



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE
DEPARTAMENTO CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA

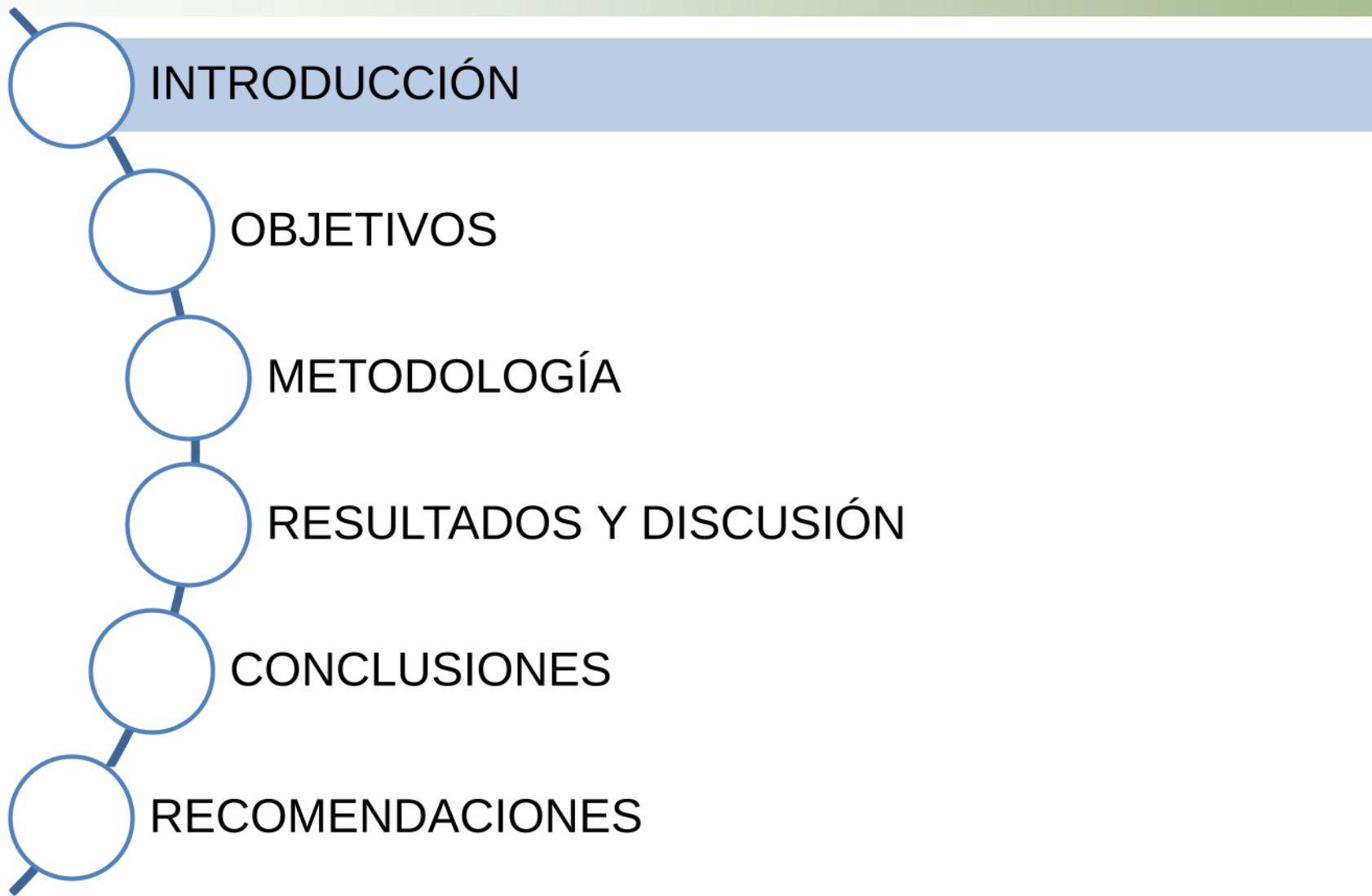
**Evaluación de la estabilidad de expresión de los genes de referencia *ACTBL2*,
ACTB y *HPRT* en la línea celular McCoy ATCC CRL-1696 expuesta a nanopartículas
de plata cubiertas con doxiciclina**

