



Instituto Tecnológico de Costa Rica
Escuela de Biología
Ingeniería en Biotecnología



Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede San Carlos

“Estudio de expresión de los genes *cIAP* y *cMET*, en tejido hepático con y sin neoplasia de *Rattus Norvegicus*”

Informe del Trabajo Final de Graduación para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología con el grado académico de Bachillerato

Daniel Esteban Coto Valverde

Cartago Abril, 2010



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE BIOLOGIA
INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA**



INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

**“ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE LOS GENES *cIAP* Y *cMET*, EN TEJIDO
HEPÁTICO CON Y SIN NEOPLASIA DE DE *Rattus Norvegicus*”**

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA, SEDE SAN CARLOS

Daniel Esteban Coto Valverde

Cartago, 2010

RESUMEN

El carcinoma hepatocelular es la neoplasia más frecuente en el hígado y su incidencia se ha duplicado en los últimos 40 años, situándola como el quinto tumor más frecuente en el mundo. A pesar del uso de distintos métodos de diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad, hasta la fecha, ninguno ha resultado completamente efectivo y son aplicables únicamente si se diagnostica la enfermedad en sus fases iniciales. El conocimiento de los niveles de expresión de los genes involucrados en el desarrollo de este cáncer podría traer nuevas alternativas para la prevención, diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad, razón por la cual el objetivo de este estudio fue determinar los niveles de expresión de los genes *clAP* y *cMET* en tejidos de hígado con y sin neoplasia del organismo *Rattus norvegicus*. Mediante el uso de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR), se obtuvo que la expresión, tanto del gen *clAP* como del gen *cMET* disminuyó en las muestras neoplásicas con relación a las muestras no afectadas. También se analizó la expresión de estos genes en muestras con formaciones neoplásicas pero tratadas con un agente antitumoral. Estas últimas presentaron un aumento en la expresión del gen *cMET* contrariamente al gen *clAP*, el cual disminuyó su expresión. Debido a que la cantidad de muestras utilizadas fue reducida, no fue posible realizar análisis estadísticos. Sin embargo, dichos resultados no coinciden con los esperados teóricamente.

Palabras claves: neoplasia; qPCR; niveles de expresión génicos; cáncer.

ABSTRACT

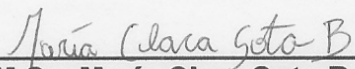
Hepatocellular carcinoma is the most common malignancy in the liver and its incidence has doubled in the last 40 years, placing it as the fifth most common tumor in the world. Despite the use of different methods of diagnosis and treatment of this disease, none has proven completely effective and are applicable only if the disease is diagnosed in its early stages. Knowledge of the expression levels of genes involved in the development of this cancer could bring new alternatives for prevention, diagnosis and treatment of this disease, which is why the aim of this study was to determine expression level of *cMET* and *cIAP* genes, in *Rattus norvegicus* liver tissue with and without neoplasm. Using the technique of reaction Polymerase Chain in real time (qPCR), we found that the expression of both genes *cIAP* and *cMET* decreased in neoplastic samples compared to samples not affected. We also analyzed the expression of these genes in samples with neoplastic formations but treated with an anti-tumor agent. The latter showed an increase in gene expression *cMET* unlike the *cIAP* gene, which decreased its expression. Because the number of samples used was small, no statistical analysis was possible. However, these results do not coincide with those expected theoretically.

Key words: neoplasm; qPCR; gene expression levels; Cáncer.

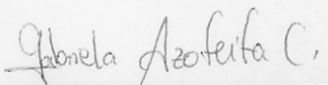
**ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE LOS GENES *cIAP* Y *cMET*, EN TEJIDO
HEPÁTICO CON Y SIN NEOPLASIA DE *Rattus Norvegicus***

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

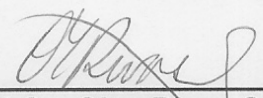
Miembros del Tribunal



M.Sc. María Clara Soto Bernardini
Profesora Asesora-ITCR



M.Sc. Gabriela Azofeifa Cordero
Asesora- Empresa



M.Sc. Olga Rivas Solano
Lectora

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos por su esfuerzo y apoyo
durante todos mis estudios

AGRADECIMIENTOS

El autor desea dejar constancia de su agradecimiento a los siguientes organismos y personas, por su colaboración en el presente trabajo:

A la Escuela de Ciencias y Letras del ITCR Sede San Carlos, así como al Instituto Clodomiro Picado de la Facultad de Microbiología de la UCR por el apoyo económico para la ejecución del proyecto.

A Omar Gadjens, por compartir su conocimiento y experiencia que me permitieron tener un mayor criterio durante el desarrollo de este trabajo.

A los funcionarios del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Costa Rica Sede San Carlos, en especial a Jaime Soto y Wayner Montero, por su incansable ayuda y apoyo durante la realización del presente trabajo.

