

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE UN GEN SUPRESOR DE TUMOR EN CÉLULAS TUMORALES Y NO TUMORALES



ALUMNADO

Lola Carrasco Jurado (1º Bachillerato, IES Fidiana, Córdoba)
José Antonio Muñoz Muñoz (1º Bachillerato, IES Fidiana, Córdoba)
Laura Ortiz Martínez (1º Bachillerato, IES Fidiana, Córdoba)
Alma Romero Lozano (1º Bachillerato, IES Fidiana, Córdoba)

INVESTIGADORAS

Ariadna Muñoz Fernández
Carmen Mª Ayala Roldán

PROFESORA COORDINADORA

María del Mar Moreda Moreno

CENTROS

IES Fidiana de Córdoba
Departamento de Genética (Universidad de Córdoba)
Laboratorio GC22-Epigenética (IMIBIC)



ÍNDICE

ABSTRACT	 Error! Marcador no definido.
1. INTRODUCCIÓN	 Error! Marcador no definido.
2. OBJETIVOS	
3. HIPÓTESIS	 Error! Marcador no definido.
4. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	 Error! Marcador no definido.
4.1. COMPOSICIÓN DEL ADN	4
4.2. CONCEPTO DE GEN, DE GEN SUPRESOR DE TUMOR Y DE PROTO-ONCOGEN	6
4.3. CÁNCER	 Error! Marcador no definido.
5. MATERIALES Y MÉTODOS	 Error! Marcador no definido.
5.1. PLANIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	9
5.2. MATERIALES EMPLEADOS	10
5.3. MÉTODOS	11
6. RESULTADOS	 Error! Marcador no definido.
7. CONCLUSIONES	 Error! Marcador no definido.
8. AGRADECIMIENTOS	 Error! Marcador no definido.
9. BIBLIOGRAFÍA	 Error! Marcador no definido.

Cancer is a disease caused, among other things, by the uncontrolled multiplication of cells in a given area of the body.

In healthy cells, tumor suppressor genes are important in the regulation of cellular functions, so that the alteration of their expression leads to a functional imbalance in them. This could lead to the development of tumor cells, characterized by a high rate of division and poor regulation of apoptosis.

In healthy cells, tumor suppressor genes play a fundamental role in the regulation of essential functions such as cell division, differentiation and death. However, their expression can be altered by different factors, leading to a functional imbalance in the cell. This fact can lead to the development of tumor cells, characterized by a high rate of division and poor regulation of apoptosis.

Tumor cells normally present little expression of tumor suppressor genes and greater expression in oncogenes, which can lead to tumor progression.

The aim of this project is to study the expression of a tumor suppressor gene in a tumor cell line and in a non-tumor cell line.

The results obtained corroborate the initial hypothesis, since the tumor suppressor gene is expressed only in the non-tumor cell line.

KEYWORDS: *tumor suppressor gen, proto-oncogenes, tumor, cell growth, DNA*

El **cáncer** es una enfermedad producida, entre otros motivos, por la **multiplicación descontrolada de células** en una zona determinada del cuerpo.

En **células sanas**, los **genes supresores de tumor** son importantes en la regulación de funciones celulares por lo que la **alteración** de su expresión da lugar a un desajuste funcional en ellas. Esto podría dar lugar al desarrollo de **células tumorales**, caracterizadas por una alta tasa de división y una regulación deficiente de la apoptosis.

En las células sanas, los genes supresores de tumores desempeñan un papel fundamental en la regulación de funciones esenciales como la división, diferenciación y muerte celular. Sin embargo, su expresión puede verse alterada por distintos factores, dando lugar a un desajuste funcional en la célula. Este hecho puede dar lugar al desarrollo de células tumorales, caracterizadas por una alta tasa de división y una regulación deficiente de la apoptosis.

Las células tumorales normalmente presentan poca expresión de los genes supresores de tumores y mayor expresión en los oncogenes, lo que puede dar lugar a una progresión del tumor.

El objetivo de este proyecto consiste en estudiar la expresión de un gen supresor de tumores en una línea celular tumoral y en una línea celular no tumoral.