Autor: Márquez Cadena, Milton Paúl

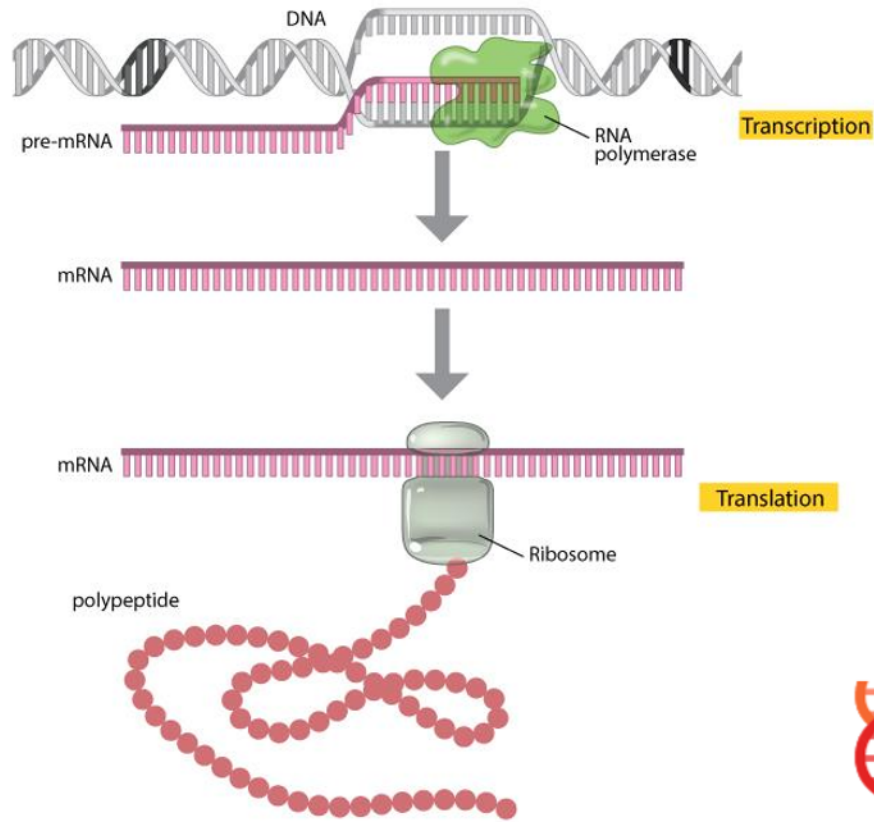
Director: Torres Arias, Marbel

Sangolquí, 02 de Septiembre de 2022





Expresión Génica



Análisis de Expresión Génica

	1	2
Gen 1		
Gen 2	—	
Gen 3		

Genes *housekeeping*



Expresión en una condición



Célula y Especie

Línea celular McCoy ATCC CRL-1696

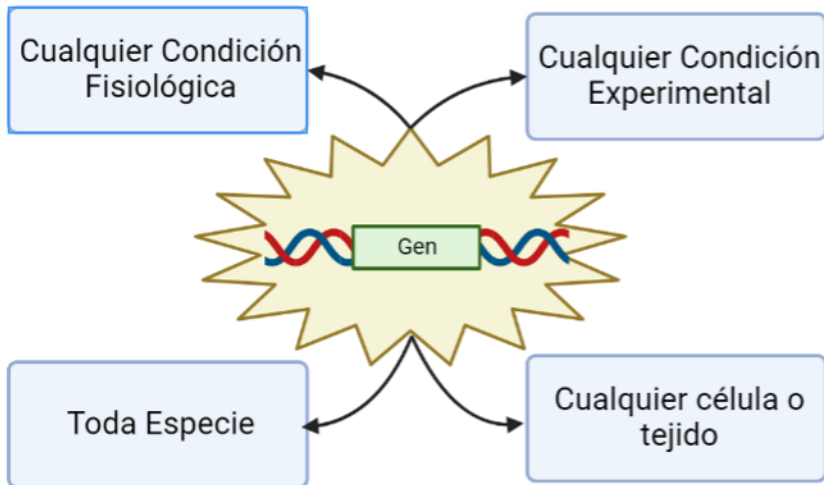
- Especie: *Mus musculus*
- Tipo de célula: Fibroblasto
- Adherencia: Si

Condición Experimental

Nanopartículas de plata cubiertas con doxiciclina

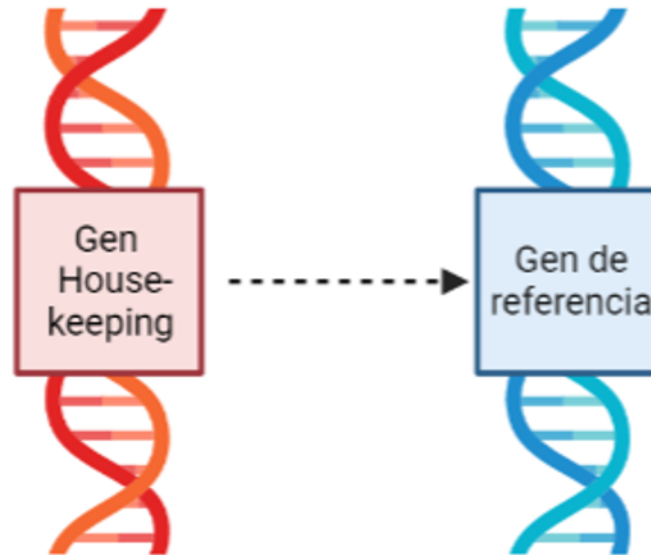
Estabilidad de los genes de referencia

No existe gen de referencia definitivo



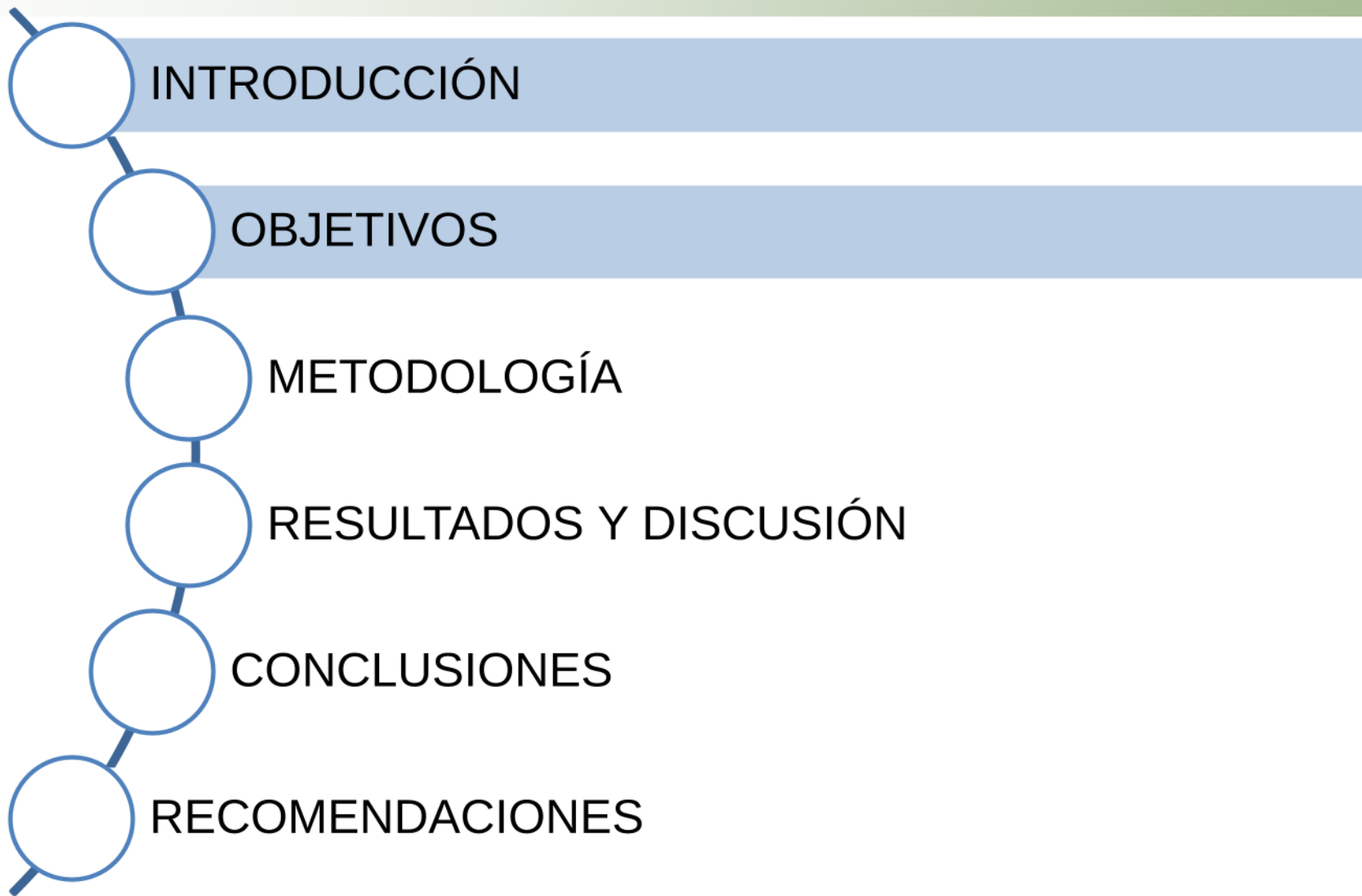
Validación de estabilidad

- Comprobar estabilidad
- Gen más estable
- Grupo de genes estables



Hipótesis

La expresión de los genes *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT* será constante en la línea celular McCoy ATCC CRL-1696 no expuesta y expuesta a nanopartículas de plata cubiertas con doxiciclina.



