

Comparación de la expresión del gen *PLK1* en las líneas celulares HEK 293 y HT 29.

Laura Vanessa Córdoba López ¹

¹Facultad de Ingeniería y Ciencias, Pontificia universidad Javeriana Cali, Cali Colombia

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad multifactorial que se caracteriza por la pérdida de la identidad celular en un contexto tisular que inicialmente conduce a una proliferación descontrolada de las células transformadas. Estas células transformadas, conocidas como células cancerosas, presentan variaciones en su funcionamiento derivados de alteraciones genómicas y epigenómicas que producen cambios fenotípicos que alteran el equilibrio entre la proliferación y la muerte celular, desencadenando en la formación de tumores (Ohshima, K., et al. 20019). Los tumores son tejidos complejos que cuentan con una alta variabilidad celular y una intrincada red de interacciones celulares que les permiten alterar el funcionamiento del órgano en el que se encuentran comprometiendo en su evolución el equilibrio fisiológico del organismo que los porta (Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2000, 2011).

El presente trabajo de grado tiene como objetivo principal validar experimentalmente las predicciones hechas por el modelo matemático de inestabilidad genómica desarrollado por Suescum y colaboradores. Este modelo busca entender la dinámica de la inestabilidad genómica, un proceso crítico en el desarrollo del cáncer, a través de ecuaciones diferenciales que representan diferentes aspectos del comportamiento celular. La inestabilidad genómica es un factor clave en la evolución de los tumores, y su estudio mediante modelos matemáticos ofrece una herramienta poderosa para predecir cómo evolucionan las células cancerosas y cómo responden a las terapias. La validación experimental de estas predicciones es esencial para determinar la precisión del modelo y su aplicabilidad en el diseño de tratamientos personalizados contra el cáncer.

MARCO TEÓRICO

El cáncer es una enfermedad compleja caracterizada por la transformación de células normales en células malignas, un proceso que involucra numerosas alteraciones genéticas y epigenéticas. Estas alteraciones resultan en cambios fenotípicos que perturban el equilibrio entre la proliferación y la muerte celular, conduciendo a la formación de tumores. Los tumores, a su vez, son tejidos complejos con alta variabilidad celular y redes intrincadas de interacciones celulares, lo que permite alterar el funcionamiento del órgano afectado y comprometer el equilibrio fisiológico del organismo.

La comprensión de la carcinogénesis ha requerido décadas de investigación, durante las cuales se han identificado múltiples procesos biológicos y moleculares que facilitan el desarrollo y la progresión del cáncer. Hanahan y Weinberg (2000, 2011) propusieron un conjunto de características comunes a diversos tipos de cáncer, denominadas las "marcas distintivas del cáncer". Estas incluyen: 1. Autonomía en señales de crecimiento. 2. Evasión de las señales anti-crecimiento. 3. Capacidad para evitar la apoptosis. 4. Potencial replicativo ilimitado. 5. Facultad para formar nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis). 6. Habilidad para invadir otros tejidos (metástasis). 7. Modificación del metabolismo celular. 8. Evasión de la respuesta inmune. 9. Inestabilidad genómica. 10. Inflamación promotora de tumores.

Recientemente, se han propuesto nuevas características para ser agregadas a esta lista, como el desbloqueo de la plasticidad fenotípica, la reprogramación epigenética no mutacional, los microbiomas polimórficos y la presencia de células senescentes (Hanahan, D. 2022).

Polo-like Kinase 1 (PLK1)

PLK1 es una quinasa serina/treonina esencial en la regulación del ciclo celular, particularmente en la progresión de la mitosis. Su actividad se encuentra frecuentemente sobre expresada en diversos tipos de cáncer, lo que está asociado con un pronóstico desfavorable. PLK1 desempeña roles cruciales en la activación del complejo promotor del anafase (APC), la formación del huso mitótico y la segregación de los cromosomas. La inhibición de PLK1 ha mostrado efectos prometedores en la reducción de la proliferación de células tumorales, lo que la convierte en un objetivo terapéutico atractivo (Gheghiani, L., & Zheng, F. 2023).

HEK-293 y HT-29

Las líneas celulares HEK-293 y HT-29 se utilizan comúnmente en la investigación del cáncer. HEK-293 son células embrionarias de riñón humano, y HT-29 son células derivadas de un adenocarcinoma de colon humano. Estas líneas celulares sirven como modelos para estudiar las diferencias en la expresión génica y la respuesta a terapias entre células normales y tumorales. Los estudios con estas líneas celulares ayudan a validar experimentalmente las predicciones realizadas por modelos matemáticos sobre la inestabilidad genómica y otros procesos carcinogénicos (Stepanenko, A., Dmitrenko, V. 2015) (Hidalgo, C., Sánchez, B., Margolles, A., & Ruas, P. 2012).