Los resultados obtenidos corroboran la hipótesis de partida, ya que el gen supresor de tumores se expresa únicamente en la línea celular no tumoral.

Palabras clave: *gen supresor, proto-oncogen, tumor, crecimiento celular, ADN*

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad producida por la masiva multiplicación descontrolada de células en una zona determinada del cuerpo que puede llegar a dispersarse a otros órganos produciendo así lo conocido como metástasis.

En las células sanas, los genes supresores de tumores desempeñan un papel fundamental en la regulación de funciones esenciales como la división, diferenciación y muerte celular. Sin embargo, su expresión puede verse alterada por distintos factores, dando lugar a un desajuste funcional en la célula. Este hecho puede dar lugar al desarrollo de células tumorales, caracterizadas por una alta tasa de división y una regulación deficiente de la apoptosis.

2. OBJETIVOS

- Obtener ARN a partir pellet celulares.
- Obtener ADN copia a partir del ARN.
- Amplificar mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) un gen control y un gen supresor de tumores.
- Observar los resultados de la PCR en un gel de agarosa.
- Con todo ello, queremos estudiar la expresión de un gen supresor de tumores en células sanas y células tumorales.
- Interpretar, discutir y representar los resultados del proyecto y las conclusiones más relevantes.

El gen supresor de tumores se expresará en las células sanas, pero no se expresará en las células tumorales.

4. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

4.1. COMPOSICIÓN DEL ADN

La genética es la rama de la biología cuyo objetivo se basa en el estudio de los genes y los mecanismos que regulan la transmisión de caracteres de información hereditarios. Estos estudios nos permiten conocer cómo se relacionan las diferentes especies y qué tienen biológicamente en común.

El objeto de estudio de la genética es el ADN (ácido desoxirribonucleico) y el ARN (ácido ribonucleico). El ADN se define como la macromolécula esencial para la vida. La importancia de este compuesto radica en que es crucial para la herencia biológica.

Estas moléculas de ADN están dispuestas en el núcleo celular, en una estructura descondensada conocida como cromatina. Esta cromatina está formada por ADN asociado a histonas. Tan pronto como comienza la división celular, esta cromatina se condensa en cromosomas, preparándose para la distribución equitativa del ADN en las células hijas. Entonces, los cromosomas son estructuras de cromatina condensada de aspecto variable, situadas en el plasma nuclear cuando tienen lugar las fases de división celular.

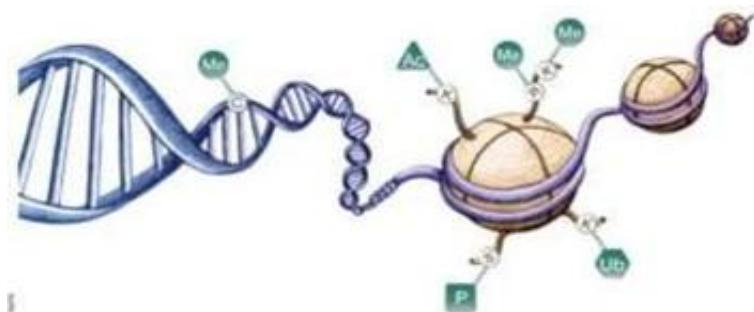


Imagen 1. Estructura de condensación del ADN mediante la acción de histonas: Se muestra ADN envuelto alrededor de histonas.

El ADN se define bioquímicamente como un ácido nucleico. Las uniones entre los nucleótidos que lo componen forman el ácido nucleico. Los nucleótidos son una estructura bioquímica formada por una base nitrogenada, ácido fosfórico y carbohidratos.