Objetivo general

Evaluar la estabilidad de expresión de los genes de referencia *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT* en la línea celular McCoy ATCC CRL-1696 expuesta a nanopartículas de plata cubiertas con doxiciclina.

Objetivos específicos

Extraer RNA de células McCoy ATCC CRL-1696 para la optimización de los protocolos de qPCR de los genes *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT*.

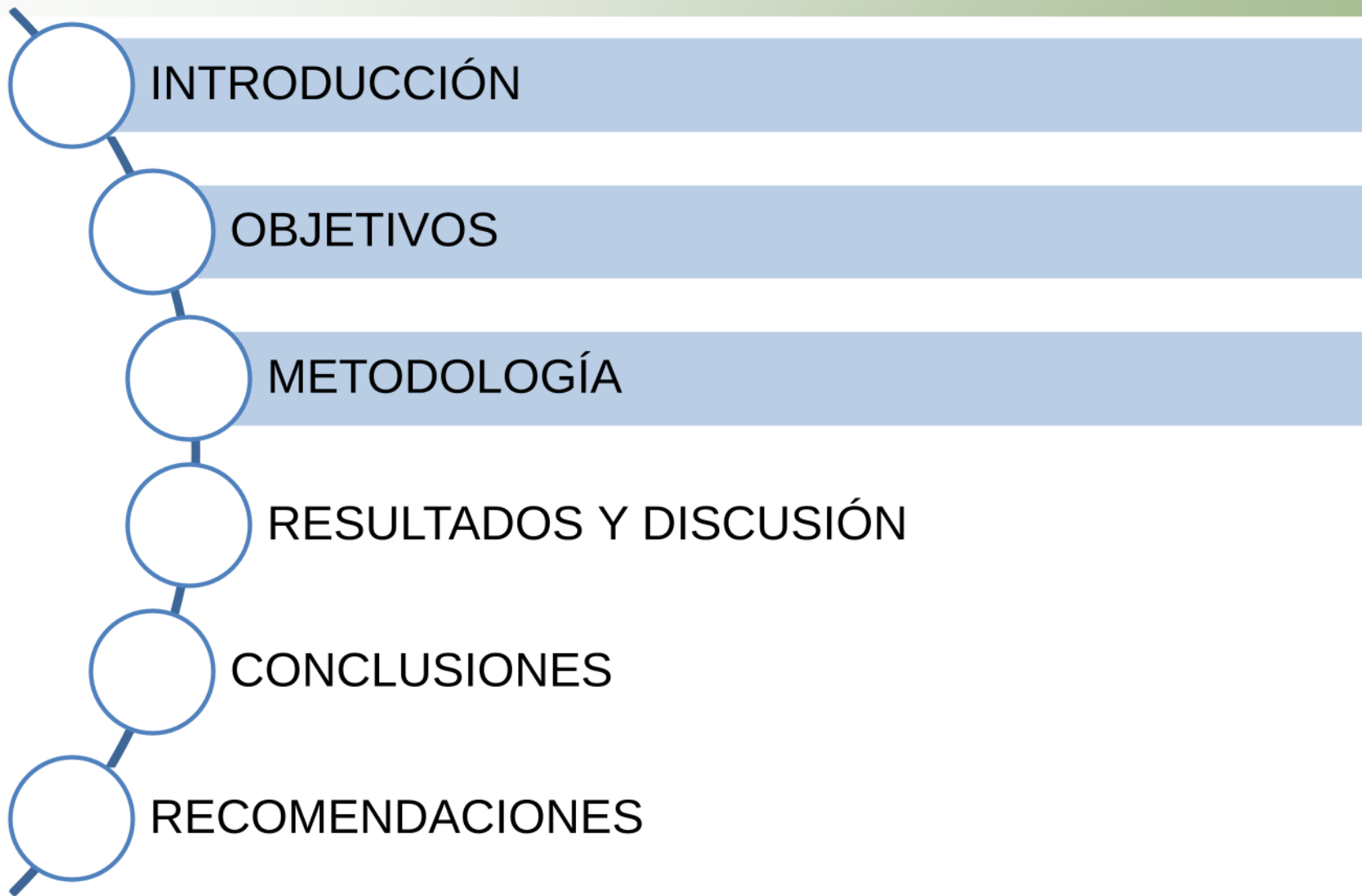
Optimizar un protocolo de PCR en tiempo real para el gen de referencia proteína similar a beta-actina 2 (*ACTBL2*)

Optimizar un protocolo de PCR en tiempo real para el gen a beta actina (*ACTB*)

Optimizar un protocolo de PCR en tiempo real para el gen hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (*HPRT*)

Comparar la estabilidad de los 3 genes de referencia estandarizados *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT* en la línea celular McCoy ATCC CRL-1696



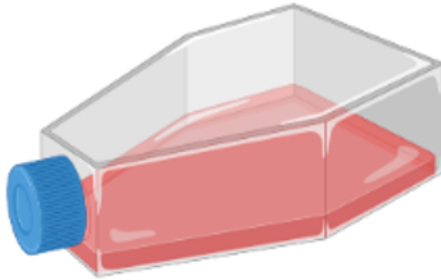


Mantenimiento de
línea celular McCoy

Extracción de RNA
de células McCoy

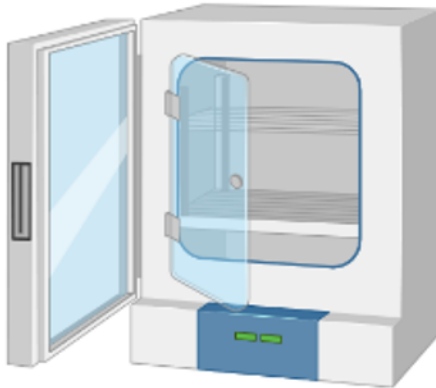
Cuantificación y
evaluación de la
integridad del RNA

MEM:
1% Antibiótico
10% FBS



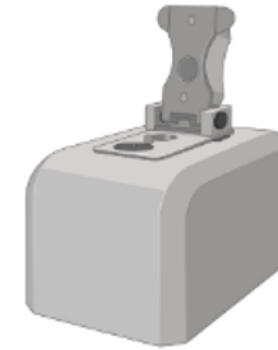
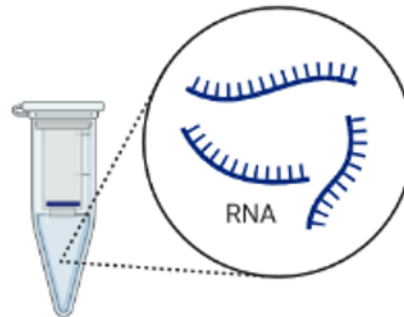
37 °C