A los miembros del Tribunal evaluador, que siempre estuvieron anuentes ante cualquier consulta, en especial a María Clara Soto por su paciencia y conocimiento que enriqueció enormemente el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	2
DEDICATORIA.....	4
AGRADECIMIENTOS.....	5
ÍNDICE GENERAL.....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE ANEXOS.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	12
2.1 El cáncer como una enfermedad genética.....	12
2.2 Cáncer de hígado y carcinoma hepatocelular (CHC).....	13
2.3 Diagnóstico y terapia del cáncer de hígado.....	14
2.4 Genes en estudio y su relación con el cáncer.....	15
2.5 Proto-oncogén <i>cMET</i>	15
2.6 Proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP's).....	16
2.7 Técnicas de biología molecular.....	17
2.8 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	17
2.9 Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR).....	18
2.10 Controles endógenos.....	20
2.11 Utilización de animales en estudios de enfermedades humanas.....	21
3 OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo general.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
4.1 Muestras utilizadas.....	24
4.2 Extracción y retrotranscripción de ARN.....	24
4.3 Reacción en cadena de la Polimerasa y Visualización de los productos de PCR mediante electroforesis.....	25
4.4 Cuantificación de los niveles de expresión de los genes marcadores.....	28
5 RESULTADOS.....	30
5.1 Extracción y retrotranscripción de ARN.....	30
5.2 Reacción en cadena de la Polimerasa y Visualización de los productos de PCR mediante electroforesis.....	30
5.3 Cuantificación de los niveles de expresión de los genes marcadores.....	32
6 DISCUSIÓN.....	33
6.1 Extracción y retrotranscripción de ARN.....	33
6.2 Reacción en cadena de la Polimerasa y Visualización de los productos de PCR mediante electroforesis.....	33
6.3 Cuantificación de los niveles de expresión de los genes marcadores.....	36
7 CONCLUSIONES.....	40
8 RECOMENDACIONES.....	41
9 BIBLIOGRAFÍA.....	42
10 ANEXOS.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Núm.	Título	Pág.
1	Imprimadores utilizados en las reacciones de PCR para evaluar los distintos genes marcadores	14
2	Concentración de ARN determinada por espectrofotometría.	17

ÍNDICE DE FIGURAS

Núm.	Título	Pág.
1	Electroforesis en gel de agarosa al 2% para los productos de PCR obtenidos utilizando los imprimadores del gen cIAP mediante un gradiente térmico, en grados centígrados.	18
2	Electroforesis en gel de agarosa al 2% para los productos de PCR obtenidos utilizando los imprimadores de los genes cMET y Actina mediante un gradiente térmico, en grados centígrados.	18
3	Valores de RQ en escala lineal, para los genes de IAP y MET en las distintas muestras utilizadas, obtenidos de las pruebas de cuantificación de expresión génica mediante PCR en tiempo real.	19

ÍNDICE DE ANEXOS

Núm.	Título	Pág.
1	Protocolo de extracción de ARN totales provisto en el Kit de extracción NucleoSpin®L (Macherey-Nagel)	33
2	Protocolo de retrotranscripción provisto en el kit RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas)	36
3	Curva de disociación determinada por el programa StepOne™ Software en las pruebas de PCR en tiempo real.	38
4	Distribución de las muestras y marcadores en la placa de reacción en las pruebas de cuantificación de niveles de expresión por PCR en tiempo real.	39
5	Distribución de bandas y pesos moleculares de acuerdo al marcador de peso molecular MassRuler™ Low Range (Fermentas)	40
6	Distribución de bandas y pesos moleculares de acuerdo al marcador de peso molecular Lambda DNA/EcoRI + HindIII Marker, 3 (Fermentas)	41

1. INTRODUCCIÓN

El carcinoma hepatocelular (CHC) es la principal neoplasia maligna del hígado, cuya alta incidencia la ubica como el quinto tumor más frecuente en el mundo (Linares et al, 2004). Anualmente, cerca de un millón de muertes son generadas por este carcinoma, presentándose principalmente en personas portadoras de enfermedades hepáticas crónicas o con factores de riesgo como las infecciones crónicas por hepatitis B y C, la hemocromatosis hereditaria y el consumo elevado de alcohol (Quiñonez, 2009). En Costa Rica, el CHC representa el cuarto tipo de cáncer más frecuente en la población, generando el 10% del total de muertes por cáncer, con una mayor incidencia en los hombres (Moya, 2005).

A pesar de los avances en diferentes técnicas de diagnóstico utilizadas para el CHC, la baja efectividad de las mismas no contribuyen a que la incidencia de esta enfermedad disminuya y los tratamientos existentes únicamente son aplicables si el carcinoma es detectado en etapas tempranas. La patogénesis molecular de esta enfermedad se caracteriza por múltiples cambios genéticos y epigenéticos, por lo que la aplicación de las técnicas de biología molecular en su estudio podrían contribuir considerablemente en una mayor comprensión de la enfermedad y al desarrollo de mejores métodos diagnósticos y tratamientos (Buset *et al*, 2007).

