquilla de 4-11 nucleótidos; que al igual que el RNA de interferencia, utiliza a RISC como mecanismo celular para la degradación del RNAm blanco (Moore, Guthrie, Huang, & Taxman, 2010).

Existen múltiples referencias asociadas al uso de los ShRNA, entre ellos: objetivos terapéuticos para distintas enfermedades, regulación del ciclo celular, estudios de ingeniería y biotecnológicos, estudio de función de genes, entre otros. (Abdolhamid, Sahar & Sepideh, 2016)

Una de las ventajas que posee un ShRNA es que los efectos del RNA de interferencia sean más prolongados y de mayor eficiencia al utilizar la maquinaria endógena de la célula y ser específicas a la secuencia del RNAm blanco. (Rao, Vorhies, Senzer, & Nemunaitis, 2009).

1.3.- Expresión de *HMMR* en sujetos sanos

En el grupo de investigación, se llevó a cabo un análisis masivo de transcriptoma en el que se evaluó la expresión del gen *HMMR* en sujetos sanos (linfocitos B) y en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda B, en donde se obtuvo una p con valor de 9.38×10^{-14} y una razón de cambio de 2.15. Como se observa en la Figura 4, existe una diferencia significativa entre ambos grupos de estudio, en donde las muestras de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda B, presentaron el mismo comportamiento que se ha reportado previamente en la literatura en muestras de diferentes tipos de cáncer (colon, mama, páncreas, ovario) en donde existe una sobreexpresión de *HMMR*.

Posteriormente, se validó la expresión en 80 pacientes con leucemia linfoblástica aguda B mediante RT-qPCR, datos que fueron analizados mediante la prueba estadística de Kaplan-Meier en donde se relacionó la expresión de *HMMR* con la mortalidad, dichos resultados se reportan en la Figura 5.

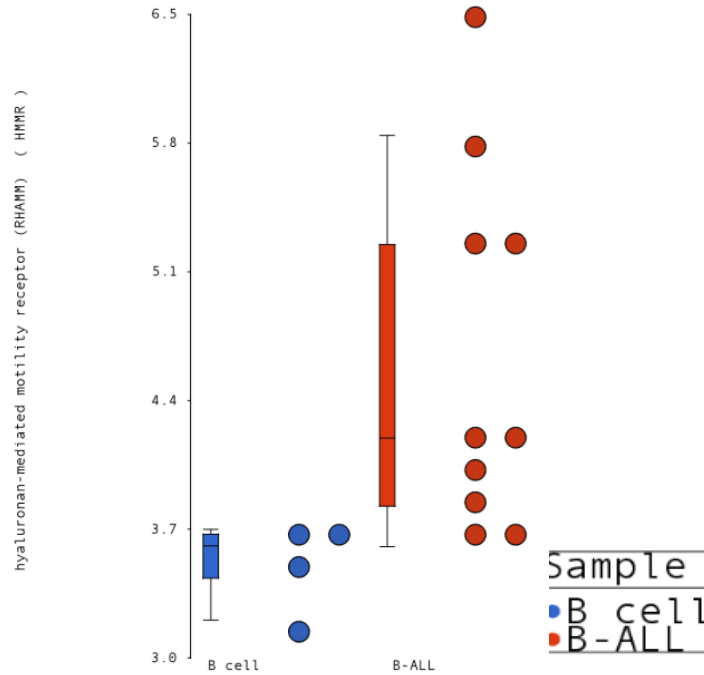


Figura 4. Expresión de *HMMR* en muestras de ALL. En la Figura se muestra el resultado de microarreglos de expresión de *HMMR* en células de pacientes con ALL, en donde los pacientes presentan una sobreexpresión en comparación con la expresión de *HMMR* en linfocitos B (control).

En la Figura 5 se muestran los resultados de la evaluación de la mortalidad asociada a la expresión de *HMMR*. Para los valores de expresión, se asignó un punto de corte con un valor de 0.37, a partir del cual, aquellos valores por arriba de este punto se consideraron con sobreexpresión de *HMMR*, mientras que los valores por debajo del punto de corte se consideraron de baja expresión de *HMMR*. Basándose en los valores definidos por el punto de corte, se observó que el porcentaje de supervivencia de aquellos pacientes con sobreexpresión de *HMMR*, era significativamente menor ($p=0.007$), respecto a aquellos pacientes con baja expresión de *HMMR*.

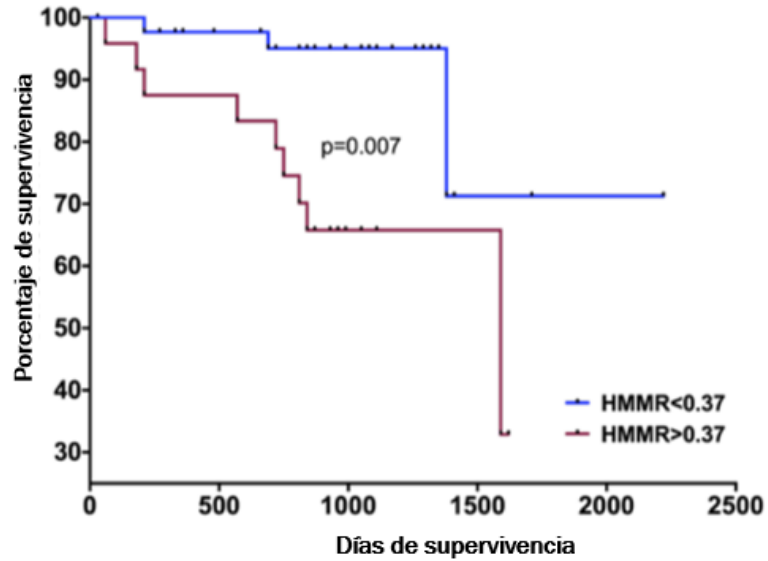


Figura 5. Gráfico de Kaplan-Meier del efecto de la expresión de *HMMR* en la mortalidad. En esta Figura se muestra la relación de la expresión de *HMMR* y la mortalidad en un grupo de 80 pacientes con leucemia linfoblástica aguda B, evaluados mediante qPCR. Se observa que la supervivencia es menor para aquellos pacientes con mayor expresión de *HMMR*.

Dichos resultados nos permiten concluir que existe una relación positiva de la expresión de *HMMR* con la supervivencia de los pacientes, en donde ésta se verá afectada si existe una sobreexpresión de *HMMR*. Por otra parte, estos resultados sugieren a *HMMR* también como un potencial marcador pronóstico.

2.- Justificación

El *HMMR* es un gen codificante para proteína, el cual se encuentra en distintas partes del organismo con baja expresión. No obstante, la sobreexpresión de *HMMR* se ha identificado en distintos tipos de cáncer, y ésta se ha asociado a invasión tumoral, metástasis y menor porcentaje de supervivencia, teniendo como consecuencia un pronóstico adverso para los pacientes. Por lo que, la sobreexpresión de *HMMR* se relaciona con la mortalidad y se ha propuesto a *HMMR* como un marcador pronóstico.

A pesar de que, se ha descrito un mecanismo general mediante el cual *HMMR* actúa, se desconocen aquellos genes asociados a éste y su regulación génica. Una estrategia para conocer el perfil de expresión asociado a este gen es abatiendo su expresión. Por lo tanto, se debe de establecer un modelo de inhibición estable para *HMMR*.

3.- Hipótesis

La inhibición de la expresión de *HMMR* en células transformadas, mostrará una disminución en la viabilidad y migración celular.

4.- Objetivos

Objetivo general

Determinar el efecto funcional de inhibición de la expresión de *HMMR* en células transformadas.

Objetivos particulares

- Desarrollar un modelo estable de inhibición de *HMMR*.
- Evaluar la inhibición de *HMMR* y los efectos funcionales (viabilidad y migración celular) en las células transformadas.

5.- Materiales y métodos

5.1 Determinación del modelo experimental

Para determinar el modelo experimental, se evaluó de manera cuantitativa la expresión de *HMMR* en 22 líneas celulares las cuales se encontraban disponibles en el laboratorio.

5.1.1.-Extracción RNA

Para la extracción de RNA se utilizó el kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA, USA). En primer lugar, se lavaron las células (Tabla 1) con PBS 1x, se adicionaron 600uL del buffer de lisis RLT y se colocaron las células en el TissueLyser (Qiagen, Valencia, CA, USA) 2 min. /25 Hertz. Se adicionó etanol del 70-75% en una relación de 1:1 y se transfirió a la columna en donde se adicionó buffer RW1 y se llevaron a cabo 2 lavados con buffer RPE centrifugando a 10,000 rpm durante 2 min. Para eluir se utilizó un total de 40ul de H₂O libre de RNAsa y se calentó a 60°C durante 10 min.

La cuantificación del RNA se llevó a cabo en el Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

5.1.2.-Síntesis cDNA para PCR

Para la síntesis de cDNA, primero el RNA se trató con: 1uL Buffer 10x, 1U de DNAsa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), y agua DEPC (cbp 10uL de reacción), y se incubó a 37°C por 30 min. Una vez transcurrido el tiempo, se retiraron los tubos y se adicionó 1uL de EDTA 50mM, se incubaron a 65°C por 10 minutos.

Posteriormente se adicionaron los componentes para la síntesis de cDNA (concentración final de 50ng/uL). A cada reacción se adicionó: 1.5 uL de agua DEPC (para completar un volumen final de 20uL), 4uL de 5x reaction buffer, 2uL de dNTPs 10mM (concentración final de 1mM), 100pmol random hexamers, 10U

RibolackRNAse inhibitor, RNA previamente tratado con DNAsa y 200U de Revertaid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) , se homogeneizaron y se continuó con el siguiente ciclaje: 25°C – 10 min, 42°C – 60 min, 72°C – 10 min. (1 ciclo).

5.1.3 PCR punto final

Para evaluar la integridad del cDNA sintetizado se llevó a cabo la preparación de un master mix (1X) el cual contenía: 4.5 uL de agua DEPC, 7.5uL de mix de KAPA2G (Kapa Biosystems Inc., Wilmington, MA, USA) y 1uL de primers Forward y Reverse (0.5uM).

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos para evaluación de integridad de cDNA mediante PCR punto final

Housekeeping	Secuencia	Tm (°C)	Tamaño (pb)
RPL4 FW	5´CGAATGAGAGCTGGCAAAGGCAAA 3´	60	243
RPL4 RV	5´ACGCCAAGTGCCGTACAATTCATC 3´	60	243
RPS18 FW	5´AATCCACGCCAGTACAAGATCCCA 3´	60	240
RPS18 RV	5´TTTCTTCTTGGACACACCCACGGT 3´	60	240

A cada reacción se adicionó cDNA a una concentración final de 25 ng/uL, se homogeneizó y se llevó las muestras al termociclador PCR System cycler (Applied Biosystem Inc, California, USA), bajo las siguientes condiciones: pre-desnaturalización 95°C – 3 min, 38 ciclos con las siguiente temperaturas 95°C – 15 seg., tm: 60°C – 15 seg, 72°C – 15 seg. y una extensión final de 72°C – 5 min.