Modelos Matemáticos en la Biología del Cáncer

La complejidad del cáncer ha impulsado el desarrollo de modelos matemáticos como herramientas para estudiar las dinámicas moleculares y celulares involucradas en su desarrollo. Estos modelos permiten una aproximación integral que puede controlar y especificar variables de manera precisa, algo difícil de lograr en experimentos tradicionales. Los modelos matemáticos pueden formalizar ciclos y dinámicas moleculares en ecuaciones

diferenciales, proporcionando información predictiva sobre el crecimiento tumoral, su progresión y la respuesta a terapias.

Los modelos integran datos a múltiples escalas, desde la molecular hasta la tisular, en un marco de biología de sistemas. Esto ayuda a comprender los comportamientos emergentes del cáncer que resultan de interacciones complejas. Sin embargo, las simplificaciones inherentes a los modelos matemáticos requieren que sus resultados sean validados experimentalmente mediante pruebas moleculares, celulares y fisiológicas. Estos experimentos son esenciales para calibrar los modelos y confirmar o descartar las predicciones realizadas *in silico*.

METODOLOGÍA

Cultivo celular

Se utilizaron dos líneas celulares distintas: HEK-293, que son células embrionarias humanas, y HT-29, que son células de adenocarcinoma de colon humano. Estas líneas celulares se cultivaron en medio DMEM completo, el cual está suplementado con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina al 1% y una combinación de penicilina y estreptomina al 1% para prevenir infecciones bacterianas. Las células se mantuvieron en condiciones controladas de 37°C y 5% de CO₂. Se monitoreó regularmente la confluencia celular para asegurar que las células no alcanzaran una densidad excesiva, realizando pases cuando las células alcanzaban aproximadamente un 80% de confluencia.

Lisado de células y extracción de ARN

Para la extracción de ARN, las células cultivadas se lisaron utilizando reactivos específicos que permiten la liberación del ARN mientras se preserva su integridad. El ARN extraído se utilizó como plantilla para la síntesis de ADN complementario (cDNA) mediante una reacción de transcripción inversa. Este cDNA se empleó en la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para medir los niveles de expresión de genes específicos: AURKB, INCENP, KIF2C, PLK1 y PTTG1. La qPCR permite cuantificar de manera precisa la expresión génica comparando la cantidad de cDNA de los genes de interés entre las diferentes muestras.

Síntesis de cDNA.

Para la síntesis de cDNA se utilizó el kit Transcriptor Universal cDNA Master Mix (ROCHE®). A partir de 1 µg de ARN obtenido, se realizó la conversión de éste a ADN complementario (ADNc) siguiendo el protocolo de síntesis de la compañía que manufacturó el kit. La reacción de síntesis implementada se llevó a cabo de la siguiente manera: 5 minutos a 25°C, 10 minutos a 55°C y 5 minutos a 85°C. Finalmente, el ADNc sintetizado se diluyó a una concentración final de 2 ng/ µl. Para cada línea celular se obtuvieron 6 réplicas biológicas a evaluar vía qPCR.

qPCR.

El protocolo qPCR se realizó siguiendo el método de cuantificación relativa implementando SYBR Green como fluoróforo de detección y utilizando el kit KiCqStart® SYBR® Green qPCR ReadyMix™. Para los experimentos se adicionaron 3 µl de cDNA a una concentración de 2 ng/ µl provenientes de las líneas celulares HEK293 y HT29, 5 µl de mezcla de reacción (qPCR readyMix) y 1 µl de cada primer a una concentración final de 2.5µM. Se evaluaron tres réplicas por cada réplica biológica de cada tratamiento analizado. Las réplicas biológicas tenidas en cuenta para los experimentos realizados fueron 3. El programa de amplificación contenía un período de incubación a 95 °C durante 600 segundos, 45 continuos ciclos de amplificación (95°C por 30 segundos, 68°C por 30 segundos y 72°C por 35 segundos). Finalmente, se realizó un análisis de denaturación (Tm Calling) para determinar la especificidad de los primers utilizados a través de los picos de denaturación generados. Por último, se utilizó el método de expresión relativa para calcular las diferencias en expresión en donde células HEK293 se contrastaron como células control contra las células HT-29. Para los patrones de comparación, la expresión de cada marcador clave para el modelo en las células HEK293 se relativizó a cero, y las diferencias en la expresión determinadas por el método 2-ΔCt (Livak & Schmittgen 2001) se expresaron como variaciones con relación a este valor. Los genes actina y matpsy fueron utilizados como normalizadores. Los marcadores evaluados fueron:

RESULTADOS

Se observaron diferencias en la expresión génica entre las líneas celulares HEK-293 y HT-29. Los genes AURKB, INCENP, KIF2C y PLK1 mostraron una disminución en sus niveles de expresión en la línea celular HT-29 en comparación con HEK-293. Esto sugiere que estos genes pueden estar regulados diferencialmente en las células de adenocarcinoma de colon. Por otro lado, el gen PTTG1 presentó una sobreexpresión significativa en HT-29, lo que podría estar relacionado con mecanismos específicos de inestabilidad genómica en este tipo de células cancerosas. Sin embargo, la alta variabilidad observada entre las réplicas experimentales impidió obtener diferencias estadísticamente significativas, lo que subraya la necesidad de realizar más experimentos para confirmar estos hallazgos.

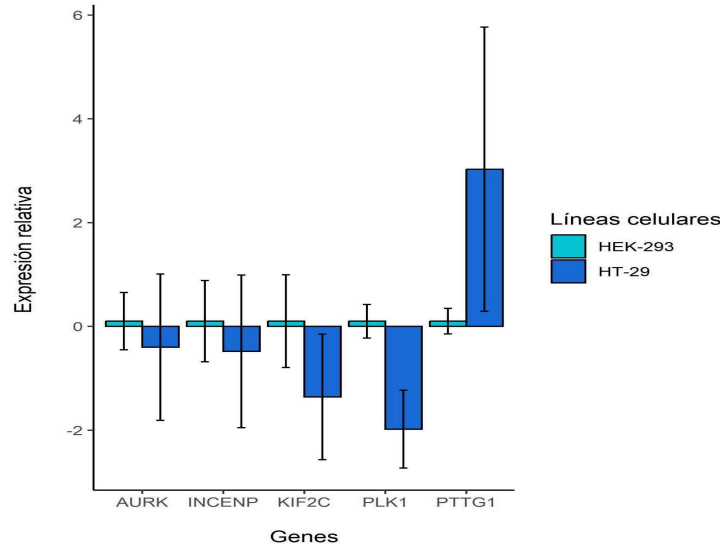


Fig. 1. Expresión relativa de los genes AURK, INCENP, KIF2C, PLK1 y PTTG1 en las muestras (n=3) extraídas de la línea celular HT-29 (color azul), comparados en base a los niveles de expresión de las muestras (n=3) extraídas de la línea celular HEK-293 (color verde). Los valores centrales de expresión fueron: AURK = -0.4, INCENP = -0.48, KIF2C = -1.36, PLK1 = -1.98 y PTTG1 = 3.03.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos indican que existen diferencias en la expresión de genes clave involucrados en la inestabilidad genómica entre las células embrionarias (HEK-293) y las células de adenocarcinoma de colon (HT-29). Estas diferencias podrían reflejar variaciones en los mecanismos moleculares que subyacen a la inestabilidad genómica en diferentes contextos celulares. La sobreexpresión del gen PTTG1 en HT-29 es particularmente interesante, ya que este gen está asociado con la separación incorrecta de los cromosomas durante la división celular, un proceso crítico en la inestabilidad genómica. No obstante, la alta variabilidad en los resultados experimentales destaca la importancia de repetir los experimentos con un mayor número de réplicas para reducir la variabilidad y obtener datos más robustos. La validación de las predicciones del modelo matemático propuesto por Suescum y colaboradores podría proporcionar una herramienta valiosa para predecir el comportamiento de las células cancerosas y desarrollar estrategias terapéuticas más efectivas.

Referencias

- Gheghiani, L., & Fu, Z. The dark side of PLK1: Implications for cancer and genomic instability. *Oncotarget*, 14, 657. (2023).
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70. (2000).
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674. (2011).

Hanahan, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31-46. (2022).

Ohshima, K., Fujiya, K., Nagashima, T., Ohnami, S., Hatakeyama, K., Urakami, K., ... & Yamaguchi, K. Driver gene alterations and activated signaling pathways toward. (2019).

Stepanenko, A. A., & Dmitrenko, V. V. HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene*, 569(2), 182-190. (2015).