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, ha surgido como una técnica confiable y de amplia utilidad para la investigación biológica, al permitir la identificación y cuantificación de ácidos nucleicos de manera exacta. Su importancia radica en la posibilidad de determinar rápidamente y de forma exacta cambios en la expresión génica, como respuesta a condiciones fisiológicas o patológicas. Esto, permite a su vez, una correlación con los eventos moleculares y un mejor entendimiento de los procesos biológicos (Lejona *et al*, 2006).

En diversos estudios, se ha demostrado como cambios en la expresión génica se encuentran asociados con el desarrollo de distintos tipos de cáncer (Porrás, 2005). Por esta razón, el estudio de los niveles de expresión de los genes involucrados en el desarrollo del cáncer hepatocelular podría tener un impacto positivo en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de esta enfermedad (Porrás, 2005; Soca *et al.*, 2007).

En el presente trabajo de investigación, se estudiaron los niveles de expresión de los genes *clAP* y *cMET* utilizando muestras con formaciones neoplásicas inducidas, muestras expuestas a un agente cancerígeno y posteriormente tratadas con un agente inhibidor de la carcinogénesis y muestras no afectadas, provenientes de tejido hepático del organismo *Rattus norvegicus*.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 El cáncer como una enfermedad genética

El cáncer se define como el conjunto de enfermedades genéticas que gradualmente conllevan a las células afectadas a la formación de neoplasmas, debido a un crecimiento celular descontrolado, de manera autosuficiente y resistente a los mecanismos de regulación celular (Zimonjic *et al.*, 2001). El término cáncer es aplicado a aquellas formaciones neoplasmáticas o tumores considerados malignos, los cuales debido a la proliferación celular sin control, invaden tejidos próximos a los que dieron origen y a su vez tienen la capacidad de diseminarse hacia otros órganos, mediante el proceso denominado metástasis (Fidler, 2002).

Estas alteraciones genéticas están relacionadas con tres clases de genes. La primera incluye a los oncogenes que corresponden a proto-oncogenes mutados, siendo estos últimos reguladores del ciclo y proliferación celular. Los genes supresores de tumores son una clase de genes involucrados en el crecimiento celular e iniciación de la apoptosis. Por último los genes reparadores del ADN que garantizan la integridad genómica (Soca *et al.*, 2007). Se han identificado al menos 30 genes supresores de tumores y más de 100 oncogenes (Soto & Sonnenschei, 2004).

Los oncogenes codifican proteínas con expresión alterada, favoreciendo el crecimiento celular y propiciando la invasividad tumoral. Este tipo de genes son de carácter dominante, por lo que una mutación en cualquiera de los dos alelos, es suficiente para la expresión de un fenotipo aberrante (Osborne *et al.*, 2004; Carlo & Croce, 2008). Los genes supresores de tumores, en cambio, expresan fenotipos anómalos cuando sus dos alelos se encuentran alterados, razón por la cual son considerados de carácter recesivo (Osborne *et al.*, 2004)

Los genes reparadores de ADN codifican proteínas cuya función es reparar errores en la fase S del ciclo celular y permitir que se lleve a cabo posteriormente la mitosis. Las mutaciones en este tipo de genes, pueden originar que la reparación de ADN se realice de manera defectuosa o que no se realice por completo, lo cual conlleva a que mutaciones subsecuentes se acumulen (Soto & Sonnenschei, 2004).

La participación de oncogenes y genes supresores de tumores en la patogénesis del cáncer, ha sido demostrada mediante la evaluación de sus efectos en diferentes estudios empleando modelos animales y cultivos celulares (Zimonjic *et al.*, 2001).

2.2 Cáncer de hígado y carcinoma hepatocelular (CHC)

El carcinoma hepatocelular (CHC) es la neoplasia más frecuente en el hígado y su incidencia se ha duplicado en los últimos 40 años (Bustíos *et al.*, 2009). Anualmente, se registran alrededor de un millón de personas fallecidas por este cáncer en todo el mundo, siendo la tercer neoplasia de mayor incidencia, que afecta principalmente el Sur de África y el Este Asiático donde se registran más del 80% de los casos (Bustíos *et al.*, 2009). El desarrollo de este carcinoma se ha asociado al consumo de bebidas alcohólicas, obesidad, diabetes, consumo de aflatoxinas, trastornos metabólicos y congénitos, Hepatitis B y Hepatitis C (Botero *et al.*, 2007).

En Costa Rica, el carcinoma hepatocelular representa el cuarto tipo de cáncer más frecuente en mujeres y el sexto en hombres. El mismo presenta un índice de mortalidad del 10% del total de neoplasias (Moya, 2005).