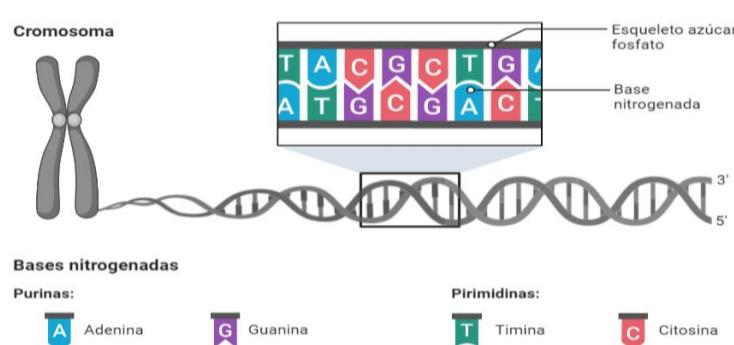


Imagen 2. Composición del ADN

Las bases nitrogenadas pueden ser púricas (adenina, guanina) o pirimidínicas (citosina, timina y uracilo). Esta última base aparece únicamente en las moléculas de ARN. La clasificación explicada anteriormente depende de si la base nitrogenada pertenece a un núcleo de purina o de pirimidina.

Como ya se ha explicado antes, los cromosomas son estructuras de ADN condensado constituidas por uniones de nucleótidos con alto grado de condensación. Además, los nucleótidos forman secuencias llamadas genes. Un gen es un fragmento de ADN que contiene la información genética necesaria capaz de sintetizar una proteína o una cadena

polipeptídica. En conclusión, los cromosomas tendrán mucha información para sintetizar proteínas (Travers y Muskhelishvili, 2015).

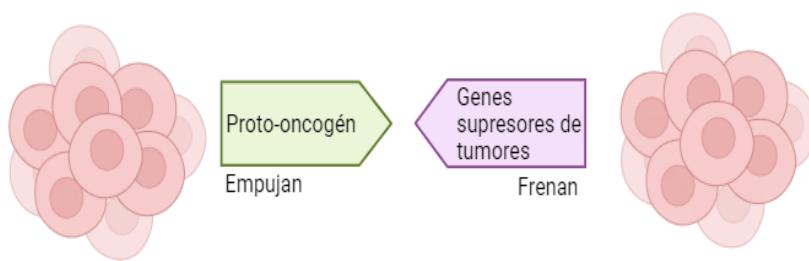
Aunque todas las células comparten la misma información genética, no todas expresan las mismas proteínas. La expresión génica está altamente regulada por diferentes mecanismos moleculares, uno de ellos el denominado epigenética.

4.2. CONCEPTO DE GEN, DE GEN SUPRESOR DE TUMOR Y DE PROTO-ONCOGEN

GEN: Los genes son segmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) que contienen información para una proteína específica cuya función se realiza en uno o más tipos de células del cuerpo.

Gen supresor de tumor: El gen de supresor del tumor codifica una proteína que actúa como un regulador en la división celular, manteniéndola bajo control. Cuando un gen supresor del tumor es alterado por una mutación, la proteína de supresión es ausente o no funcional, lo que conduce a la proliferación celular ilimitada. Estas mutaciones pueden contribuir al desarrollo del cáncer.

Proto-oncogen: juega un papel importante en la regulación de la división celular normal. Al mutar, se convierte en oncogén y tienen potencial de causar cáncer ya que las células se empiezan a dividir descontroladamente.



4.3. CÁNCER

El cáncer se produce por un crecimiento descontrolado de las células de un tejido. Los genes responsables de este crecimiento son los proto-oncogenes y, los encargados de frenarlo son los llamados genes supresores de tumores.

Para que un tejido celular sano no se divida de forma descontrolada dando lugar a un tumor, debe encontrarse en equilibrio la expresión de proto-oncogenes y los genes supresores de tumores. Así, cuando los proto-oncogenes se expresan, aumentando la división celular, los genes supresores de tumores deben ser capaces de frenar este crecimiento, evitando generar un tumor.

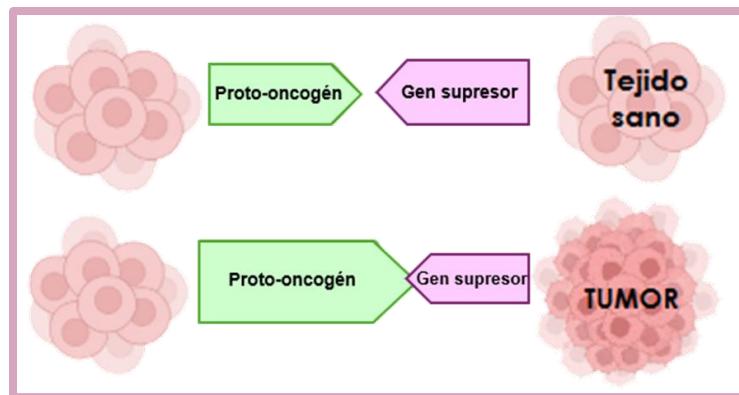


Imagen 4 Actuación de los protooncogenes en la formación del tumor

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. PLANIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