CO₂: 5%

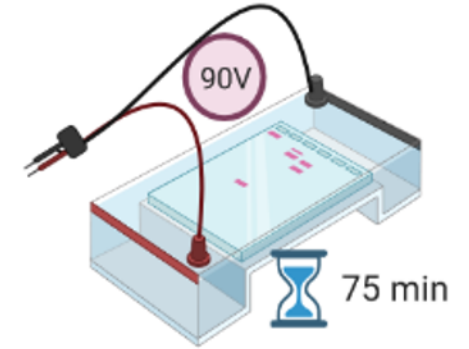


2 x 10⁶ células

PureLink RNA
Mini Kit



NanoDrop
2000

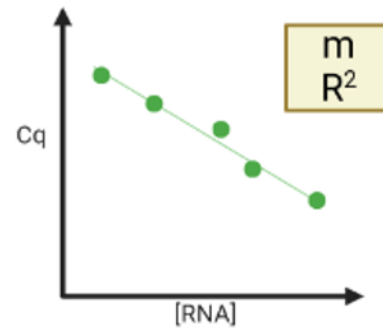
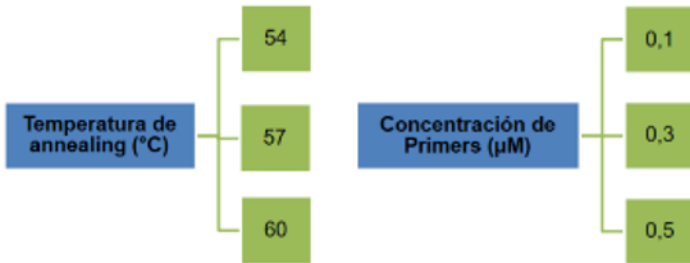
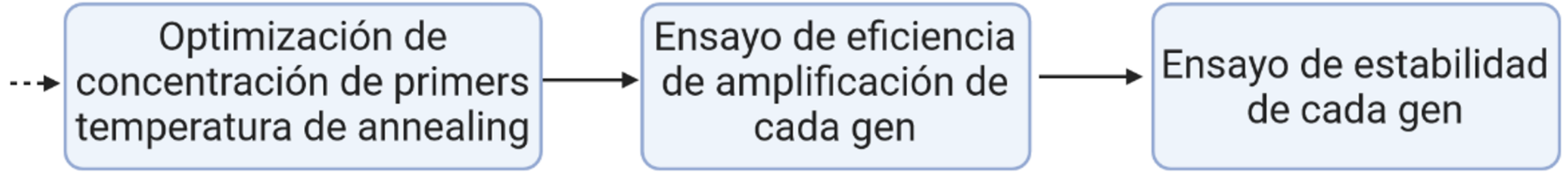


Electroforesis
Horizontal
Agarosa (1%)



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

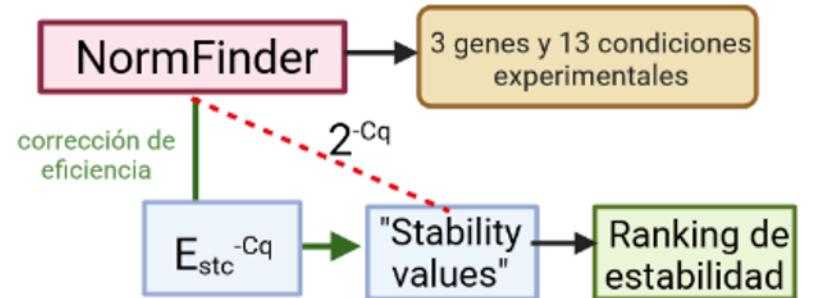
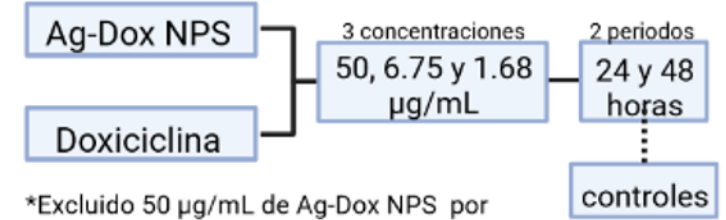




$$E(\%) = (10^{-1/m} - 1) \times 100\%$$

$$E_{stc} = 10^{-1/m}$$

RNA expuesto a 13* condiciones:



3 Ensayos con Dupletas

Optimización de concentración de primers
temperatura de annealing

Ensayo de eficiencia
de amplificación de
cada gen

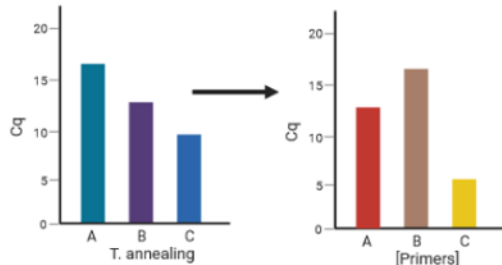
Ensayo de estabilidad
de cada gen

ACTB y HPRT

ACTBL2

Diagramas de barras

Mapa de calor



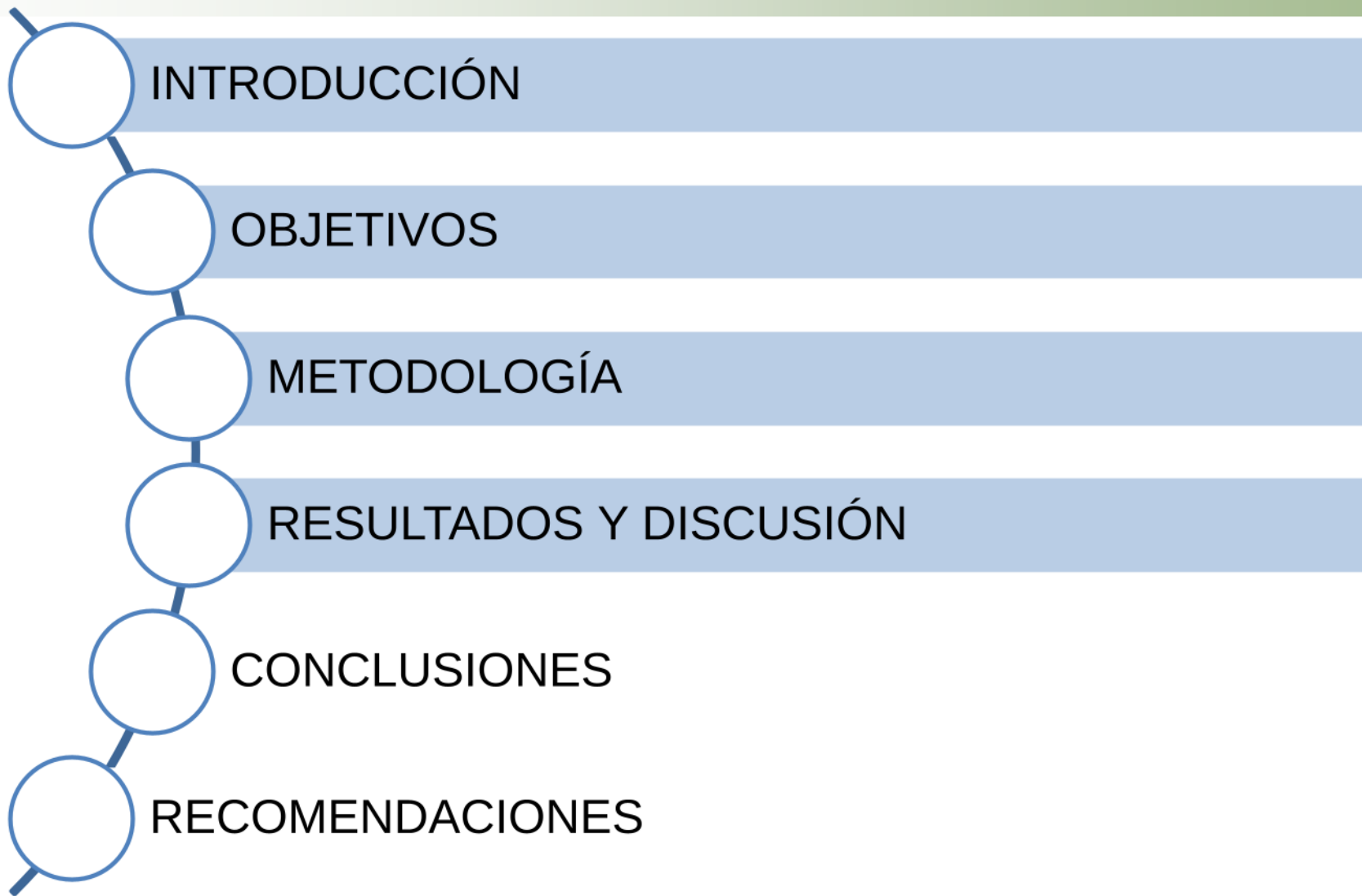
Dupletas

Dupletas



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



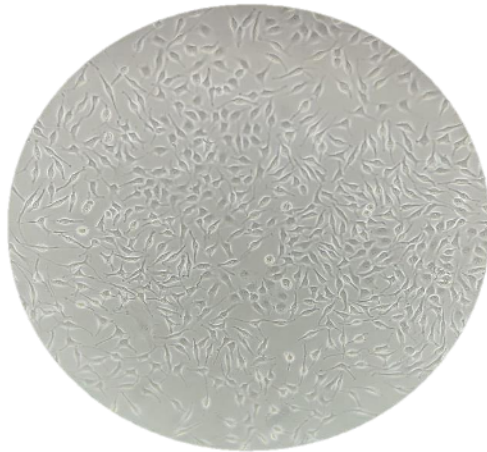


RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mantenimiento de línea celular McCoy

Extracción de RNA de células McCoy

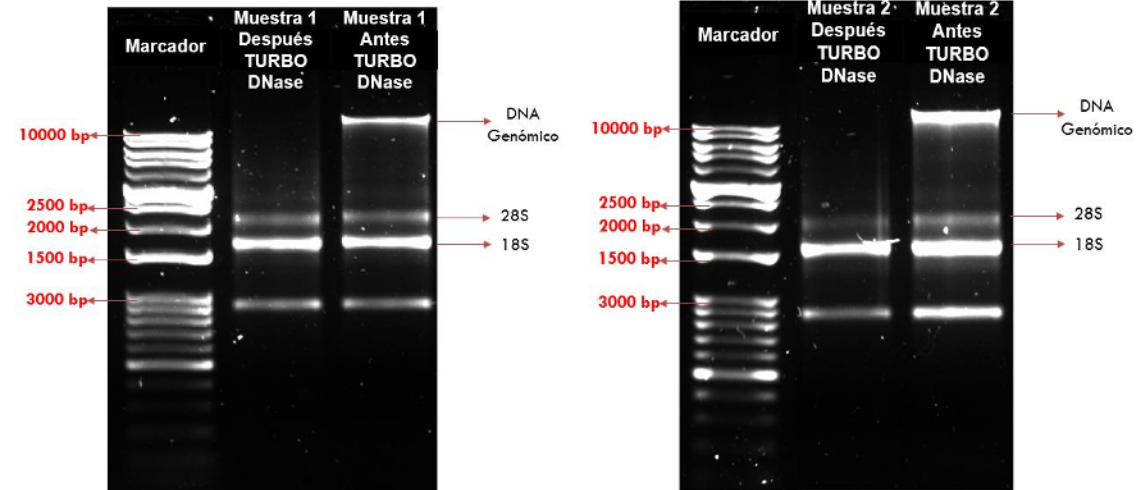
Cuantificación y evaluación de la integridad del RNA



Línea celular McCoy ATCC CRL-1696 (20X)

Confluencia ~ 75%

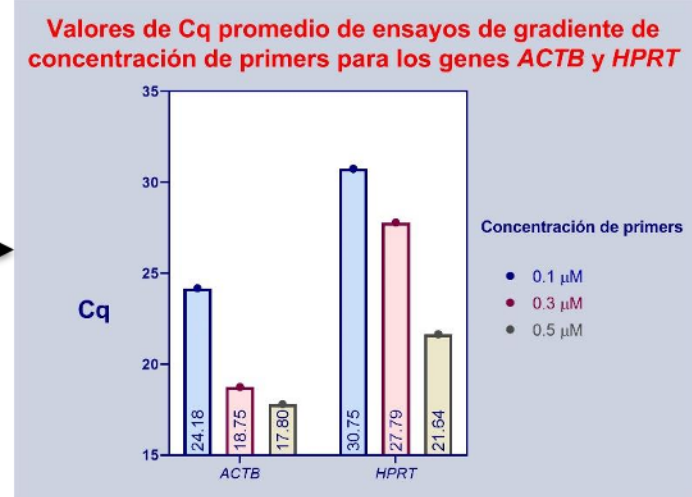
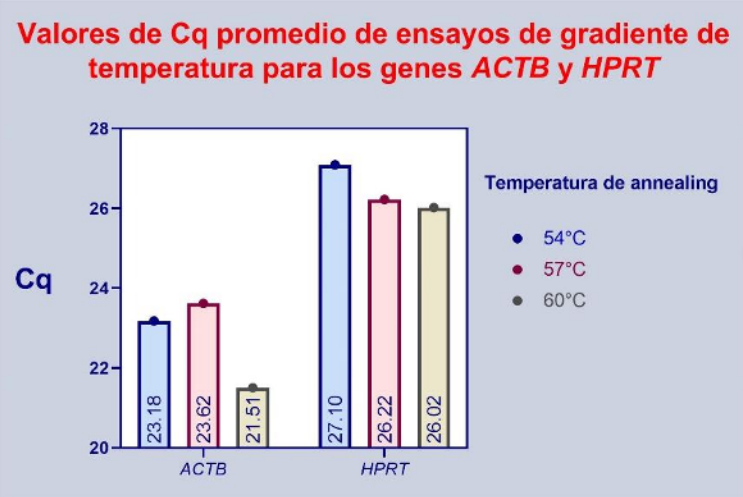
Muestra	Concentración (ng/μL)			Radio	Radio
	1er Medición	2da Medición	Promedio	260/280	260/230
Muestra 1	194.1	196.6	195.35	2.02	1.68
Muestra 2	352.5	386.7	369.6	2.01	1.88