Se llevó a cabo la evaluación del amplificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio. El gel se corrió a 85 volts durante 35 min.

5.1.4.- Evaluación de la expresión de *HMMR* en líneas celulares transformadas

Para evaluar la expresión de *HMMR* en las líneas celulares, se llevó a cabo la preparación de un master mix (1X) el cual contenía: 4.5 uL de agua DEPC, 7.5uL de mix de KAPA2G (Kapa Biosystems Inc., Wilmington, MA, USA) y 1uL de primers Forward y Reverse (0.5uM).

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos para evaluación de expresión de *HMMR* mediante PCR punto final

Primers <i>HMMR</i>	Secuencia	Tm (°C)	Tamaño (pb)
FW	5'-GCGTTAACAGCCAGTGAGATAG-3'	58	98
RV	5'-TGCTGAACATCCTCTGCA-3'	58	98

A cada reacción se adicionó cDNA a una concentración final de 25 ng/uL, se homogeneizó y se llevó las muestras al termociclador PCR System cycler (Applied Biosystem Inc, California, USA), bajo las siguientes condiciones: pre-desnaturalización 95°C – 3min, 38 ciclos con las siguiente temperaturas 95°C – 15 seg, tm: 58°C – 15 seg, 72°C – 15 seg. y una extensión final de 72°C – 5 min.

Se llevó a cabo la evaluación de la expresión de *HMMR* en las líneas celulares mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio. El gel se corrió a 85 volts durante 35 min.

5.1.5.- RT-PCR en tiempo real

Con el fin de realizar una cuantificación relativa de la expresión de *HMMR* en las líneas celulares, se llevó a cabo RT-PCR en tiempo real, utilizando 5 ng de cDNA y un master mix (1X) en el cual se adicionaron: 2 uL de agua DEPC, 7.5 uL de Sybr green (Kapa Biosystems Inc., Wilmington, MA, USA) (concentración final de 2.5mM), 0.5 uL de Primers (concentración final de 10um)

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos para qPCR en tiempo real.

Primers	Secuencia	Tm (°C)	Tamaño (pb)
RPS18_qpcr FW	5' CAGCCAGGTCCTAGCCAATG 3'	60	82
RPS18_qpcr RV	5' CCATCTATGGGCCCCGAATCT 3'	60	82
<i>HMMR</i> FW	5' GCGTTAACAGCCAGTGAGATAG 3'	60	98
<i>HMMR</i> RV	5' TGCTGAACATCCTCTGCA3'	60	98

Las muestras fueron llevadas al termociclador Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystem Inc, California, USA), y se evaluaron bajo las siguientes condiciones: pre-desnaturalización de 95°C -10 min. 40 ciclos con las siguientes temperaturas: 95°C -15 seg., tm 60°C – 30 seg., desnaturalización 95°C – 15 seg., y curva melt 52°C – 1 min.

5.2 Bacterias competentes

Se comenzó con un precultivo a partir de bacterias *E. coli* Top10. Se adicionaron 10 uL de las bacterias en solución 1 (Anexo 1a) a un tubo con 25 mL de medio LB (tubo "A") (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), y 10 uL a una caja Petri con medio LB y LB más el antibiótico de selección, Kanamicina (Sigma, CA, USA). Se incubaron a 37°C por 16 hrs, con una agitación de 3000rpmp.

Una vez transcurrido el tiempo y verificado que no hubiera crecimiento en la placa con el medio LB + el antibiótico LB se procedió al cultivo. Se hicieron dos alícuotas, las cuales, cada una contenía: 200uL del tubo "A" y 30mL de medio LB. Se incubó a 37°C a 250 rpm, durante 3 hrs. Una vez transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595nm, hasta obtener una densidad óptica entre 0.375 y 0.5 nm, lo cual nos indicaría que se tenía la cantidad suficiente de bacterias para llevar a cabo la competencia.

Una vez obtenida la densidad óptica deseada, se incubaron 15 minutos en hielo, se centrifugó a 4000rpm durante 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón en medio LB , se adicionaron 4 mL de la solución 1 y se homogeneizó, se incubó en hielo durante 15 minutos, se centrifugó nuevamente a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet, se adicionaron 2mL de la solución 2 (Anexo 1b), se homogeneizó y se hicieron alícuotas de 50 uL.

5.2.1.- Transformación bacteriana

Se transfirieron 3 uL del vector de interés (4 interferentes, un scramble, y un vector vacío obtenido de OriGene Co. (Rockville, USA) a 50 uL de bacterias competentes, se homogeneizó y se incubó durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente, se incubó a 42°C durante 45 segundos y a 4°C durante 5 minutos. Se adicionó 1 mL de medio LB y se incubó a 37°C durante 90 minutos a 300rpm. Con el fin de obtener colonias aisladas, se realizaron diluciones 1/10 y 1/100 en medio LB y se sembró en placa con medio LB y LB+Kanamicina y se incubaron a 37°C durante una noche.

En esterilidad, se tomó una colonia aislada de cada caja de las diluciones 1/100 con medio LB+Kanamicina y se creció en un tubo con 8mL de medio LB+Kanamicina, a 37°C durante 16 hrs. Las bacterias transformadas se conservaron a -70°C en crioviales los cuales contenían 500uL de éstas y 500uL de una mezcla de glicerol/agua al 50%.

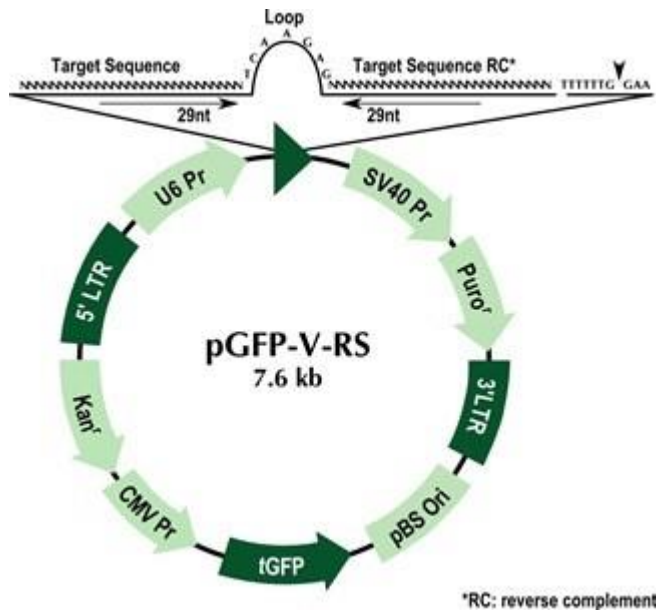


Figura 6. Vector de expresión. El vector de expresión de ShRNA para la inhibición de *HMMR* cuenta con un promotor U6 para la expresión del ShRNA, una etiqueta de puromicina (antibiótico de selección para la transfección), secuencia 3'LTR (para empaquetado de partículas retrovirales), etiqueta GFP (proteína verde fluorescente para evidenciar la transfección), etiqueta de kanamicina.

5.2.2.- Extracción DNA plasmídico

La extracción de DNA plasmídico se llevó a cabo con el kit: Roti-PrepPlasmid Mini-CL ROTH (Qiagen, Valencia, CA, USA). De forma breve se describe a continuación.

Se centrifugó un tubo falcon con 5 mL de las bacterias transformadas, a 4000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con el medio restante. Se realizó un lavado con 2 mL de medio LB+Kanamicina centrifugando a 4000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se decantó el sobrenadante y resuspendió el pellet.

Se adicionaron 550 uL de buffer RB y se homogeneizó. Se adicionaron 550 uL de buffer de lisis y se mezcló por inversión 10 veces. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó 750 uL de buffer de neutralización y se invirtió nuevamente 10 veces.

Se centrifugó a 14000rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Del sobrenadante obtenido se adicionó a la columna de filtración y lo recolectado en el tubo de lavado se centrifugó a 12,000rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente; el sobrenadante obtenido se decantó.

Se adicionaron 650 uL de buffer de lavado PA en la columna y se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente.

Se adicionaron 750 uL de buffer de lavado PB en la columna y nuevamente se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó en seco a 14,000 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente

Se llevó a cabo elución de la columna con agua a 60°C y se incubó el sobrenadante durante 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 8,000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido es el DNA, el cual se cuantificó en nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Se llevó a cabo una segunda extracción, con el kit: Plasmid Plus Midi Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Para esta extracción, se centrifugó a 3500 rpm/15 min/ 4°C un tubo falcon con bacterias transformadas en medio LB + kanamicina. Posteriormente se decantó el sobrenadante, se adicionó 1 mL de medio LB + kanamicina y se homogeneizó.

Se centrifugó a 3500 rpm/15 min/ 4°C, se decantó el sobrenadante y se adicionaron 2 mL de medio LB + kanamicina. Se centrifugó a 3500 rpm/5 min/ 4°C, se adicionó 4mL de Buffer P1 y se resuspendió el pellet. Se adicionaron 4 mL de Buffer P2, se homogeneizó por inversión (x20).

Al lisado se le adicionaron 4mL de Buffer s3 y se invirtió 6 veces, se transfirió a Qiafilter Cartridge y se incubó durante 10 min. a temperatura ambiente. Posteriormente el lisado se filtró a un tubo falcon, se adicionaron 2 mL del Buffer BB y se invirtió el tubo 6 veces. El lisado se transfirió a una columna y se centrifugó a 13,000 rpm/1min eliminando posteriormente el sobrenadante. Se adicionaron 700uL del Buffer ETR y se centrifugó a 13,000 rpm/1min eliminando posteriormente el sobrenadante.

Se adicionaron 700uL del Buffer PE, se centrifugó a 13,000 rpm/1min eliminando posteriormente el sobrenadante y se centrifugó a 13,000 rpm/1min en seco. Se transfirió la columna a un tubo eppendorf de 1.5mL, se adicionaron 75uL de Buffer EB a 60°C, se incubó 5 min. a temperatura ambiente y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 min. *Este paso se repitió una vez más. El sobrenadante obtenido es el DNA, el cual se cuantificó en nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

5.3.-Cultivo celular

Se llevó a cabo el cultivo de las células HEK-293. Se crecieron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) al 10% + 1mL de penicilina-estreptomicina (100 U/ml, ATCC) por cada 100 mL de medio. Se incubaron a 37°C y 5% CO₂.