2.3 Diagnóstico y terapia del cáncer de hígado

Distintos métodos de diagnóstico y tratamiento del cáncer de hígado han sido propuestos, sin embargo, hasta la fecha ninguno ha resultado completamente efectivo. Las terapias existentes, como las cirugías, extirpación y trasplantes de hígado, únicamente son aplicables si el cáncer es diagnosticado en fases iniciales, donde todavía no hay una sintomatología asociada (Forner *et al.*, 2008). Los tratamientos tradicionales de quimioterapia y radioterapia no son capaces de eliminar todas las células malignas y pueden generar en el organismo efectos adversos (Vega *et al.*, 2005; Soca *et al.*, 2007). Por esta razón se ha incursionado en el desarrollo de nuevas terapias como la terapia genética, inhibición de las proteínas promotoras del crecimiento e inhibición de las quinasas dependientes de las ciclinas o cdk (Soca *et al.*, 2007).

La comprensión de la genética molecular involucrada en el cáncer podría tener efectos favorables sobre su diagnóstico, tratamiento y pronóstico (Soca *et al.*, 2007). Los análisis de expresión génicos son de fundamental importancia en la investigación biológica, ya que permiten la detección de diferencias en la forma que un gen o grupo de genes son expresados entre diferentes tejidos o estadios de una enfermedad. Estas diferencias en la expresión, pueden ser utilizadas para nuevos enfoques terapéuticos, y el desarrollo de nuevos tratamientos que minimicen los efectos de dicha enfermedad (Barber *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2006).

2.4 Genes en estudio y su relación con el cáncer

Se estima que, de los aproximadamente 35.000 genes que contiene el genoma humano, al menos 291 tienen alguna implicación en el desarrollo del cáncer (Van Lancker, 2006). En el caso del carcinoma hepatocelular, se han realizado diferentes estudios que sugieren la presencia de numerosas alteraciones genómicas en las células hepáticas que originan un fenotipo neoplásico y que a su vez, perpetúan y difunden esta neoplasia. (Tovar *et al.*, 2007)

2.5 Proto-oncogén *cMET*

El gen *cMET* es un proto-oncogén cuyo producto es una glicoproteína transmembrana con función tirosin-quinasa, la cual funciona como receptor de la superficie celular mediante el ligando la HGFR (receptor del factor de crecimiento de hepatocitos) (Anglada *et al.*, 2009; Giordano *et al.*, 2000). Este receptor está involucrado principalmente en la inhibición de la apoptosis, regeneración celular, promoción del crecimiento y la regulación de la disociación celular (Giordano *et al.*, 2000).

La sobre-expresión de este gen se encuentra asociada a diferentes neoplasias principalmente en carcinomas renales, los cuales se generan también por genes análogos como c-kit y RET (López *et al.*, 2008). Dicha sobre-expresión se da cuando *cMET* se encuentra mutado, ocasionando que el dominio tirosin-kinasa del ligando HGFR se encuentre activo de manera anormal y constante en la membrana celular, lo cual provoca un descontrol de la proliferación celular y a su vez invasión de tejidos o metástasis (Pulido *et al.*, 2007; Giordano *et al.*, 2000).

2.6 Proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP's)

Las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP's) son el resultado de un grupo de genes que se han conservado evolutivamente, encontrándose en diferentes especies de vertebrados e invertebrados (Tamm *et al.*, 2000). La expresión de estos genes inhibidores le permite a las células contar con mecanismos de protección ante la diversidad de estímulos que inducen la muerte celular (Hamanaka *et al.*, 2009). Aunque esta clase de genes ha sido estudiada principalmente en baculovirus, se han identificado diferentes genes inhibidores en mamíferos, tales como *nAIP*, *Survivina*, *Bruce*, *mLIAP*, *xIAP*, *clAP1* y *clAP2* (Sanna *et al.*, 2002).

El funcionamiento de los genes *clAP1* y *clAP2*, se ha relacionado con la regulación de la actividad de las caspasas 3, 7 y 9, las cuales poseen actividad apoptótica. Además, estos genes están asociados a diversas neoplasias en humanos incluyendo los carcinomas de ovario, hígado, pulmón y esófago, así como el carcinoma hepatocelular en ratones (Tamm *et al.*, 2000; Srinivasula & Ashwell, J. 2008; Hamanaka *et al.*, 2009). Sin embargo en estudios de sobre-expresión, se ha demostrado que los niveles de la proteína *clAP1* incrementan considerablemente en tejidos que presentan dicha condición tumoral, promoviendo a su vez la ubiquitinación de la proteína *clAP2* y su posterior degradación; Esto sugiere que son los niveles de *clAP1* en las células, los que promueven el desarrollo de tumores, al perder su capacidad reguladora en la apoptosis (Srinivasula & Ashwell, J. 2008).

2.7 Técnicas de biología molecular

Actualmente, las técnicas de la biología molecular proporcionan las herramientas necesarias para el estudio del desarrollo tumoral y tratar de determinar las razones, tanto genéticas como epigenéticas, involucradas en el cáncer (Bernard & Wittwer, 2002). La biología molecular ha permitido, en el estudio del cáncer, optimizar tratamientos, minimizar los efectos secundarios y prevenir su desarrollo a partir del estudio de los procesos biológicos que subyacen en la enfermedad (Bernard & Wittwer, 2002).