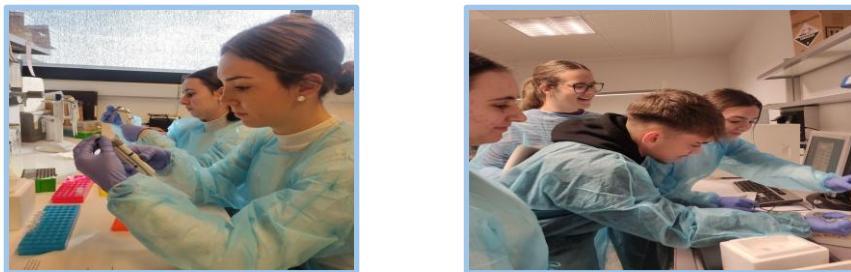
El proyecto de investigación se ha realizado en el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), concretamente en el grupo GC-22 Epigenética. Se ha realizado en cuatro sesiones:

Sesión 1. (4 horas): Presentación y visita a las instalaciones del grupo “GC22 Epigenética”, del IMIBIC. Presentación de las normas de laboratorio, objetivos del proyecto e introducción al concepto de gen supresor de tumores y su importancia en el desarrollo del cáncer.



Imágenes 5 y 6. Presentación del proyecto por las investigadoras

Sesión 2. (4 horas): Aprender los fundamentos del análisis de la expresión génica y las metodologías más utilizadas. Extracción de ácidos nucleicos y estudios de los niveles de expresión génica y amplificación con PCR.



Imagenes 7 y 8. Obtención de ARNm y cuantificación con Nanodrop

Sesión 3. (4 horas): Observación de los resultados mediante electroforesis en geles de agarosa y análisis de resultados.



Imagen 9. Obtención del gel de agarosa

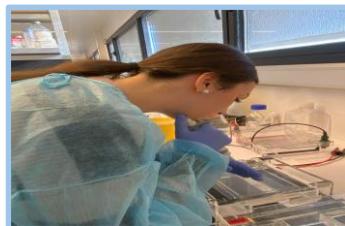


Imagen 10. Colocación de muestras

Sesión 4. (4 horas): Asesoramiento sobre la elaboración de un póster científico (estructura, número de elementos gráficos, colores, letra).

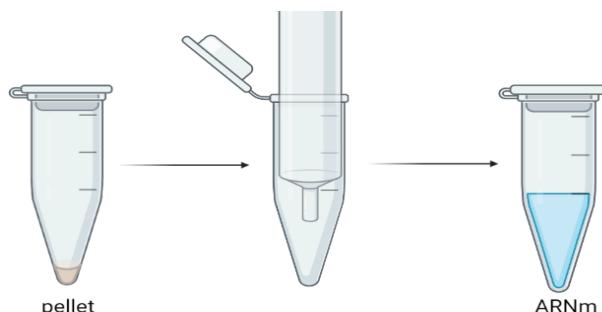


Imagen 13. Discusión de resultados

5.2. MÉTODOS Y MATERIALES

5.2.1. Purificación del ARN

El objetivo es obtener ARN mensajero (ARNm) de las células tumorales y no tumorales a partir de un pellet, mediante la adición de diferentes reactivos a una columna con filtro.



Los materiales empleados han sido::



Micropipetas. Instrumentos utilizados para la recolección de muestras en volúmenes muy pequeños.

Tubo eppendorf. Instrumento de centrifugación y viales de almacenamiento para sustancias químicas y otros tipos de muestras.

Puntas de pipeta. Sirven para transferir volúmenes precisos de líquido de un recipiente a otro.

Gradilla de tubos eppendorf. Soporte de tubos que facilita su transporte y manejo.