5.4.- Western Blot (WB)

Para llevar a cabo el WB es necesario tener proteína, por lo que el primer paso fue llevar a cabo lisis celular y la extracción de la proteína. Se realizó un conteo del número de células a las que se les extraería la proteína, para determinar la cantidad de buffer de lisis necesaria, siguiendo la relación de 10, 000,000 células por 1 mL de Buffer de lisis.

Posteriormente estas células, suspendidas en PBS, se centrifugaron a 1,500 rpm durante 5 min. Se retiró el PBS por decantado y se resuspendió el pellet en un buffer de lisis (Anexo 1c), el volumen en el cual se resuspende, varía dependiendo del número de células que se tenían. Se incubó en hielo y se dio vortex por 30 seg. cada 5 min, durante 1 hr. Se centrifugó 12,000 rpm durante 20 min, a 4°C y se conservó la suspensión.

Posteriormente se llevó a cabo la cuantificación de proteínas mediante el método de Lowry (DC Protein Assay Kit.) (BIO-RAD, CA, USA). Una vez que se tiene la proteína, el primer paso es llevar a cabo una electroforesis en un gel al 10% (Anexo 2a).

Para la preparación de la proteína que se cargó en los geles, se adicionó en un tubo eppendorf 1/5 Buffer de carga (5uL B-mercapto por cada 100uL buffer de carga) con relación a la cantidad de proteína que se utilizó (40ug), se hirvió durante 5 min y posteriormente se colocó 1 min en hielo y se corrió la electroforesis a 130V durante 2 hrs.

Una vez transcurrido el tiempo de electroforesis el gel se llevó a transferencia semi-húmeda. Para llevar a cabo esta transferencia, en primer lugar, se activó una membrana de PVDF en metanol durante 1 min. Posteriormente se sumergió en buffer de transferencia (Anexo 2b) los filtros, el gel de la electroforesis y la membrana durante 15 min. Estos fueron colocados en el equipo de transferencia en el siguiente orden: papel filtro, encima la membrana, encima el gel y por último papel filtro. La transferencia se llevó a cabo a 0.31A durante 40 min.

Una vez que las proteínas se encontraban en la membrana, ésta se bloqueó en leche descremada al 5% (en tbs-tween 20) durante 30 min. Posteriormente la membrana se incubó con el anticuerpo diluido en leche descremada al 5% (en TBS-tween 20) durante 16 hrs. Transcurrido el tiempo, se lavó la membrana con TBS-tween (5 min. con 1 min. de agitación vigorosa) 3 veces.

Se incubó la membrana con el anticuerpo secundario (dilución en leche con tbs-tween) durante 1 hr. Transcurrido el tiempo, se lavó la membrana con Tbs-tween (5 min. con 1 min. de agitación vigorosa) 3 veces. El complejo formado fue revelado mediante quimioluminiscencia.

- Detección de GFP

Anticuerpo primario: Anti-tGFP clone OT12H8 ratón/monoclonal, dilución 1:1000

Anticuerpo secundario: anti-mouse igG Alpaca No.cat. 5-035-214, dilución 1:50,000

- Detección *HMMR*

Anticuerpo primario: anti-CD168 ab185728 conejo/policlonal Abcam, dilución 1:2000

Anticuerpo secundario: anti-rabbit sc-2357 Santa Cruz, dilución: 1:5000

- Detección β -actina

Anticuerpo primario: sc-47778 ratón/monoclonal, dilución 1:1000

Anticuerpo secundario: anti-mouse igG Alpaca No.cat. 5-035-214, dilución 1:50,000

Para la evaluación de la expresión de proteína, se llevó a cabo un análisis densitométrico utilizando el programa Quantity one, y a partir de los resultados obtenidos se normalizó la expresión de *HMMR* contra la expresión de B-actina.

5.5.-Transfección

Se llevó a cabo la siembra de 900,000 células en paca de 6 pozos, con el fin de tener a las 24 hrs una confluencia de 80%-90%. En un tubo estéril se preparó la dilución A, y en tubos independientes estériles se preparó la dilución B.

Dilución A:

	Por pozo
Lipofectamina 3000	7.5 uL
OptiMem	118 uL
Volumen Total	125 uL

Dilución B:

	OptiMem	P3000	2.5 ug DNA	Volumen T.
Sh1 (conc. = 809.4ng/uL)	116 uL	5 uL	3.2 uL	125 uL
Sh2 (conc. = 840.7ng/uL)	117 uL	5 uL	3.0 uL	125 uL
Sh3 (conc. = 2966.4ng/uL)	111 uL	5 uL	9.0 uL	125 uL
Sh4 (conc. = 1020.9ng/uL)	114 uL	5 uL	2.5 uL	125 uL
Scr (conc. = 1752.3ng/uL)	105.7 uL	5 uL	14.3 uL	125 uL
VV (conc. = 1799.7ng/uL)	106.8 uL	5 uL	13.2 uL	125 uL
Cel+optimem+lipofectamina	120 uL	5 uL	-	125 uL

Ambas diluciones se incubaron por separado durante 5 min. a temperatura ambiente, una vez transcurrido el tiempo se mezcló suavemente la dilución "B" con la dilución "A" (solución "C") y se incubó 20 min. a temperatura ambiente.

Se retiró el medio de las células y se adicionó 250uL de la solución "C" + OptiMem (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (cbp 2mL).

Se incubó durante 12 hrs a 37°C y 5% CO₂. Se retiró el medio y se adicionó medio suplementado para restablecer el cultivo. Transcurrido las 24 hrs, se realizó un cambio de medio por medio suplementado + Puromicina (Sigma, CA, USA) a una concentración de 1.5ug/mL (antibiótico de selección). Estas células se mantuvieron en el medio suplementado con el antibiótico, hasta que se tuvo una selección cercana al 100% de las células transformadas.

5.6.- Ensayo MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)

Se crecieron 35,000 células por pozo en una placa de 96 pozos (cada condición se realizó x8) con el fin de tener el 80-90% de confluencia a las 24 hrs. Una vez transcurrido este tiempo y alcanzada la confluencia, se decantó la placa para retirar el medio y se adicionó 100uL de PBS por pozo. Posteriormente se decantó el PBS, se adicionó 20uL de reactivo MTT (Sigma, CA, USA) por pozo y se incubó 4hrs/37°C.

Se decantó el MTT y se lavó cada pozo con 200uL de PBS; se decantó el PBS y se adicionó 100uL de DMSO (Sigma, CA, USA) por pozo, homogeneizando con la punta de la pipeta. Se colocó en el homogeneizador durante 5min./ 4 revoluciones, protegido de la luz; se incubó 10 min. a 37°C (protegido de la luz), se homogeneizó 4 revoluciones/1min. y se leyó en el espectrofotómetro SpectraMax plus384 (Molecular Devices, CA, USA) a 570nm.

5.7.- Ensayo de la herida

Se crecieron 700,00 células por pozo en una placa de 6 pozos (para cada condición: Sh1, Sh2, Sh3, Sh4, Scr y VV, por triplicados) y a las 24 hrs se realizó una herida en todo el diámetro del pozo, con una punta de 200uL. Con una cámara profesional se tomaron fotografías de la herida al tiempo 0, 24hrs y 48 hrs, para posteriormente tomar las medidas.

5.8. Análisis estadístico.

Para la evaluación de la expresión de RNA, proteínas y ensayo de la herida, los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Para su análisis se utilizó la prueba estadística t de student, los resultados se consideraron significativos con $p < 0.05$ y nivel de confianza del 95%.

Para la evaluación del ensayo MTT, se llevaron a cabo 8 réplicas del experimento. El análisis estadístico que se utilizó fue mediante análisis de varianza (ANOVA), en donde se consideró al control como el 100% de viabilidad. Los resultados se consideraron significativos con $p < 0.05$ y nivel de confianza del 95%.

6.- Resultados

6.1 Determinación del modelo experimental

En primer lugar, se buscaba determinar el modelo experimental de inhibición de *HMMR*, siendo éste una línea celular cuya expresión de *HMMR* fuera elevada, para que de esta manera el silenciamiento fuera más evidente. Para ello, se realizó la síntesis de cDNA a partir de RNA mensajero de las líneas celulares que se encontraban disponibles en el laboratorio, las cuales, se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1. Líneas celulares de cáncer

Línea celular	Origen
1. K-562	Leucemia Mieloide Crónica
2. Daoy	Meduloblastoma
3. SUP-B15	Leucemia Linfoblástica Aguda
4. Jurkat	Leucemia de células T
5. SW480	Adenocarcinoma colorectal
6. HeLa	Adenocarcinoma de cérvix
7. CCRF-CEM	Leucemia Linfoblástica Aguda
8. MDA-MB-231	Adenocarcinoma de mama
9. WERI-Rb-1	Retinoblastoma
10. HTR-8/SVneo	Trofoblasto de placenta
11. SK-OV-3	Adenocarcinoma de ovario
12. TOV-21g	Adenocarcinoma de ovario
13. NIH:OVCAR-3	Adenocarcinoma de ovario
14. TOV-II2D	Adenocarcinoma de ovario
15. ES-2	Carcinoma de células claras de ovario
16. Hep G2	Carcinoma hepatocelular
17. RS4;11	Leucemia Linfoblástica aguda
18. PC-3	Adenocarcinoma de próstata
19. SH-SY5Y	Neuroblastoma
20. HEK-293	Célula embrionaria de riñón
21. SJCRH 30	Rabdomiosarcoma
22. MCF7	Adenocarcinoma de mama

<La integridad del cDNA sintetizado fue evaluada utilizando dos genes constitutivos (*RPL4* Y *RPS18*). En la Figura 7 observamos que todas las muestras amplificaron el gen *RPL4*, correspondiente a una banda en un peso aproximado de 243pb; mientras que en la Figura 8 se observa la amplificación del gen *RPS18* en donde las bandas obtenidas tienen un peso aproximado de 240pb. Esto nos permite confirmar que nuestro cDNA puede ser amplificado y que puede ser utilizada para evaluar la expresión de nuestro gen de interés.

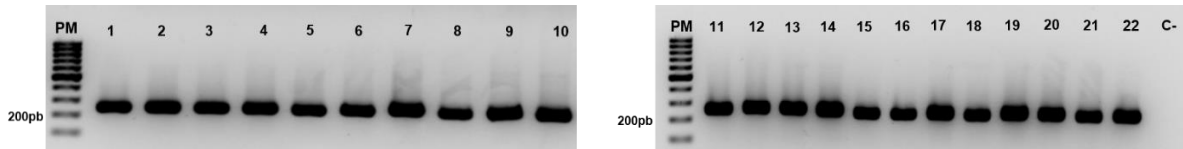


Figura 7. Expresión del gen constitutivo *RPL4*. Observamos la expresión de 22 líneas celulares, con un peso aproximado de 243pb, evaluadas mediante Sybr Gold en un Gel de agarosa al 2%.