2.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es una técnica de la biología molecular de gran sensibilidad y especificidad, con capacidad de amplificar una secuencia específica de ADN exponencialmente, detectando concentraciones de ADN hasta de 1ng/μl (Morán *et al.*, 2000). La técnica consiste en la duplicación de secuencias de ácidos nucleicos mediante síntesis enzimática por la enzima Taq polimerasa, utilizando imprimadores específicos que delimitan la región de interés (Soto *et al.*, 1998).

Los productos obtenidos de la PCR pueden ser observados mediante el método de electroforesis, el cual consiste en la separación de biomoléculas de acuerdo a su tamaño a través de un soporte de agarosa o acrilamida, en presencia de un campo eléctrico, generando un patrón de bandas donde las moléculas de mayor tamaño se desplazarán más lentamente que las moléculas pequeñas. Dado que el ADN tiene carga negativa neta, la migración de este tipo de moléculas se realiza desde el cátodo hacia el ánodo, tomando en cuenta además de su carga eléctrica, el peso molecular y la estructura tridimensional (García, 2000).

2.9 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

Una de las variantes de la PCR convencional es la Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), la cual ha sido ampliamente utilizada para análisis de expresión génica. Esto debido a su alta sensibilidad, especificidad, bajo riesgo de contaminación, facilidad de ejecución, rapidez, cuantificación con alto rendimiento y obtención de perfiles de expresión con una alta precisión (Espy *et al.*, 2006; Gubern *et al.*, 2009).

Este método combina las variables de la PCR convencional con una prueba de detección de fluorescencia, la cual es emitida por un fluorocromo o sonda molecular que permanece unido a los productos amplificados, donde el aumento o disminución en la intensidad de la fluorescencia emitida es proporcional a la concentración de ADN obtenida en la reacción (Espy *et al.*, 2006). Uno de los fluorocromos utilizados es el SYBR Green el cual se intercala dentro de cualquier molécula de ADN doble banda, por lo que no es específico a los productos de interés.

Debido a que los ensayos con SYBR Green no son específicos, es necesario elaborar una curva de disociación con el fin de detectar la presencia de diferentes productos inespecíficos de amplificación. La detección de dichos productos está determinada por el porcentaje de Citocina-Guanina y la longitud de dichos productos (Costa, 2004; Espy *et al.*, 2006).

El desarrollo de una reacción de qPCR se puede visualizar en un gráfico de amplificación, el cual muestra como variables la fluorescencia obtenida por el termociclador en el eje Y y el número de ciclos de la PCR en el eje X. La curva de amplificación consta de una primera fase donde la producción de fluorescencia está por debajo del nivel de detección del termociclador, una segunda fase exponencial, en la que se incrementa la fluorescencia y se determina un valor umbral de detección para el ADN producto, y una tercera fase donde la reacción finaliza y la fluorescencia se estabiliza. El punto de intersección de una curva de amplificación con el umbral se denomina Ct. Este valor indica el ciclo en el que la fluorescencia alcanza el valor umbral (Vinueza, 2009).

Existen dentro de esta técnica dos métodos para cuantificación de niveles de expresión génica. La cuantificación absoluta, que permite determinar el número de copias de un transcrito por comparación de la señal emitida por los productos de PCR respecto a una curva estándar y la cuantificación relativa que describe el cambio relativo en la expresión de un gen de interés, respecto a un grupo de referencia o un gen definido como control endógeno. (Livak & Schmittgen, 2001).

El método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ o de CT comparativos es utilizado para la cuantificación de los cambios relativos en los niveles de expresión en experimentos de qPCR. Este método determina un valor de cuantificación relativa RQ (por siglas en inglés) por normalización de los valores de los CT obtenidos entre los genes de interés y una muestra de referencia, y la posterior comparación de dichos valores respecto un control endógeno (Livak & Schmittgen, 2001).

2.10 Controles endógenos

Los datos que se obtienen de los análisis de cuantificación relativa por medio de qPCR son normalizados mediante un control interno definido como control endógeno. Este control endógeno corresponde a un gen, por lo general del tipo “housekeeping”, cuyo ARNm debería expresarse de igual forma en todas las muestras bajo investigación, indistintamente del tipo de tejido, estadio de una enfermedad, tratamiento y condiciones experimentales (Gubern *et al.*, 2009).

Sin embargo, no ha sido descubierto un gen que funcione como control endógeno de manera ideal, debido a que la expresión génica es variable en cualquier condición celular que se estudie (Vandesompele *et al.*, 2002). A pesar de que existen estudios sobre la viabilidad de diferentes genes candidatos a ser utilizados como referencia de acuerdo al tipo de lesión o condiciones experimentales, ningún gen ha presentado una expresión constante sin importar las condiciones experimentales (Gubern *et al.*, 2009).