Centrífuga. Es un equipo que separa partículas de una solución homogénea mediante un movimiento de rotación y una aceleración centrífuga, provocando la sedimentación de sus componentes.

5.2.2. Medida del ARN en Nanodrop



El objetivo es conocer la concentración del ARNm de cada muestra, además de su calidad. Para ello, nos aseguramos de que la muestras de ARN esté disuelta en un buffer adecuado, y colocamos una gota de tu muestra de ARN en la plataforma.

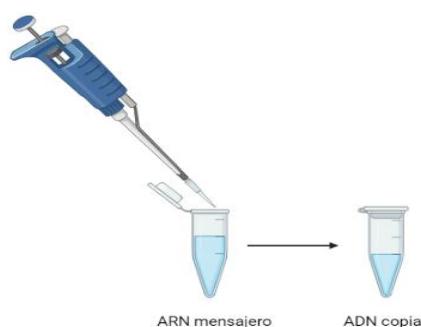
Materiales empleados:

Micropipetas, puntas de pipetas, ambos descritos anteriormente.



Nanodrop. Espectrofotómetro que permite cuantificar ADN, ARN y proteínas con solo 1-2 μL de muestra .

5.2.3. Obtención de ADN copia mediante retrotranscripción.



Este método se utiliza principalmente para convertir el ARN mensajero (ARNm) en ADN complementario. Extraemos el ARNm de las células. Luego, utilizamos una enzima llamada transcriptasa inversa, que sintetiza ADN a partir del ARN. Esta enzima lee el ARNm y crea una cadena de ADN complementaria.

Materiales empleados:

Micropipetas, puntas de pipetas, ambos descritos anteriormente.

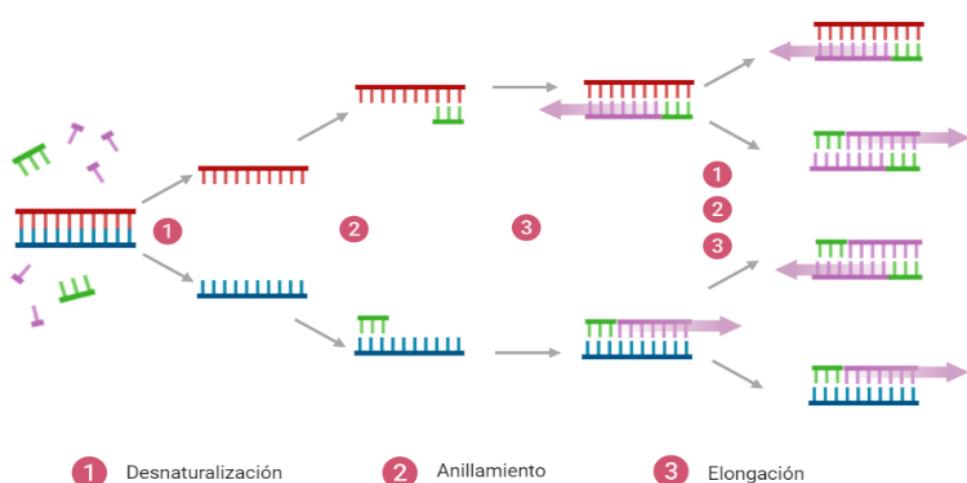


Termociclador. También conocido como máquina de PCR, es utilizado para amplificar segmentos de ADN a través de la reacción en cadena de la polimerasa.

5.2.4. Amplificación del gen problema mediante PCR.

El objetivo es amplificar el gen problema del ADN copia de las células con primers específicos.

Las hebras del ADN se separan. Luego, se añaden primers que son secuencias cortas de ADN que se unen a las regiones específicas del ADN que deseas amplificar. Después, una enzima llamada ADN polimerasa sintetiza nuevas hebras de ADN a partir de los cebadores. Este ciclo se repite varias veces, lo que resulta en una gran cantidad de copias del gen de interés.