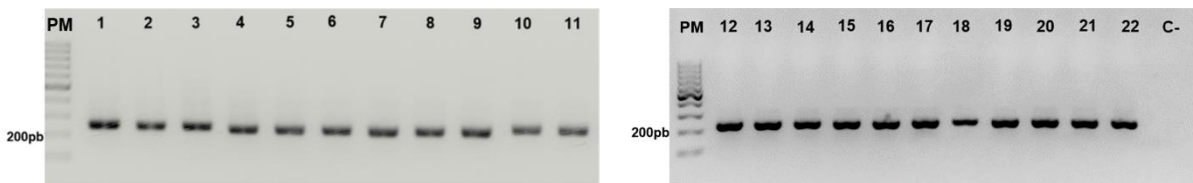


Figura 8. . Expresión del gen constitutivo *RPS18*. En la Figura se muestra la expresión del gen *RPS18* en las 22 líneas celulares, con un peso aproximado de 240pb, evaluadas mediante bromuro de etidio (agente intercalante) en un gel de agarosa al 2%.

6.1.2 Evaluación *HMMR* en líneas celulares

Una vez comprobada la integridad de nuestras líneas celulares, se evaluó la expresión del gen de interés (*HMMR*), en las 22 líneas celulares, con el fin de determinar cuáles de éstas expresaban *HMMR* y así determinar nuestro modelo experimental. En la Figura 9 se observa que las 22 líneas celulares expresaron *HMMR*. No obstante, se observan bandas más intensas que otras, siendo más notoria esta diferencia entre la banda de la muestra 1 en comparación con la banda de la muestra 21. Sin embargo, por el método que utilizamos hasta ese momento no era posible determinar con certeza que línea celular tiene mayor expresión de *HMMR*.

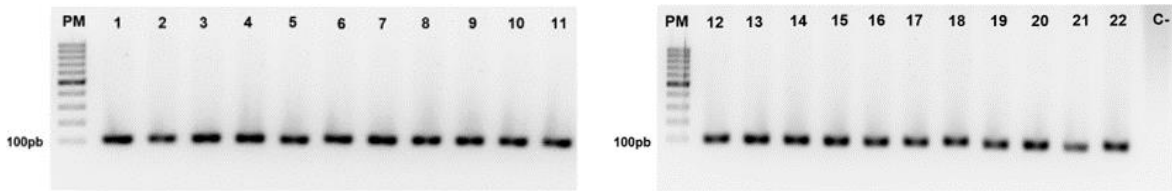


Figura 9. Expresión de *HMMR*. En esta Figura se muestra la expresión de *HMMR* en las 22 líneas celulares, con un peso aproximado de 98 pb, evaluadas mediante bromuro de etidio en un gel de agarosa al 2%.

Por lo que fue necesario obtener valores cuantitativos de expresión de *HMMR*, usando RT-qPCR, y así tener la línea celular con mayor expresión del gen. De todas líneas celulares iniciales, se seleccionaron aquellas que fueran adherentes (HEK-293, SW480, HeLa, MDA-MB231 y MCF-7), por factibilidad del trabajo. En la Figura 10 podemos observar la gráfica de la expresión cuantitativa de mRNA de *HMMR*: en el eje x, se encuentran las líneas celulares evaluadas y en el eje y, los valores de la expresión relativa, normalizada respecto al gen constitutivo, *RPS18*. Como se observa, la línea celular HEK-293, es la línea que presenta mayor expresión del gen *HMMR* que el resto, por lo que se determinó a ésta como modelo potencial de inhibición.

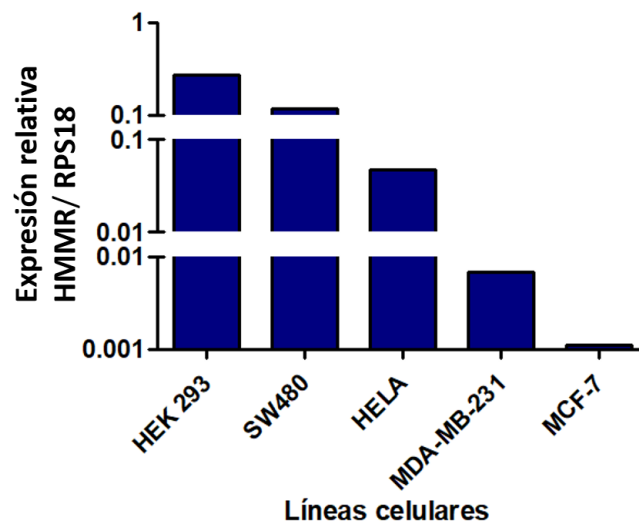


Figura 10. Expresión cuantitativa de *HMMR* en líneas celulares. En la Figura podemos observar la expresión de *HMMR* en 5 diferentes líneas celulares, siendo HEK-293 la línea celular con mayor expresión relativa y MCF7 la de menor expresión.

6.2.- Estrategia de silenciamiento

Para la obtención del DNA plasmídico que contenía las secuencias de los interferentes de *HMMR* (Sh1, Sh2, Sh3 y Sh4) y controles (Scr y VV) *HMMR*, se realizó una transformación bacteriana. Estos cuatro DNAs se utilizaron para determinar cuál de todos tenía la mayor eficiencia de silenciamiento. Para determinar que la inhibición de *HMMR* era específica, se utilizó un scramble, el cual contenía en el sitio múltiple de clonación una secuencia con las mismas bases que el gen blanco pero en distinto orden, por lo tanto, no llevaría a cabo la complementariedad de bases con el RNAm blanco y por consecuencia no existiría una inhibición en la expresión del gen; mientras que el vector vacío, no contenía secuencias en su sitio múltiple de clonación.

El vector con el que fueron transformadas las bacterias (Figura 6) les confiere resistencia al antibiótico kanamicina, así que sólo aquellas bacterias transformadas tuvieron la capacidad de crecer en el medio LB con antibiótico, como podemos observarlo en las imágenes (Anexo 3).

6.2.1 Transfección

Para realizar la transfección, el primer paso fue estandarizar tanto el número de células que se requerían en un pozo de una placa de 6 pozos, para que a las 24 hrs del ensayo se tuviera una confluencia del 80-90%; así como la estandarización de la concentración del antibiótico de selección, para determinar la concentración letal 50 (CL50) de puromicina.

Primero se realizó la estandarización de células por pozo en una placa de 24 y 96 pozos, esto con el fin de poder realizar posteriormente una extrapolación del número de células que se requerirían en una placa de 6 pozos, en donde se realizaron variaciones en el número de células por pozo y se evaluaron a 3 tiempos distintos, como se muestra en las tablas (Anexo 4a). Con estas estandarizaciones, se

concluyó que el número de células a utilizar por pozo serían de 900,000 células para la placa de 24 pozos y de 35,000 células para la placa 96 pozos.

Posteriormente, se realizó la estandarización de la concentración del antibiótico de selección (puromicina) para las células transfectadas, en una placa de 96 pozos utilizando 35,000 células por pozo y 6 concentraciones distintas. En la Figura 11, se muestra en el eje x las concentraciones de puromicina utilizadas (ug/mL), mientras que en el eje y se encuentra el porcentaje de viabilidad celular. La curva de puromicina nos muestra que conforme se va incrementando la concentración del antibiótico, la viabilidad celular disminuye. Con este resultado se determinó que la concentración de puromicina CL50 fue de 0.5ug/mL.

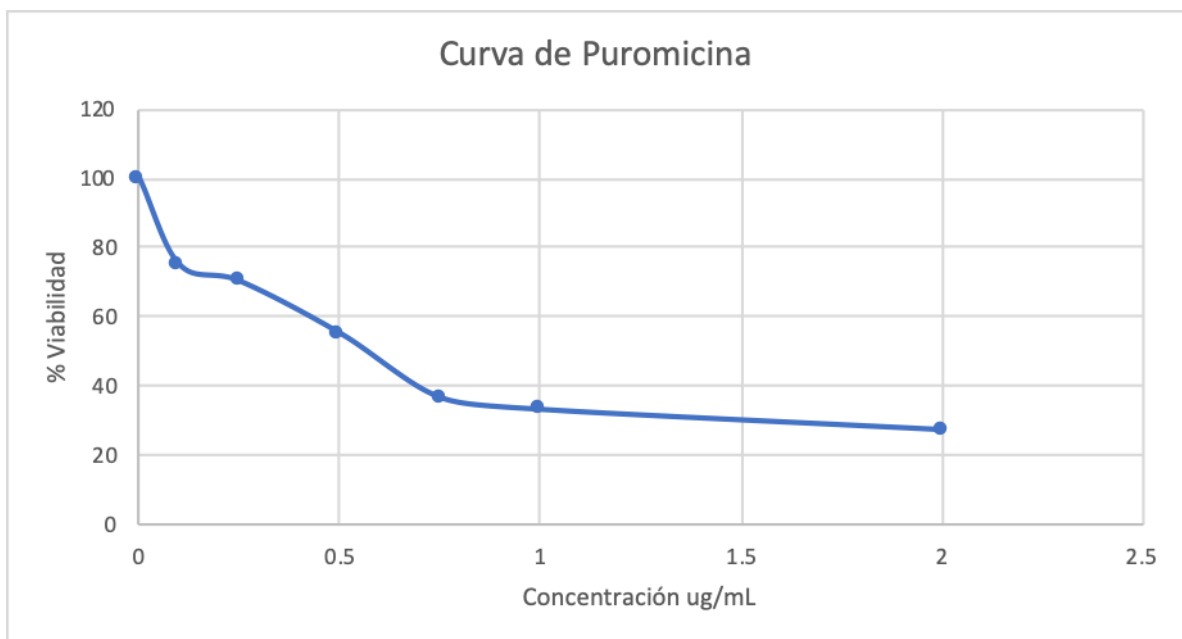


Figura 11. Curva de puromicina en células HEK-293, evaluada mediante MTT. Valor aproximado de la concentración letal 50 (CL50) encontrado a una concentración de 0.5 ug/mL.

Una vez que se llevó a cabo la estandarización del antibiótico, se prosiguió con la transfección.

Para confirmar que se llevara a cabo la transfección, después de 4 días se observaron las células al microscopio confocal (Anexo 4b). En estas imágenes podemos observar células con la etiqueta fluorescente de la proteína GFP indicando que se llevó a cabo la transfección. Estas células se mantuvieron en medio con puromicina, y al cabo de dos semanas se observaron al microscopio (Figura 12). Los resultados revelaron que el 90% de las células eran fluorescentes, esto quiere decir que las células transfectadas proliferaron y se seleccionaron únicamente aquellas que tenían la etiqueta de GFP. El procedimiento anterior se realizó de forma individual para cada uno de los RNA interferentes (Sh1, Sh2, Sh3, Sh4) y controles (scramble, Scr y vector vacío, VV).