Si el gen de referencia escogido presenta diferencias en su expresión muy marcadas o se ve afectado por las condiciones experimentales o enfermedad en estudio, se induce a errores en la interpretación de los resultados y la imposibilidad de detectar cambios de expresión muy pequeños por la variabilidad que generan. La escogencia del mejor gen de referencia debe realizarse de acuerdo a cada tejido y características del experimento (Gubern *et al.*, 2009; Stamova *et al.*, 2009).

En una amplia variedad de experimentos se ha utilizado el gen de β -actina como gen de referencia (Dheda et al., 2005). La β -actina es una proteína citoplasmática que se encuentra expresada en la mayoría de las células eucarióticas, cuyas funciones están relacionadas con motilidad de las células, respuestas a señales extracelulares, control de la interacción célula-célula, transporte intracelular y cambios de forma de la célula durante el ciclo celular. La abundancia celular de β -actina es considerada constante y por esta razón ha sido utilizada como control endógeno (Guirado et al., 2002; Su et al., 2007).

2.11 Utilización de animales en estudios de enfermedades humanas

Los modelos animales han sido utilizados ampliamente en la investigación para estudiar diferentes enfermedades genéticas humanas. Asimismo, han sido utilizados para la producción de drogas o vacunas, la obtención de anticuerpos, células y órganos, procedimientos terapéuticos y de diagnóstico, así como la validación de nuevos dispositivos (Rodríguez, 2007).

El proceso de la carcinogénesis es un fenómeno complejo por lo que la utilización de modelos animales ha permitido avances significativos en la identificación de similitudes morfológicas y patológicas, entre tejidos de cáncer hepático de estos modelos animales y tejidos provenientes de biopsias humanas (Bannasch, et al 2003). En la actualidad, para la mayoría de órganos o sistemas del cuerpo humano que puedan desarrollar procesos carcinogénicos, existe un modelo animal asociado (Suggitt & Bibby, 2005).

El organismo *Rattus norvegicus* ha sido utilizado ampliamente como un modelo animal dada su fisiología, nutrición, inmunología, conducta, toxicología y desarrollo neoplásico (Dwinell *et al.*, 2008). Aproximadamente el 90% de los genes de este organismo son ortólogos a los del ser humano, razón por la cual se ha utilizado principalmente en la investigación en áreas relacionadas a la salud humana (Hancock, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar los niveles de expresión de los genes *cIAP* y *cMET* en tejidos de hígado de *Rattus norvegicus* con y sin neoplasia.

3.2 Objetivos específicos

1. Extraer y retrotranscribir ARN total de tejido hepático de *Rattus norvegicus* sin neoplasia, con neoplasia sin tratar y con neoplasia tratada con ácido retinoico.
2. Determinar la temperatura de alineamiento de los imprimadores de los genes *cIAP* y *cMET* utilizando gradientes térmicos por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
3. Cuantificar, mediante PCR en tiempo real, los niveles de expresión de los genes *cIAP* y *cMET* en tejido hepático de *Rattus norvegicus* sin neoplasia, con neoplasia sin tratar y con neoplasia tratada con ácido retinoico.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el laboratorio de biología molecular de la Escuela de Ciencias y Letras, en el Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede San Carlos, Alajuela, Costa Rica.

4.1 Muestras utilizadas

Se analizaron 6 muestras de hígados de *Rattus norvegicus* de las cuales 2 provenían de organismos sin neoplasia que no fueron sometidos a ningún modelo de hepatocarcinogénesis denominados individuos “sanos”. Dos de las muestras provenían de hígados de organismos sometidos a tratamientos con 2-AAF (2-acetilaminofluorano) como inductor de la carcinogénesis considerados como “afectados”. Los restantes dos hígados eran de organismos sometidos a tratamientos con ATRA (ácido retinoico todo trans) como potencial inhibidor de la carcinogénesis y posteriormente a tratamientos con 2-AAF como inductor de la carcinogénesis, llamados como individuos “tratados”.

Dichas muestras fueron proporcionadas por el Instituto Clodomiro Picado de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica. Las muestras fueron conservadas en nitrógeno líquido a -196 °C.

4.2 Extracción y retrotranscripción de ARN

Se utilizaron aproximadamente 100 mg de cada una de las muestras y estas fueron maceradas en presencia de nitrógeno líquido. Posteriormente a dichas muestras se les realizó una extracción de ARN total mediante el kit NucleoSpin®L (Macherey-Nagel) utilizando el protocolo proporcionado por el fabricante (Anexo 1).

Para evaluar la calidad de la extracción, se realizó una cuantificación de ácidos nucleicos mediante espectrofotometría utilizando el equipo Lambda 25 de PerkinElmer® y el software UV WinLab versión 2.85. Para ello se realizó una dilución de 12 µl de la muestra de ARN en 288 µl de agua destilada. La concentración final de ARN presente en la dilución fue calculada mediante la fórmula: $[ARN] \text{ ng}/\mu\text{l} = (\text{Absorbancia a } 260 \text{ nm}) \times (\text{Factor de dilución}) \times 40$. De acuerdo a la concentración obtenida, se calculó la cantidad de microlitros de muestra a utilizar en la retrotranscripción de las mismas, con el fin de homogenizar la concentración a 17 ng/µl.