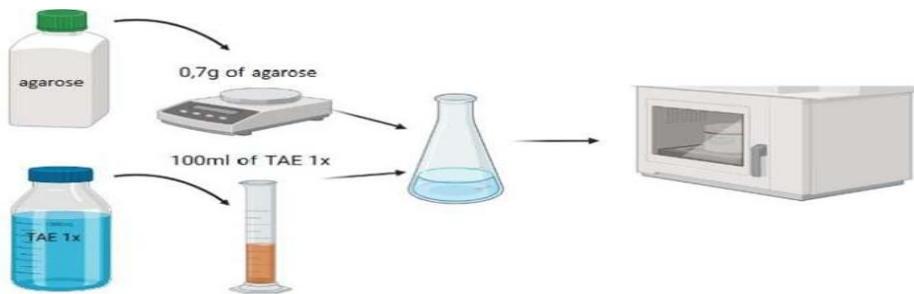
Materiales empleados:

Micropipetas, puntas de pipetas, termociclador (descritos anteriormente).

5.3.5.Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR y visualización de resultados.

El objetivo es realizar un gel de agarosa para separar el producto de la PCR, y visualizar los resultados en el transiluminador, comparando la expresión del gen problema en células tumorales y no tumorales.

Preparación del gel



Esquema del procedimiento para la preparación del gel de agarosa

Preparación de la muestra

En cada tubo de muestra se añadió un agente intercalante que se une al ADN y emite fluorescencia al ser excitado con una luz ultravioleta. Además, se preparó otro tubo con un marcador de peso molecular que contiene ADN de diferentes tamaños conocidos, por lo que nos permite saber el tamaño de la muestra que estamos amplificando.

Carga de las muestras y desarrollo de la electroforesis

Cada una de las muestras se carga en un pocillo del gel.

Se conecta la cubeta a la fuente de alimentación y se aplican 100 voltios y prestando atención a los polos positivo y negativo.

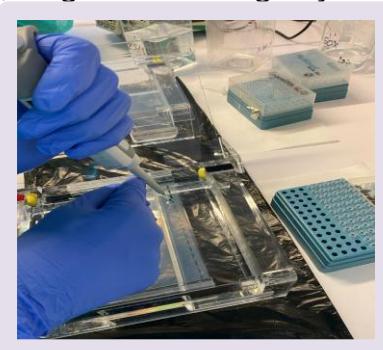
La duración aproximada de la electroforesis es de 40 minutos.

Visualización y fotografiado del gel

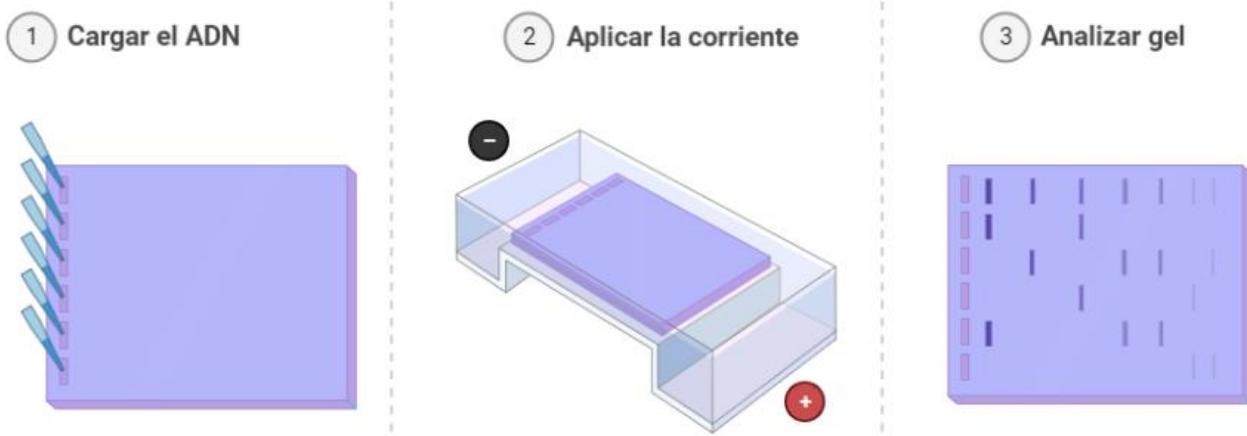
Para poder visualizar el gel, se puso en el transiluminador y se seleccionó el filtro

EtBr/ultravioleta. Se expuso el gel a luz ultravioleta durante 400 ms.