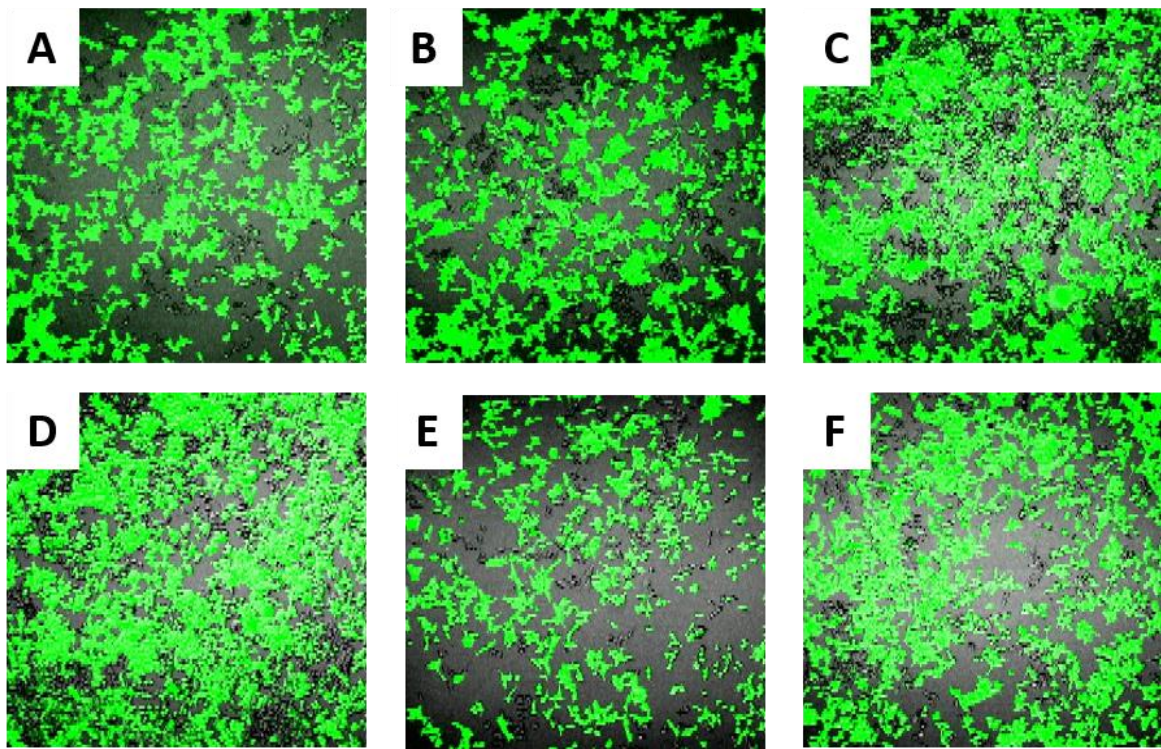


Figura 12. Selección de células transfectadas. Células observadas en microscopio confocal a 20x, seleccionadas con puromicina a una concentración de 0.5 ug/mL. A) En la imagen observamos a las células con el interferente Sh1. B) Células con el interferente Sh2. C) Células con el interferente Sh3. D) Células con el interferente Sh4. E) Células con el Scr. F) Células con el vector vacío.

6.3.- Expresión de *HMMR* y su interferencia

Una vez confirmada la transfección de las células, se prosiguió con la evaluación de la expresión de *HMMR*, mediante RT-qPCR (a nivel de RNA) y western blot (a nivel de proteína).

Para evaluar la expresión de *HMMR* a nivel de RNA mensajero, se utilizó el RNA de las células transfectadas por cada uno de los 6 vectores de forma independiente (Sh1, Sh2, Sh3 y Sh4,, VV y Scr). Se cuantificó la expresión de *HMMR* mediante RT-qPCR, utilizando el método 2-delta delta Ct, y se hicieron tres ensayos de forma independientes.

Primero, se comparó al Scr y al VV para definir que no existiera una diferencia significativa entre estos, y una vez comprobado, se consideró al Scr el control utilizado para comparar todas las condiciones experimentales. En la Figura 13 tenemos en el eje x las 6 condiciones, mientras que en el eje y tenemos la expresión relativa. Se observa que entre el VV y el Scr no presentaron diferencias de expresión de *HMMR*, en cambio, las células que expresaban los 4 RNA's interferentes si presentaron una menor expresión de *HMMR*. Sin embargo, el interferente número 4 fue el único que tuvo una diferencia significativa de expresión, siendo esta de un valor de $p=0.0074$ con un nivel de confianza del 95%.

A pesar de que gráficamente es posible observar que, en comparación con el Scr el Sh3 también presenta diferencia en cuanto a la expresión, estadísticamente no resultó significativa esta diferencia, lo cual puede deberse a la desviación que existe entre los valores obtenidos por el triplicado de esta muestra.

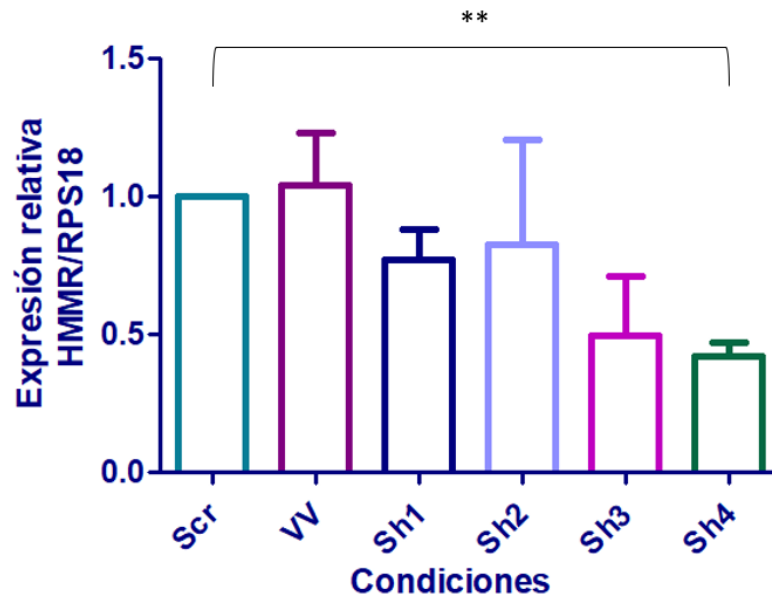


Figura 13. Expresión de RNA en células con *HMMRi*. En la Gráfica podemos observar la expresión relativa de *HMMR* de los 4 interferentes (Sh1, Sh2, Sh3 y Sh4), en los cuatros casos, se observa una menor expresión comparada contra el control (Scr), siendo el Sh4 el único interferente con diferencia significativa ($p=0.0074$).

A nivel de proteína, se evaluó la expresión de *HMMR* teniendo como control de carga a β -actina, y se llevó a cabo un análisis densitométrico el cual nos permitió obtener un valor cuantitativo de esta expresión.

En la Figura 14 podemos observar para las 6 condiciones y para HEK-293, la expresión de un control de carga (β -actina) y de *HMMR*. La expresión de β -actina en todas las condiciones experimentales fue homogénea, mientras que para *HMMR* la expresión fue variable. En esta última observamos que tanto HEK-293 como el Scr presentaron la mayor expresión de *HMMR*, mientras que la menor expresión fue observada con el Sh4.

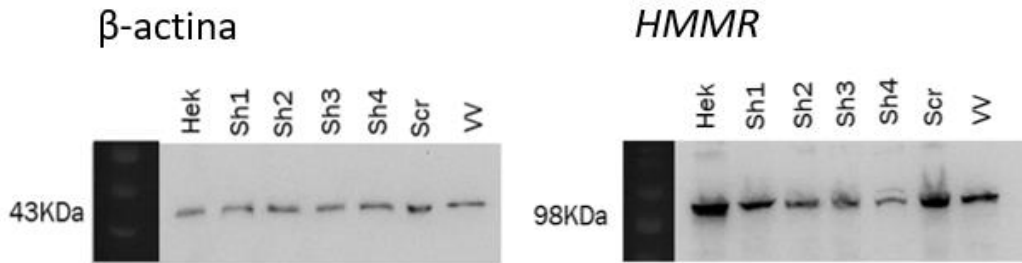


Figura 14. Análisis por Western Blot de la expresión de *HMMR*. En esta imagen observamos la expresión del control de carga β -actina con un peso aproximado de 43KDa y de *HMMR* con un peso aproximado de 98KDa, en la línea celular HEK-293, 4 interferentes (Sh1, Sh2, Sh3 y Sh4), y en controles (Scr y VV).

Para la evaluación cuantitativa de la expresión de proteína de *HMMR* se hizo el análisis densitométrico de las bandas obtenidas para las diferentes variables experimentales (Sh1, Sh2, Sh3, Sh4, VV, Scr y HEK-293 sin tratamiento). En la Figura 15 tenemos en el eje x las diversas condiciones en las que se evaluó la expresión de proteína, y en el eje y la expresión relativa. Estadísticamente, no se observó una diferencia significativa entre los 4 interferentes con respecto al Scr y VV. Mientras que se observó una tendencia en la disminución de la expresión para los interferentes con respecto a las células sin tratamiento (HEK-293), aunque no fue estadísticamente significativo. Es posible que no se haya obtenido esta diferencia estadística debido a la desviación en los valores del triplicado para esta muestra.

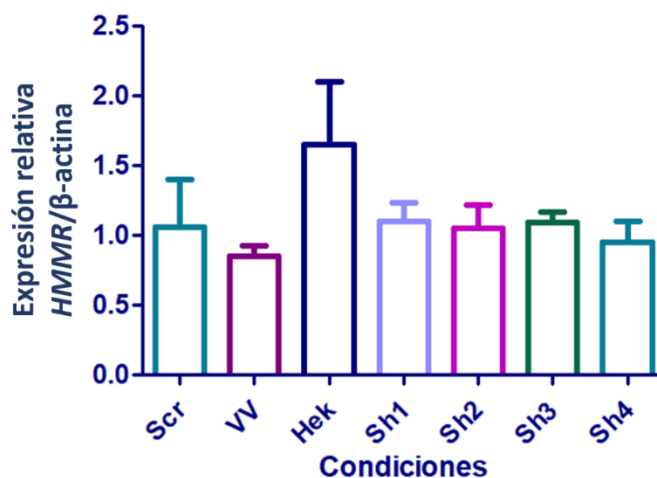


Figura 15. Expresión proteica en células con *HMMR*i. En la Gráfica podemos observar que HEK-293 presenta una expresión de proteína elevada en comparación con el Scr, mientras que los interferentes tienen una expresión similar a éste. Estadísticamente no existe diferencia significativa de la expresión entre las variables. El ensayo fue realizado por triplicado.