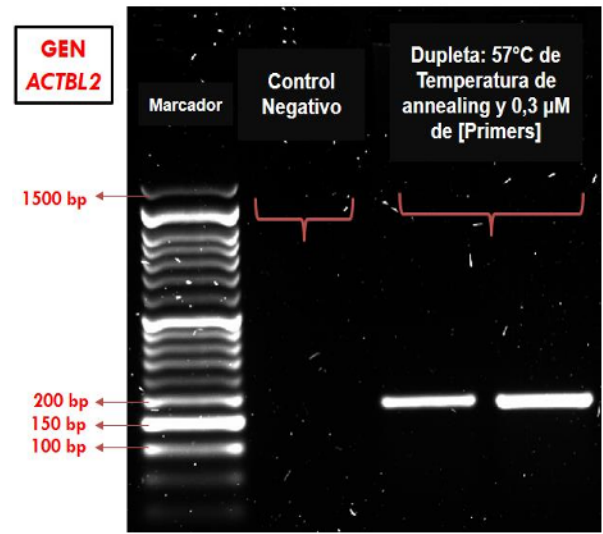
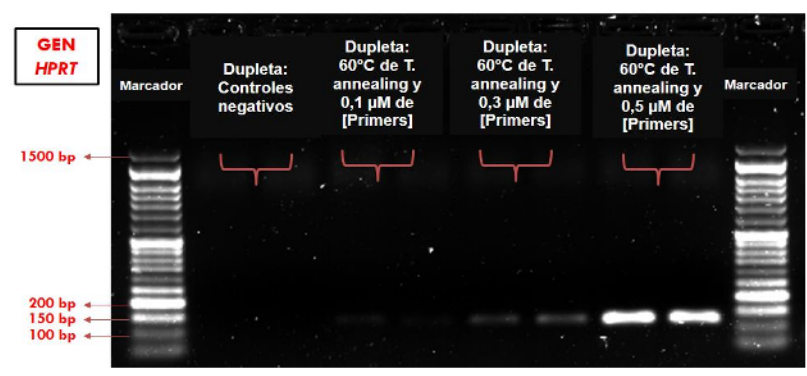
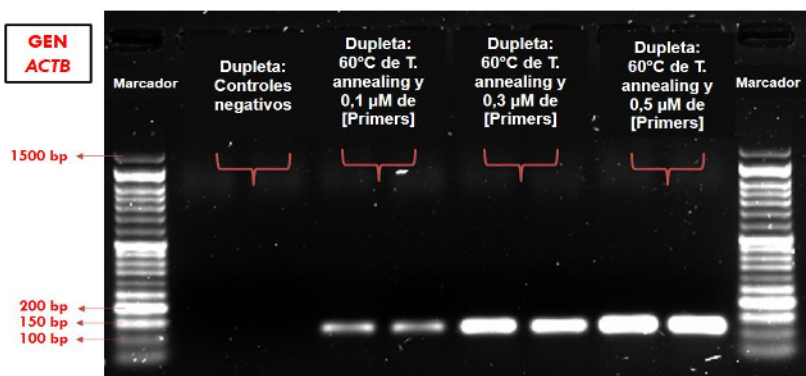
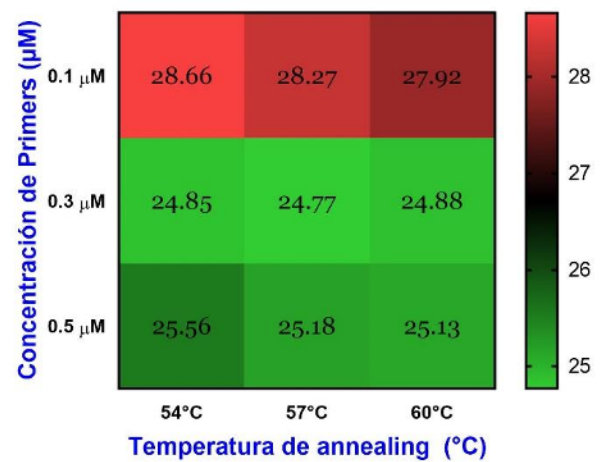
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Optimización de concentración de primers temperatura de annealing

Dupletas



Valores de Cq promedio para el gen *ACTBL2*



(Bustin et al., 2009), (Ruiz-Villalba et al., 2021, p.)