Una vez observado el gel, se guardó la imagen y se analizaron los resultados.



Carga de muestras en el gel de agarosa.



Carga de muestras y visualizado de bandas en el gel de agarosa

Entre otros, los materiales empleados han sido:

Micropipetas, puntas de pipetas, ambos descritos anteriormente.

6. RESULTADOS

CUANTIFICACIÓN DEL ARN

LÍNEA CELULAR	CONCENTRACIÓN(ng/μl)
TUMORALES	243,8
NO TUMORALES	162,3

En las células tumorales hay una concentración de 243,8 ng/μl y en las células no tumorales una concentración de 162,3 ng/μl.

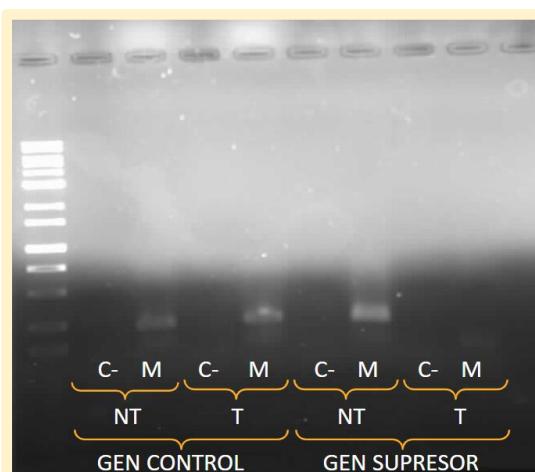
VISUALIZACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR EN GEL DE AGAROSA

NT: Células no tumorales

T: Células tumorales

C-: Control negativo

M: Muestra



Resultados de la expresión de genes supresores de tumores y del gen control en diferentes medios

- En el **control negativo** no existe amplificación en ninguna de las situaciones.
- Se observa amplificación en el **gen control** en las muestras de ambos tipos celulares.
- En el **gen supresor de tumor** hay amplificación en la muestra de la línea no tumoral, mientras que no hay en la muestra de la línea tumoral.

7. CONCLUSIONES

- El **ARN** obtenido tiene una **concentración y una calidad suficiente** para poder utilizarlo como molde para la obtención del ADN copia.
- La **PCR** se ha desarrollado **correctamente** para el **gen control**, ya que se observa expresión tanto en células sanas como tumorales.
- Los **controles negativos** para el gen control y para el gen supresor **no** presentan **expresión**, por lo que consideramos adecuados los resultados.
- El **gen supresor de tumores estudiado se expresa en las células sanas pero no se expresa en las células tumorales.**

8. AGRADECIMIENTOS

Agradecer a todas las personas e instituciones que han hecho posible la realización de este trabajo. Sobre todo al IES Fidiana por ofrecernos esta oportunidad, entre ellos a la profesora del IES Fidiana María del Mar, por orientarnos y ayudarnos en todo momento. También agradecer a las investigadoras, Carmen M^a y Ariadna que nos han ayudado en todo nuestro proceso y al *Laboratorio GC22-Epigenética (IMIBIC)*. Y por último a nuestras familias por su apoyo incondicional.

9. BIBLIOGRAFÍA

- 1.Espín Villacres, V. (2002). Fundamentos en la práctica médica de la genética molecular y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *VozAndes*, 14(1), 56-59.
- 2.Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.* 2007 Apr;8(4):286-98. doi: 10.1038/nrg2005. Epub 2007 Mar 6. PMID:17339880.

3. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Sep 3;93(18):9821-6. doi: 10.1073/pnas.93.18.9821. PMID: 8790415; PMCID:PMC38513.
4. Bing Wei, Fengxin Wu, Wenqun Xing, Haibo Sun, Chi Yan, Chengzhi Zhao, Dongqing Wang, Xiaobing Chen, Yanli Chen, Mingming Li, Jie Ma. A panel of DNA methylation biomarkers for detection and improving diagnostic efficiency of lung cancer. *Sci Rep*. 2021 Aug 18;11(1):16782. doi: 10.1038/s41598-021-96242-6. PMID: 34408226.