6.4.- Evaluación funcional de las células con menor cantidad de *HMMR*

Para determinar el impacto de la inhibición de *HMMR* en la viabilidad celular, se llevó a cabo el ensayo de MTT.

Se evaluó la viabilidad celular de los 4 interferentes y de los dos controles, con 8 repeticiones cada uno y los resultados se compararon estadísticamente contra el Scr. De igual forma que los ensayos anteriores, se compararon el Scr y el VV para determinar si existía una diferencia significativa entre ambos, al no observarse diferencias, se eligió al Scr como el control para evaluar el resto de las otras condiciones experimentales. En la Figura 16 tenemos en el eje x las 6 condiciones a las cuales se evaluó la viabilidad celular, y en el eje y tenemos el porcentaje de viabilidad celular. Podemos observar que los 4 interferentes tuvieron un porcentaje de viabilidad menor que el control, con diferencia estadísticamente significativa; siendo los interferentes 2 y 3, aquellos con mayor diferencia ($p > 0.0005$) y por lo tanto menor viabilidad celular.

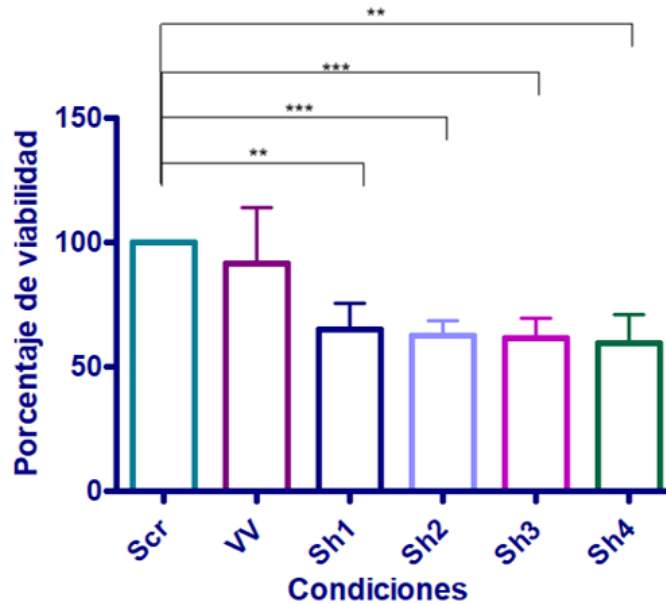


Figura 16. Viabilidad celular mediada por *HMMRi*. Análisis estadístico del porcentaje de viabilidad celular de las 6 condiciones posteriores al silenciamiento, evaluado mediante MTT a las 24hrs. Se observa que los 4 interferentes (Sh1, Sh2, Sh3 y Sh4) presentan un porcentaje de viabilidad significativamente menor que el control (Scr), para el cual los valores fueron los siguientes: Scr vs Sh1 $p=0.0012$, Scr vs Sh2 $p=0.0005$, Scr vs Sh3 $p=0.0005$, Scr vs Sh4 $p=0.0012$.

Para determinar el impacto de la inhibición *HMMR* en la migración celular, se llevó a cabo el ensayo de la herida, ensayo para el cual se obtuvieron mediciones de cierre de herida a las 24 hrs y a las 48 hrs, por cada herida se promediaron 3 mediciones de distintos lugares de la herida y cada condición se realizó por triplicado.

En la Figura 17 se muestra la representación del cierre de herida a lo largo de 48 hrs de cada condición, en donde es posible observar que a las 48 hrs el interferente número 4 presentó un cierre de herida de menor tamaño, lo cual nos indicó una menor migración celular. Sin embargo, no fue posible evaluar el cierre total de la herida debido a que a las 72 hrs la confluencia fue mayor al 90%, ocasionando que las células se despegaran y se perdiera el seguimiento de cierre de la herida.

En la Figura 18 tenemos en el eje x las condiciones para las cuales se evaluó la migración celular, y en el eje y tenemos la medición del cierre de la herida en cm.

Los resultados muestran que, a las 24 hrs de evaluación, existió una diferencia de los cuatro interferentes comparado con el Scr. Sin embargo, únicamente el interferente 1 y 2 presentaron una diferencia estadísticamente significativa, atribuido probablemente a la desviación que existió en los triplicados de cada una de las mediciones de cada herida. A las 48 hrs el interferente 4 fue el único que presenta una diferencia estadísticamente significativa respecto al Scr. Se esperaba que al alterar la expresión de *HMMR* las funciones de la célula tales como migración celular, se vieran afectadas; los resultados obtenidos coincidieron con lo esperado, al observar que la velocidad de migración de las células con los interferentes fue más lenta que para el grupo control.

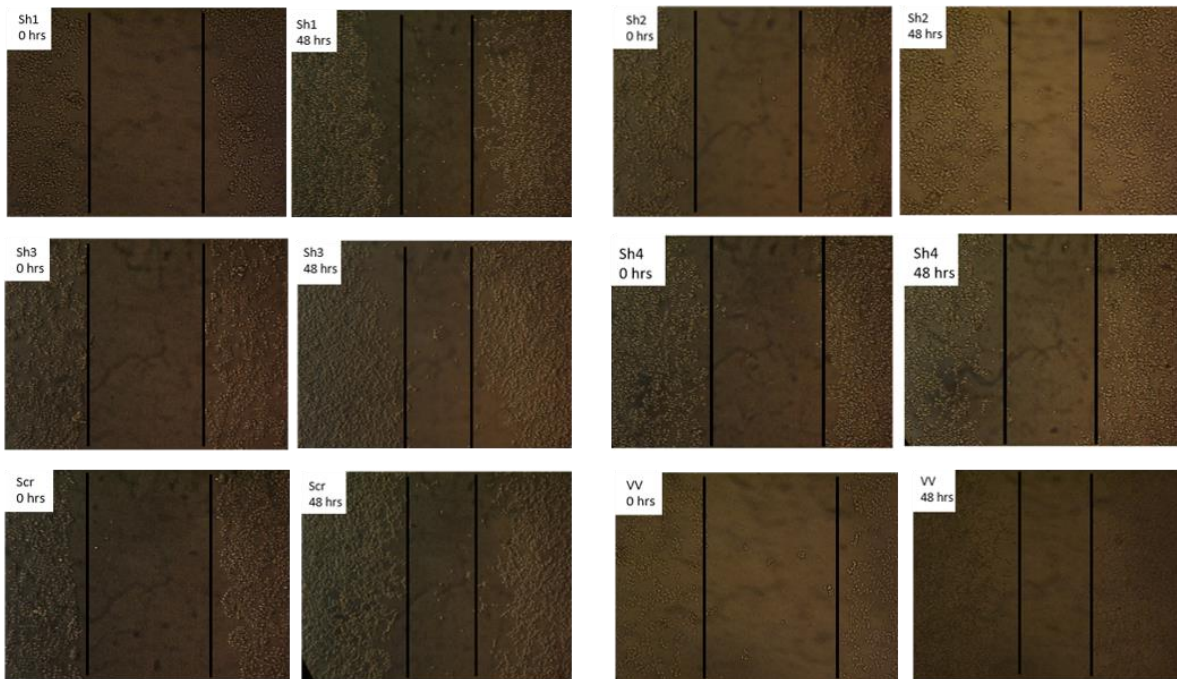


Figura 17. Ensayo de herida. Cierre de herida mediante migración celular de las 6 condiciones evaluadas (Sh1, Sh2, Sh3, Sh4, Scr, VV).

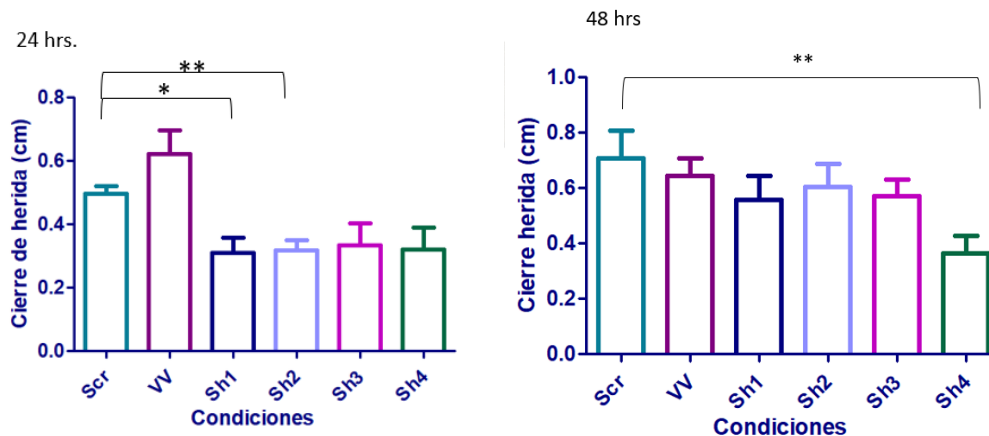


Figura 18. Migración celular mediada por *HMMRi*. Análisis estadístico de la migración celular de las 6 condiciones posteriores al silenciamiento, evaluado mediante el ensayo de la herida a las 24 hrs y 72 hrs. A las 24 hrs se observa que los interferentes 1 y 2 presentan un cierre de herida significativamente menor que el control (Scr vs Sh1 $p=0.0185$, Scr vs Sh2 $p=0.0029$). A las 48 hrs únicamente el interferente 4 presenta diferencia significativa de cierre de herida con un valor de $p=0.0100$ y un nivel de confianza del 95%.

7.- Discusión

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo (“GICR - The Global Initiative for Cancer Registry Development,”) y en esta enfermedad se han detectado diversos eventos genómicos como mutaciones, deleciones, modificaciones postraduccionales, entre otras (Chakravarthi, Nepal, & Varambally, 2016) las cuales se ven involucradas en el desarrollo de esta enfermedad.

En todas estas alteraciones moleculares, encontramos múltiples genes involucrados, y uno de ellos es *HMMR*. *HMMR* se ha visto asociado en procesos como: proliferación, migración e invasión celular, en distintos tipos de cáncer incluido colon, mama, páncreas, ovario, entre otros (Turley et al., 2002a) (Mele et al., 2017b) (Buttermore et al., 2017) . Sin embargo, en la mayoría de las neoplasias se desconoce los mecanismos moleculares, por los cuales, *HMMR* es regulado y está regulando a otros genes.

A nivel de RNA, se ha determinado la expresión de *HMMR* en distintas líneas celulares de cáncer, como se muestra en la base de datos de Protein Atlas. Sin embargo, en la literatura no se encontraba reportada la expresión de todas las líneas celulares con las que contábamos en el grupo de laboratorio; por lo que evaluar estas líneas mediante qPCR, nos permitió evidenciar que dentro del banco de líneas celulares con el que contábamos en el laboratorio, HEK-293 era la línea celular con mayor expresión.