La retrotranscripción de ácidos nucleicos se realizó utilizando el kit RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas) siguiendo los parámetros establecidos por el fabricante (Anexo 2).

4.3 Reacción en cadena de la Polimerasa y Visualización de los productos de PCR mediante electroforesis.

La determinación de la mejor temperatura de alineamiento para los imprimadores utilizados, se realizó mediante PCR en un gradiente térmico fijado a partir de los valores teóricos calculados. El cálculo de las temperaturas de alineamiento teóricos se realizaron mediante las fórmulas $(2(A+T) + 4(G+C))-5$ cuando la cantidad de nucleótidos es menor o igual a 20 y $(62,3+(0,41/\%G+C)-(500/PB))-5$ si la cantidad de nucleótidos es mayor a 20. Las variables A, T, G y C corresponden a la cantidad de nucleótidos de adenina, timina, guanina y citosina respectivamente y el valor de PB a la cantidad de nucleótidos del imprimador.

Para esto fueron consideradas las secuencias reportadas por el Instituto Clodomiro Picado de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica (tabla 1). Dichas secuencias fueron comparadas con el genoma de *Rattus norvegicus* utilizando el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990), con el fin de determinar el tamaño de los productos de PCR esperados.

Tabla 1. Imprimadores utilizados en las reacciones de PCR para evaluar los distintos genes marcadores.

Nombre	Secuencia	Tm °C	Tamaño del Producto (pb)*
P-actin-F	5'-TGTCACCAACTGGGACGATA-3 ⁽¹⁾	55	391
R-actin-R	5'-TCTCAGCTGTGGTGGTGAAG-3 ⁽¹⁾	57	
cIAP-F	5'-CCAGCCTGCCCTCAAACCCTCT-3 ⁽²⁾	60,6	501
cIAP-R	5'-GGGTCATCTCCGGTCCCAAC-3 ⁽²⁾	60,6	
cMet -F	5'-GAAAGCCAATGTGTCAGGAG-3 ⁽³⁾	55	301
cMet -R	5'-GAGTTTATCGTATTCCCAC-3 ⁽³⁾	49	

Fuente: ²Van der Hoeven *et al.*, 2003 ¹Batusic *et al.*, 2004 ³Daveau *et al.*, 2004
*Tamaños obtenidos de acuerdo al programa BLAST, disponible en www.ncbi.nlm.nih.gov

Para cada par de imprimadores se realizó un gradiente térmico donde el valor intermedio correspondía a la temperatura de alineamiento teórico calculado. Los imprimadores de *cIAP* fueron evaluados a las temperaturas de 53.7, 56.2, 59.1, 61.5 y 63.4 °C. Las temperaturas utilizadas para los imprimadores de *cMET* fueron 48.1, 50.2, 53.0 y 56.2 °C, así como las temperaturas de 53.0, 56.2 y 58.9 °C para los imprimadores de *Actina*.

Para la reacción de PCR se utilizó una mezcla de los siguientes reactivos: 5 µl de ADN (17 ng/µl); 2,5 µl de Buffer Taq 10x (NH₄)₂SO₄; 1,5 µl de MgCl₂ (25 mM), 2,5 µl de dNTP`s (2mM); 2,5 µl de cada imprimador, 0,4 µl de Taq Polimerasa (5u/µl) y 9,1 µl de H₂O libre de nucleasas. La mezcla de reacción utilizada fue la misma para cada par de imprimadores y la muestra utilizada en la evaluación del gradiente provenía de un individuo sano

El programa de PCR utilizado constó de un primer ciclo de desnaturalización de tres minutos treinta segundos a 94°C; cuarenta ciclos de: 30 s de desnaturalización a 94°C, 30 s de alineamiento según el gradiente calculado a partir de la t_m de cada imprimador (Tabla 1), 2 min y 30 s de extensión a 72°C; y un último ciclo de 5 min a 72°C. La amplificación se efectuó usando el termociclador modelo PTC-200 (Peltier Thermal Cycler) de MJ Research, Inc.

Los productos de PCR obtenidos de la evaluación de las distintas temperaturas de alineamiento fueron visualizados mediante Geles de agarosa al 2% en buffer TAE 1X (Tris 40mM, Acido acético 11.4% (v/v), y EDTA 1 mM) teñidos con 1,2 μ l de Bromuro de Etidio (10 mg/ml), utilizando cámaras de electroforesis BIO-RAD con capacidad para 20 pozos. A cada uno de los tubos de reacción que contenían los productos amplificados se les adicionó 5 μ l de solución de carga 6X (loading dye), cargando 25 μ l en cada uno de los pozos del gel.