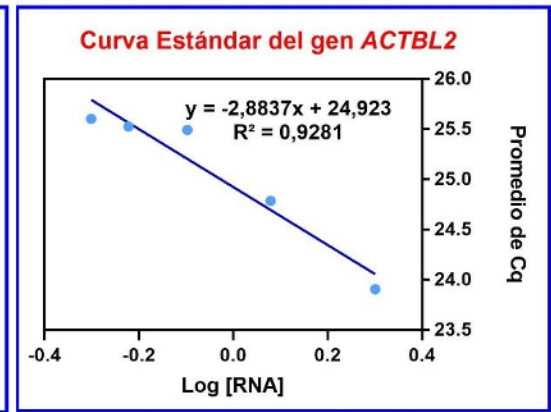
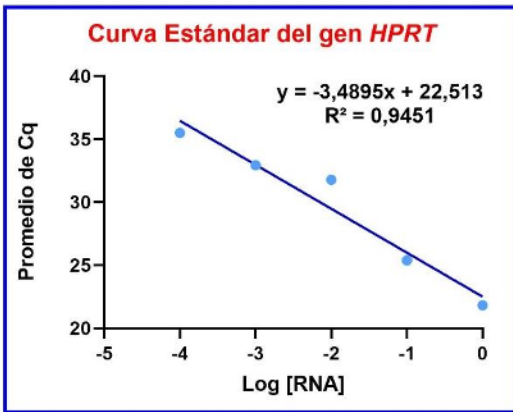
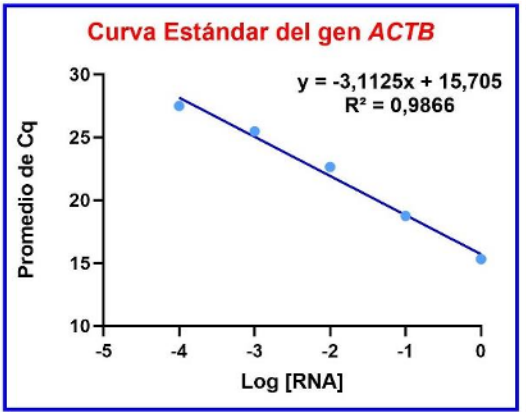
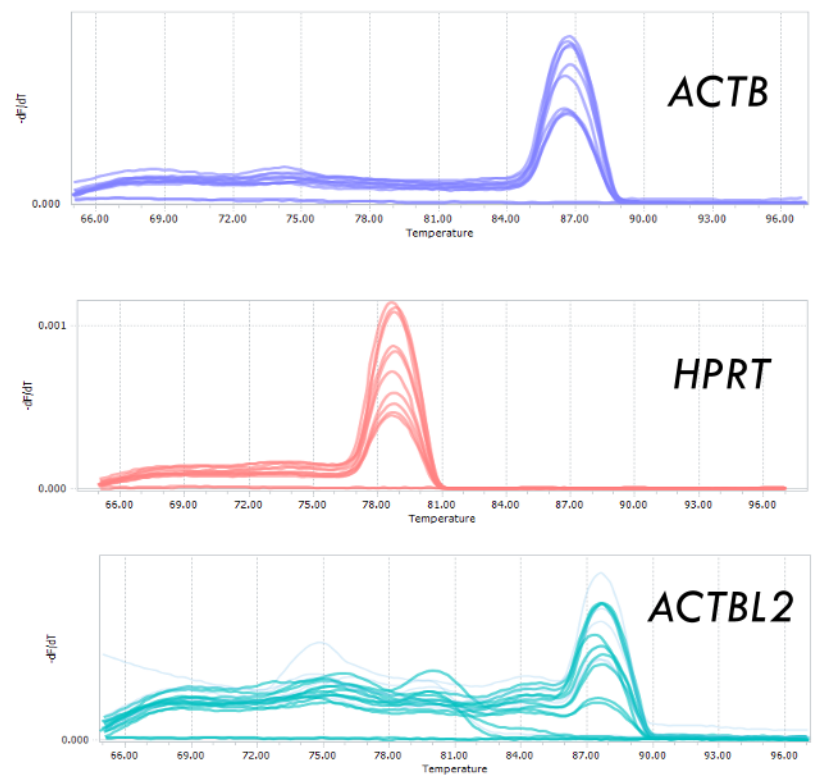
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo de eficiencia de amplificación de cada gen

Dupletas

Curvas Estándar

Curvas de Melting



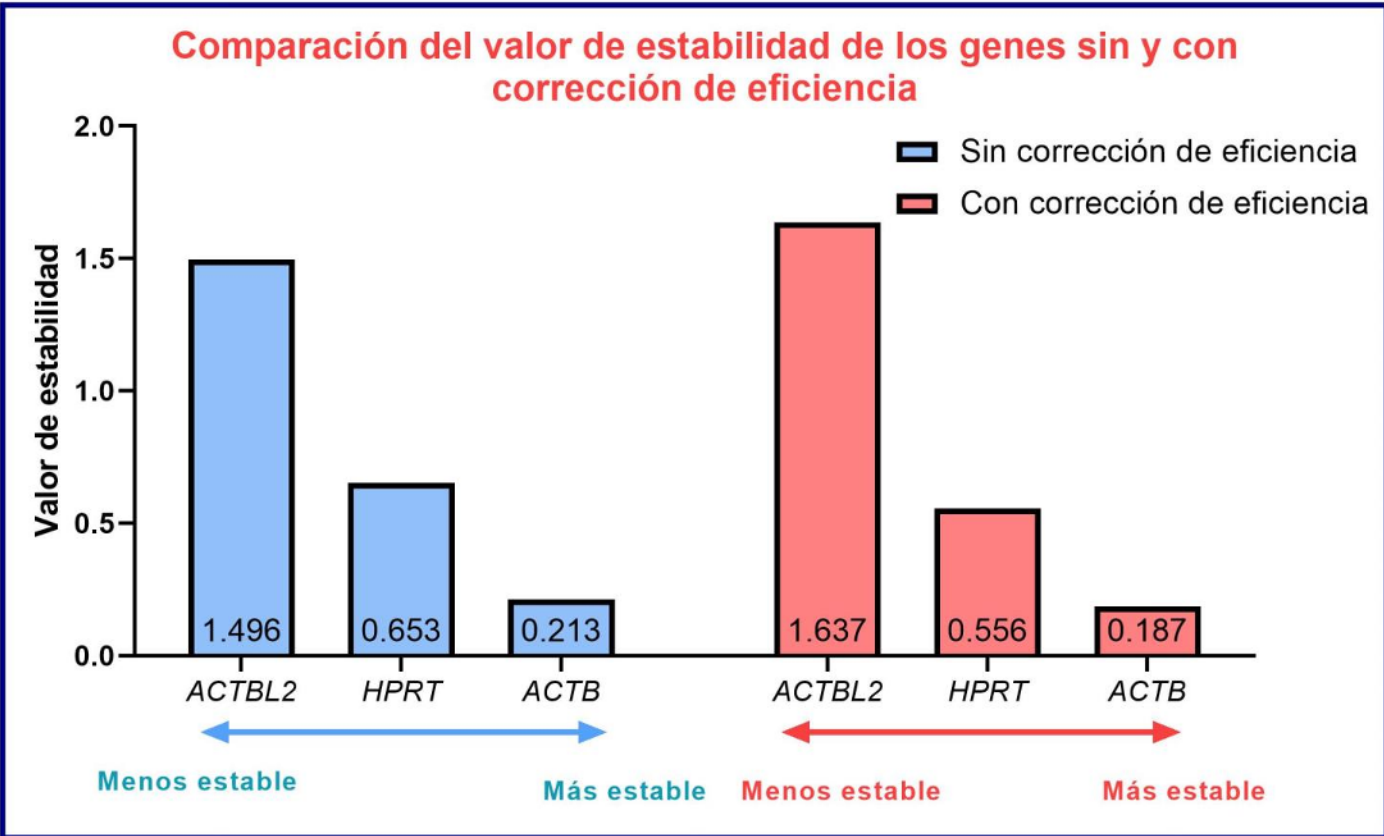
Gen	Pendiente	R ²	% de Eficiencia
ACTBL2	-2.8837	0.9281	122.2 %
ACTB	-3.1125	0.9866	109.5 %
HPRT	-3.4895	0.9451	93.5 %

90-110%

(Thompson, 2010), (Pfaffl, 2004), (Ruiz-Villalba et al., 2017), (Bivins et al., 2021), (El-Fahmawi, 2013).