La línea celular HEK-293 ha sido utilizada previamente como modelo para la investigación de propiedades oncogénicas y de transformación celular asociada a genes relacionados con cáncer, así como modelo para transfección al permitir un ensayo estable (Ha et al., 2010) (Hamid, Malik, & Kakar, 2005) (Castiglioni et al., 2006). Asimismo, es uno de los modelos más usados para evidenciar la represión o expresión génica de un gen de estudio y lograr elucidar los genes regulados por el gen de interés. Como ejemplo, se encuentra un estudio en donde se analizaron los perfiles de expresión génica en células HEK-293 que expresaban *ERβ*, con el fin de elucidar la función reguladora de genes de *ERβ*, lo que permitió identificar una variedad de genes con expresión alterada (Zhao, Putnik, Gustafsson, & Dahlman-Wright, 2009).

Una estrategia que permite llevar a cabo la represión génica es cuando se tiene la complementariedad total de las bases de la cadena guía con el RNA mensajero, sin embargo, no es la única manera en la que puede ocurrir, ya que también puede existir el emparejamiento parcial de los nucleótidos, como ocurre con la región semilla (Bofill-De Ros & Gu, 2016).

En este proyecto se realizó la represión génica de *HMMR* mediante abatimiento por *short hairpin*, nuestros resultados mostraron que la expresión de RNA posterior al silenciamiento presenta variación entre los 4 interferentes, asumiendo que la variación de expresión se debe a que cada interferente tiene distinta secuencia genómica, se explicaría debido a que la complementariedad de sus bases con el RNAm de *HMMR*, no se llevará a cabo de la misma manera, existiendo la posibilidad de que la región semilla conste de un mayor número de nucleótidos para uno de los

interferentes en comparación con los otros, dando como resultado una mayor represión transcripcional; siendo este el caso del Sh4.

Al tener una menor expresión de RNA con los interferentes, podría esperarse una menor expresión de proteína, sin embargo, estadísticamente la expresión de proteína no fue menor en comparación con el Scr. En primera instancia si observamos el western blot de *HMMR* de la Figura 14, observamos una disminución en la intensidad de las bandas correspondientes a los 4 interferentes (Sh1, Sh2, Sh3, Sh4), con respecto a el control (Scr). La intensidad observada en dichas bandas corresponde a la expresión del gen *HMMR*, en donde una banda con menor intensidad representa represión génica. Aun cuando la disminución en la expresión de proteína no fue estadísticamente significativa, esto puede sugerir que la discrepancia entre los resultados observados en las bandas de WB y los resultados estadísticos, se debe a una variación en cuanto a la expresión detectada en los triplicados del western blot mediante el análisis densitométrico. Aunado a ello, a pesar de no contar con una disminución estadísticamente significativa de la expresión proteica de *HMMR* por su inhibición, los datos de los ensayos celulares nos indican que la inhibición por *HMMR* esta alterando la viabilidad y migración celular, que a continuación se discuten.

Estudios han reportado que la señalización de ERK puede promover la viabilidad celular mediante diversos mecanismo, entre los cuales se encuentra: la inhibición de señalización de apoptosis (Tran, Holmström, Ahonen, Kähäri, & Eriksson, 2001) y la regulación de proteínas que promueven la supervivencia celular (Balmanno & Cook, 2009). En este estudio, al evaluar la viabilidad de la línea celular HEK-29 con *HMMR* silenciado con RNAs interferentes (Figura 15), la viabilidad celular fue mayor con el Scr que con los interferentes, lo cual correlaciona con nuestros resultados de expresión de *HMMR* a nivel de RNA,. Esto pudiera sugerir que al inhibir *HMMR*, la regulación de ERK pudiera estar alterada, afectando su potencial oncogénico de supervivencia celular, lo cual, tendrá como resultado la disminución de la viabilidad celular sugiriendo de esta manera una menor proliferación celular, sin embargo, para confirmar esto sería necesario realizar otros experimentos adicionales.

Como se mencionaba previamente, cuando se tiene una sobreexpresión de *HMMR*, ésta se ha asociado con metástasis, debido que se ha sugerido que *HMMR* está implicado en la migración celular, al llevar a cabo una unión entre los filamentos de actina y los microtúbulos del citoesqueleto (Turley, Noble, & Bourguignon, 2002b). Así que, si existe una sobreexpresión de *HMMR*, entonces existirá una mayor migración celular, mientras que ante una baja expresión de *HMMR* la migración celular será menor. Este último evento, coincide con los resultados obtenidos para el ensayo de la herida, observados en la Figura 16, donde para los 4 interferentes tanto a las 24 hrs como a las 48 hrs, el cierre de la herida fue menor que los controles, lo cual nos indica que la migración celular fue menor cuando se inhibe *HMMR*, ya que probablemente se ve afectada la asociación entre la actina y los microtúbulos del citoesqueleto que promueven la migración celular. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, en donde se ha observado que la inhibición de *HMMR* tendrá un impacto negativo en la migración celular (GOUEFFIC et al., 2006).

8.- Conclusiones

Se estableció un modelo de inhibición estable de *HMMR* en células transformadas, a partir del cual, se evaluó funcionalmente el abatimiento de la expresión de éste. Determinando que la expresión de RNA, viabilidad y migración celular se ven alterados por el silenciamiento principalmente del interferente número 4 de *HMMR*. Dicho modelo puede contribuir para evaluar aquellos genes que se encuentran alterados y a su vez llevar a cabo la asociación de las vías de regulación génica.

9.- Perspectivas

- Conocer el perfil de expresión de los genes asociados a *HMMR*.
- Determinar que genes regulan a *HMMR* y cuales están regulados por el mismo.
- Describir las vías de señalización asociadas a los procesos en los cuales se ve implicado *HMMR*.
- Abatir las variantes de *HMMR*.

10.- Bibliografía

- Abetamann, V., Kern, H. F., & Elsässer, H. P. (1996). Differential expression of the hyaluronan receptors CD44 and RHAMM in human pancreatic cancer cells. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2(9), 1607–1618. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9816340>
- Ahmadzadeh, T., Reid, G., & McKenzie, D. R. (2018, February 1). Fundamentals of siRNA and miRNA therapeutics and a review of targeted nanoparticle delivery systems in breast cancer. *Biophysical Reviews*. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0392-1>
- Balmanno, K., & Cook, S. J. (2009). Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death & Differentiation*, 16(3), 368–377. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.148>
- Bofill-De Ros, X., & Gu, S. (2016, July 1). Guidelines for the optimal design of miRNA-based shRNAs. *Methods*. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.04.003>
- Buttermore, S. T., Hoffman, M. S., Kumar, A., Champeaux, A., Nicosia, S. V., & Kruk, P. A. (2017). Increased RHAMM expression relates to ovarian cancer progression. *Journal of Ovarian Research*, 10(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s13048-017-0360-1>
- Castiglioni, F., Tagliabue, E., Campiglio, M., Pupa, S. M., Balsari, A., & Ménard, S. (2006). Role of exon-16-deleted HER2 in breast carcinomas. *Endocrine-Related Cancer*, 13(1), 221–232. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01047>
- Chakravarthi, B. V. S. K., Nepal, S., & Varambally, S. (2016, July 1). Genomic and Epigenomic Alterations in Cancer. *American Journal of Pathology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.02.023>
- Chen, H., Mohan, P., Jiang, J., Nemirovsky, O., He, D., Fleisch, M. C., ... Maxwell, C. A. (2014). Spatial regulation of Aurora A activity during mitotic spindle assembly requires RHAMM to correctly localize TPX2. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 13(14), 2248–2261. <https://doi.org/10.4161/cc.29270>
- Cheng, X.-B., Sato, N., Kohi, S., Koga, A., & Hirata, K. (2015). Receptor for Hyaluronic Acid-Mediated Motility is Associated with Poor Survival in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Journal of Cancer*, 6(11), 1093–1098. <https://doi.org/10.7150/jca.12990>
- GICR - The Global Initiative for Cancer Registry Development. (n.d.). Retrieved January 23, 2020, from <https://gicr.iarc.fr/>
- GOUEFFIC, Y., GUILLUY, C., GUERIN, P., PATRA, P., PACAUD, P., & LOIRAND, G. (2006). Hyaluronan induces vascular smooth muscle cell migration through RHAMM-mediated PI3K-dependent Rac activation.

- Cardiovascular Research*, 72(2), 339–348.
<https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.07.017>
- Ha, S.-A., Kim, H. K., Yoo, J., Kim, S., Shin, S. M., Lee, Y. S., ... Kim, J. W. (2010). Transdifferentiation-inducing HCCR-1 oncogene. *BMC Cell Biology*, 11(1), 49. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-11-49>
- Hamid, T., Malik, M. T., & Kakar, S. S. (2005). (No Title). *Molecular Cancer*, 4(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-4-3>
- Heigwer, F., Port, F., & Boutros, M. (2018). Rna interference (RNAi) screening in Drosophila. *Genetics*, 208(3), 853–874. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300077>
- Ishigami, S., Ueno, S., Nishizono, Y., Matsumoto, M., Kurahara, H., Arigami, T., ... Natsugoe, S. (2011). Prognostic impact of CD168 expression in gastric cancer. *BMC Cancer*, 11, 106. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-106>
- Maxwell, C. A., Benítez, J., Gómez-Baldó, L., Osorio, A., Bonifaci, N., Fernández-Ramires, R., ... Pujana, M. A. (2011). Interplay between BRCA1 and RHAMM Regulates Epithelial Apicobasal Polarization and May Influence Risk of Breast Cancer. *PLoS Biology*, 9(11), e1001199. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001199>
- Maxwell, C. A., Keats, J. J., Crainie, M., Sun, X., Yen, T., Shibuya, E., ... Pilarski, L. M. (2003). RHAMM is a centrosomal protein that interacts with dynein and maintains spindle pole stability. *Molecular Biology of the Cell*, 14(6), 2262–2276. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-07-0377>
- Mele, V., Sokol, L., Kölzer, V. H., Pfaff, D., Muraro, M. G., Keller, I., ... Lugli, A. (2017a). The hyaluronan-mediated motility receptor RHAMM promotes growth, invasiveness and dissemination of colorectal cancer. *Oncotarget*, 8(41), 70617–70629. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19904>
- Mele, V., Sokol, L., Kölzer, V. H., Pfaff, D., Muraro, M. G., Keller, I., ... Lugli, A. (2017b). The hyaluronan-mediated motility receptor RHAMM promotes growth, invasiveness and dissemination of colorectal cancer. *Oncotarget*, 8(41), 70617–70629. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19904>
- Moore, C. B., Guthrie, E. H., Huang, M. T.-H., & Taxman, D. J. (2010). Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 629, 141–158. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-657-3_10
- Naqvi, A. R., Islam, M. N., Choudhury, N. R., & Haq., Q. M. R. (2009, January 15). The fascinating world of RNA interference. *International Journal of Biological Sciences*. Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/ijbs.5.97>
- Radisky, D. C., Stallings-Mann, M., Hirai, Y., & Bissell, M. J. (2009). Single proteins might have dual but related functions in intracellular and extracellular microenvironments. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(3), 228–234.