Ensayo de estabilidad de cada gen

3 Ensayos con Dupletas

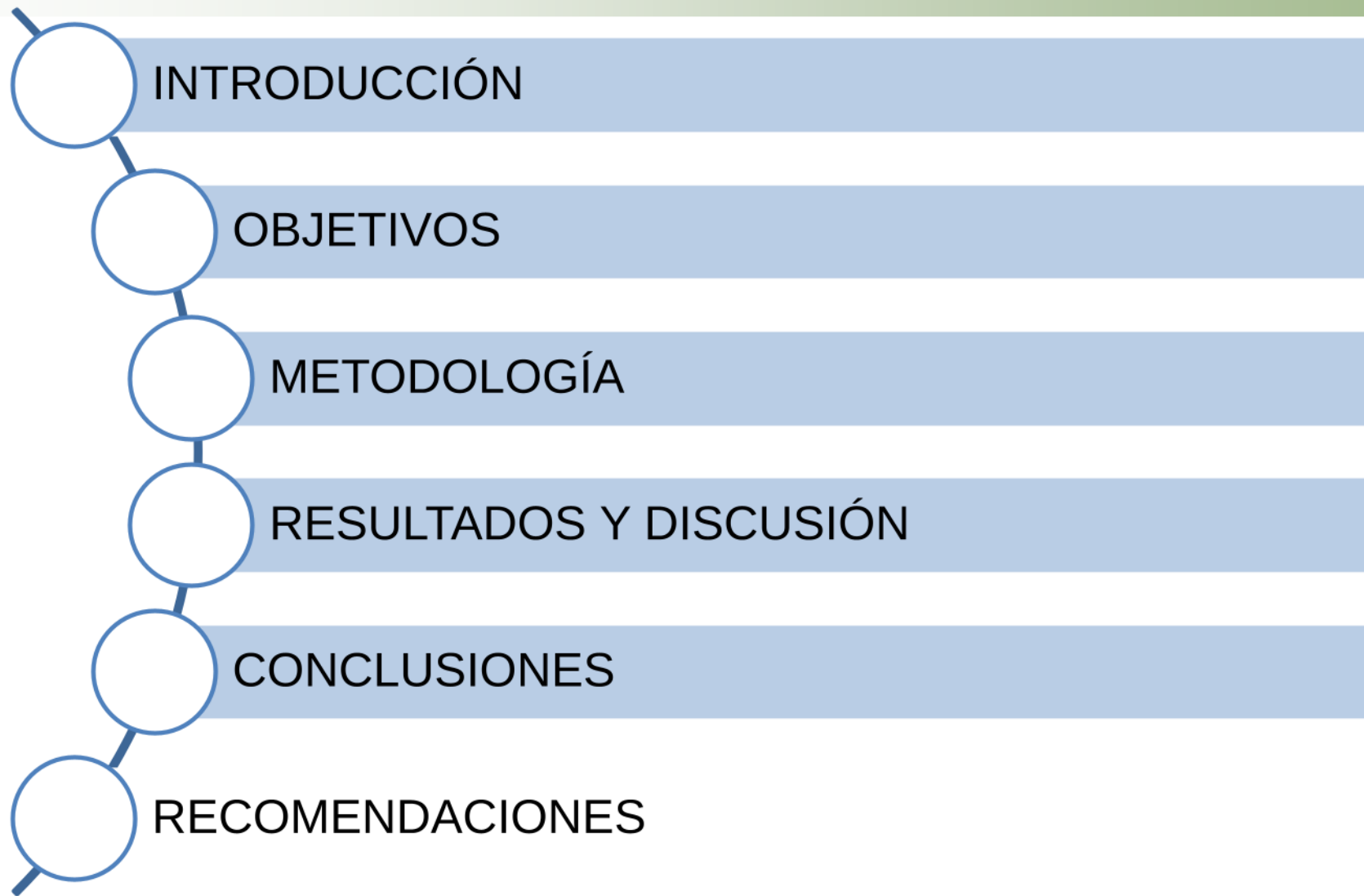


NormFinder

Valor de Estabilidad

Variabilidad Génica





CONCLUSIONES

El manejo adecuado de la línea celular McCoy ATCC CRL-1696 permitió obtener el número de células suficientes para extraer RNA de óptima calidad y concentración, para el estudio de la eficiencia de amplificación de los genes.

La optimización de los ensayos de qPCR permitió encontrar los valores óptimos de temperatura de annealing y de concentración de primers de cada ensayo, lo que posibilitó la corrida de ensayos de eficiencia y estabilidad en los genes *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT*. Para *ACTB* y *HPRT* son 60°C y 0,5 µM. Para *ACTBL2* son 57°C y 0,3 µM.

Las curvas de melting de los genes *ACTB* y *HPRT* permitieron demostrar que existe un solo pico correspondiente al amplicon esperado por gen, cercano a los valores predichos por OligoCalc. Mientras que para el gen *ACTBL2*, solo en la primera concentración se observa productos inespecíficos.

La curva estándar de los genes *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT* permitió encontrar la eficiencia de amplificación y el coeficiente de determinación (R^2) en cada gen. Donde, el coeficiente de determinación (R^2) de los genes *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT* fue superior a 0.9 en todos los casos, donde *ACTB* tuvo un valor superior a 0.98. La eficiencia de amplificación de los genes *ACTB* y *HPRT* fue 109.5% y 93.5%, respectivamente, los cuales están dentro del rango óptimo (90-110%).

Los ensayos de estabilidad de los tres genes de referencia, con corrección de eficiencia, permitieron identificar que el valor de estabilidad (el cual indica variabilidad) de *ACTBL2* el cual es 3 y 8.75 veces superior a los genes *HPRT* y *ACTB*, respectivamente. Con esto se establece que el gen *ACTBL2* muestra una mayor variabilidad y por ende inestabilidad de su expresión, en las condiciones experimentales del presente proyecto. Por su parte, los genes *ACTB* y *HPRT* muestran valores de estabilidad cercano a cero, lo que nos indica que estos genes presentan estabilidad constante en la línea celular McCoy ATCC CRL-1696 no expuesta y expuesta a nanopartículas de plata cubiertas con doxiciclina.





Se recomienda realizar los análisis de eficiencia de amplificación y estabilidad usando otro juego de primers para el gen *ACTBL2*, para comprobar si el diseño de los primers usados en el presente estudio fue un factor de los resultados obtenidos.

Se recomienda realizar un análisis de sensibilidad analítica en los genes *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT*. Esto para saber el límite de detección de los ensayos en las condiciones optimizadas.

Se recomienda realizar un análisis de estabilidad usando los datos crudos de Cq en función de las diferentes concentraciones y tiempos de exposición a nanopartículas de plata cubiertas con doxiciclina.

Se recomienda realizar un análisis de estabilidad usando como control a la línea celular McCoy ATCC CRL-1696 expuesta a nanopartículas de plata sin ser recubiertas con doxiciclina.



Laboratorio de Biotecnología
Humana

Laboratorio de Inmunología y
Virología

**FAMILIA
AMIGOS Y COMPAÑEROS**



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