<https://doi.org/10.1038/nrm2633>

- Rao, D. D., Vorhies, J. S., Senzer, N., & Nemunaitis, J. (2009). siRNA vs. shRNA: Similarities and differences. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(9), 746–759. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2009.04.004>
- Sironen, R. K., Tammi, M., Tammi, R., Auvinen, P. K., Anttila, M., & Kosma, V.-M. (2011). Hyaluronan in human malignancies. *Experimental Cell Research*, 317(4), 383–391. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.11.017>
- Tammi, R. H., Kultti, A., Kosma, V.-M., Pirinen, R., Auvinen, P., & Tammi, M. I. (2008). Hyaluronan in human tumors: Pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan. *Seminars in Cancer Biology*, 18(4), 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.03.005>
- Tolg, C., Hamilton, S. R., Morningstar, L., Zhang, J., Zhang, S., Esguerra, K. V., ... Turley, E. A. (2010). RHAMM promotes interphase microtubule instability and mitotic spindle integrity through MEK1/ERK1/2 activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(34), 26461–26474. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.121491>
- Tran, S. E. F., Holmström, T. H., Ahonen, M., Kähäri, V.-M., & Eriksson, J. E. (2001). MAPK/ERK Overrides the Apoptotic Signaling from Fas, TNF, and TRAIL Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 16484–16490. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010384200>
- Turley, E. A., Noble, P. W., & Bourguignon, L. Y. W. (2002a). Signaling Properties of Hyaluronan Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 4589–4592. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100038200>
- Turley, E. A., Noble, P. W., & Bourguignon, L. Y. W. (2002b, February 15). Signaling properties of hyaluronan receptors. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100038200>
- Zhao, C., Putnik, M., Gustafsson, J. Å., & Dahlman-Wright, K. (2009). Microarray analysis of altered gene expression in ER β -overexpressing HEK293 cells. *Endocrine*, 36(2), 224–232. <https://doi.org/10.1007/s12020-009-9233-8>

Anexos

1.- Soluciones

- a) Solución1. Acetato de Potasio $C_2H_3KO_2$ (30mM), Cloruro de Rubidio RbCl (100mM), Cloruro de Calcio $CaCl_2$ (10mM), Cloruro de Magnesio $MgCl_2$ (50mM), Glicerol $C_3H_8O_3$ (15%).
- b) Solución2. MOPS $C_7H_{15}NO_4S$ (10mM), Cloruro de Calcio $CaCl_2$ (75mM), Cloruro de Rubidio RbCl (10mM), Glicerol $C_3H_8O_3$ (15%).
- c) Buffer de lisis (1mM): Coctel de inhibidores (1.25x), Ripa (cbp) y PMSF (50mM).

2.- Western Blot

-Gel Separador

Componentes	10% gel (20mL)	Concentración
Agua	7.9	cbp
Acrylamida mix	6.7	30%
Tris-Cl (pH 8.8)	5.0	1.5M
SDS	0.2	10%
Persulfato de amonio	0.2	10%
TEMED	0.008	-

-Gel Concentrador

Componentes	gel (6mL)	Concentración
Agua	4.1	cbp
Acrylamida mix	1.0	30%
Tris-Cl (pH 6.8)	0.75	1.0 M
SDS	0.06	10%
Persulfato de amonio*	0.06	10%
TEMED*	0.006	-

-Buffer de electroforesis:

*pH 8.3 (1L)

	10X	Concentración
Tris-base	30.28 g	25mM
Glicina	144.10 g	192mM
SDS	10 g	0.01%

b) -Buffer de transferencia semi-húmeda:

*Buffer Bjerrum Schafer-Nielsen pH 9.2 (1L)

	1x	Concentración
Tris-base	5.8 g	48mM
Glicina	2.9 g	39mM
Metanol	150 mL	15%
SDS	0.0375g	10%

3.- Transformación bacteriana:

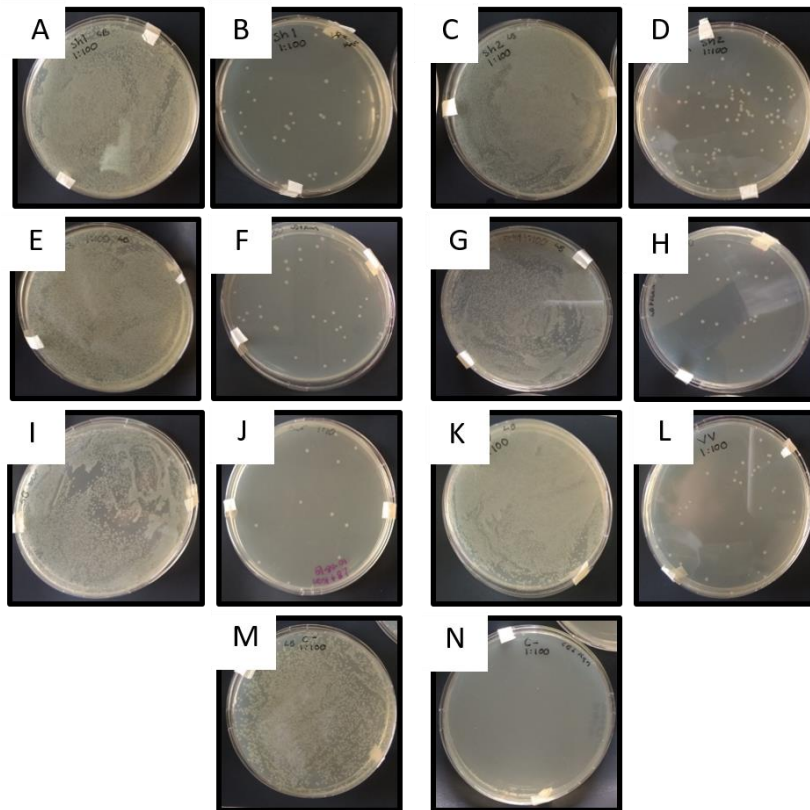


Figura 14. Transformación bacteriana. A) Sh1 Agar LB, B) Sh1 Agar LB+ Kan, C) Sh2 Agar LB, D) Sh2 Agar LB+ Kan, E) Sh3 Agar LB, F) Sh3 Agar LB+ Kan, G) Sh4 Agar LB, H) Sh4 Agar LB+ Kan, I) Scr Agar LB, J) Scr Agar LB+ Kan, K) VV Agar LB, L) VV Agar LB+ Kan, M) Control de viabilidad Agar LB, N) Control de esterilidad Agar LB

4.-Transfección:

A) Estandarización de número de células por pozo en placa de 24 pozos, con evaluación de confluencia a los tiempos: 24hrs, 48hrs y 72hrs.

# Células	24 hrs	48 hrs	72 hrs
120,000	40%	50%	100%
140,000	50%	80%	100%
150,000	50%	90%	100%
160,000	60%	95%	100%
180,000	70%	98%	100%
200,000	80%	100%	100%

B) Estandarización de número de células por pozo en placa de 24 pozos, con evaluación de confluencia a los tiempos: 24hrs, 48hrs y 72hrs.

# Células	24 hrs	48 hrs	72 hrs
5,000	40%	50%	100%
10,000	50%	60%	100%
15,000	60%	80%	100%
20,000	70%	95%	100%
25,000	80%	98%	100%
30,000	90%	99%	100%
35,000	95%	100%	100%
40,000	98%	100%	100%

Células transfectadas

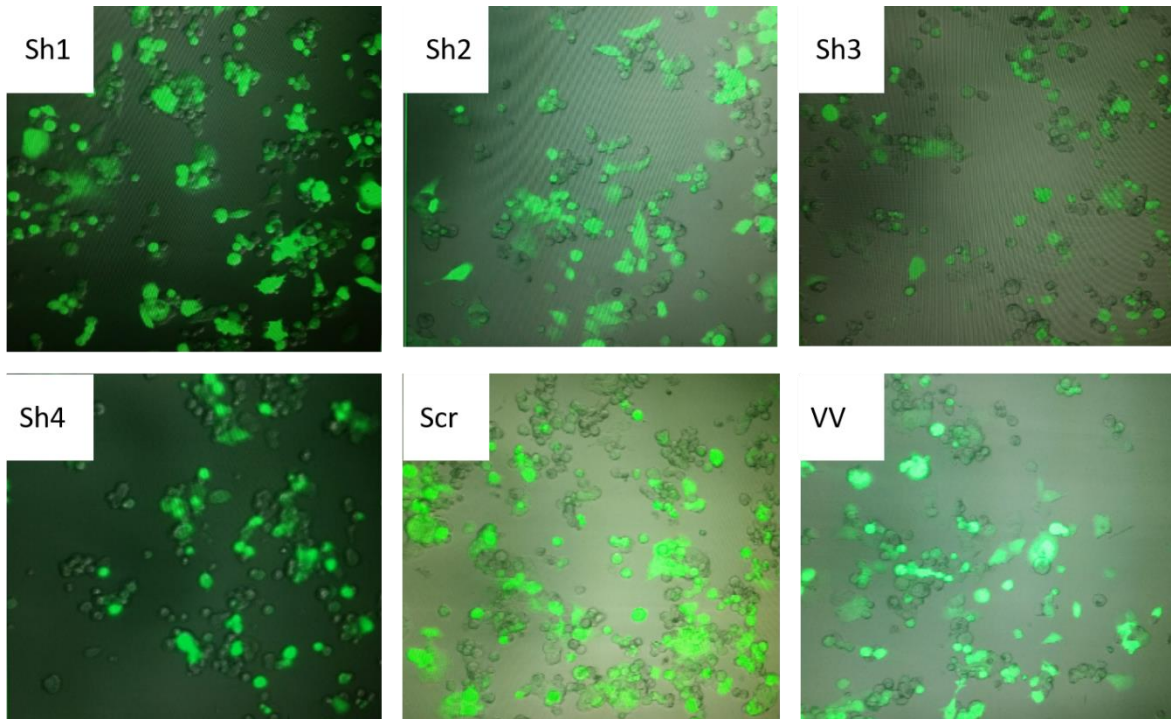


Figura 15. Transfección celular. En la imagen podemos observar la presencia de la etiqueta GFP en las células transfectadas en un trascurso de 4 días.