La electroforesis se realizó por 90 minutos a 75 Voltios, 400 miliamperios, usando buffer TAE 1X y MassRuler™ Low Range (Fermentas) como marcador de peso molecular para el marcador de cIAP. Para los marcadores de *Actina* y *cMET* se utilizó el marcador de peso molecular Lambda DNA/EcoRI + HindIII Marker (Fermentas). Como fuente de poder se utilizó el equipo PowerPac Basic™ de BIO-RAD. La visualización del patrón de bandas obtenidos se llevó a cabo por transiluminación ultravioleta utilizando el equipo EDAS 290 de Kodak y el software Kodak 1D Image Analysis Software versión 3.5.

4.4 Cuantificación de los niveles de expresión de los genes marcadores

Los niveles de expresión de los genes *cMET* y *cIAP* fueron evaluados mediante PCR en tiempo real, en los distintos tratamientos. Para cada gen marcador, se realizó un duplicado de cada una de las muestras y de los controles negativos.

La técnica de PCR en tiempo real se realizó mediante el equipo StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) y el software StepOne™ Software versión 2.0. Como diseño experimental se utilizó la cuantificación relativa por el método de Ct Comparativos ($\Delta\Delta Ct$), utilizando una de las muestras “sanas” como referencia y el marcador de *Actina* como control endógeno. Para detectar las secuencias amplificadas se utilizó SYBR® Green (Fermentas). La distribución de las muestras y los marcadores en la placa de reacción, para la cuantificación de los niveles de expresión, se aprecia en el anexo 4.

La mezcla de reacción utilizada fue la misma para los distintos marcadores, variando únicamente los imprimadores utilizados en dicha mezcla. Dicha mezcla estuvo compuesta por 9 μl de ADN (9 ng/ μl); 12,5 μl Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), 2,5 μl de cada imprimador, y 5,5 μl de H₂O libre de nucleasas.

El programa de PCR utilizado constó de un primer ciclo de desnaturalización de 3 min y 30 s a 94°C; cuarenta ciclos de: 30 s de desnaturalización a 94°C, 30 s de alineamiento a 60°C c) 2 min y 30 s a

72°C; y un último ciclo correspondiente a la curva de disociación determinada por el software del equipo (Anexo 3).

5. RESULTADOS

5.1 Extracción y retrotranscripción de ARN

Los ácidos nucleicos obtenidos a partir de la extracción del tejido hepático, fueron cuantificados mediante espectrofotometría y llevados a la misma concentración descrita en materiales y métodos, para ser utilizados en la reacción de retrotranscripción. La concentración obtenida de cada una de las muestras se encuentra tabulada en la tabla 2.

Tabla 2. Concentración de ARN determinada por espectrofotometría.

Muestra	Concentración de ARN (ng/μl)
Sano 1	67.4
Sano 2	52
Afectado 1	17
Afectado 2	17.9
Tratado 1	26.1
Tratado 2	86.3

5.2 Reacción en cadena de la Polimerasa y visualización de los productos de PCR mediante electroforesis.

De la evaluación de los distintos imprimadores para los genes en estudio, se obtuvieron distintos gradientes térmicos definidos a partir de las temperaturas de alineamiento teóricas. La figura 1 muestra los productos de PCR obtenidos a partir del gradiente evaluado para los imprimadores de *cIAP*. Se observó un producto de aproximadamente 500 pb de acuerdo al marcador de peso molecular (Anexo 5). Se seleccionó la temperatura de 59.1 °C como temperatura a utilizar en las pruebas posteriores.

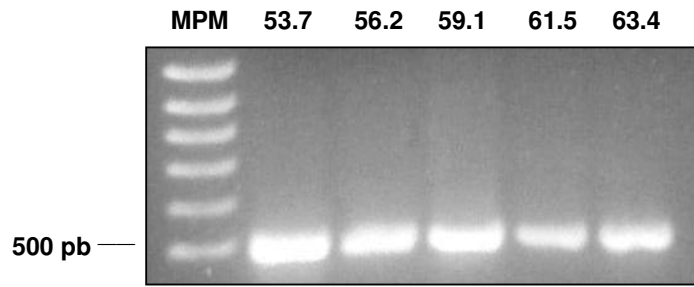


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% para los productos de PCR obtenidos utilizando los imprimadores del gen *cIAP* mediante un gradiente térmico, en grados centígrados.

Los productos de PCR obtenidos utilizando los imprimadores de los genes *cMET* y *Actina*, en los distintos gradientes, se visualizaron en un mismo gel (figura 2) utilizando como marcador de peso molecular *Lambda*. Para los imprimadores del gen *cMET* se seleccionó como temperatura para las pruebas 56.2 °C, mientras que para el marcador de *Actina* la temperatura de 58.9 °C. El tamaño de los productos obtenidos fue inferior a los 564 pb para ambos marcadores, de acuerdo al marcador de peso molecular utilizado (Anexo 6).

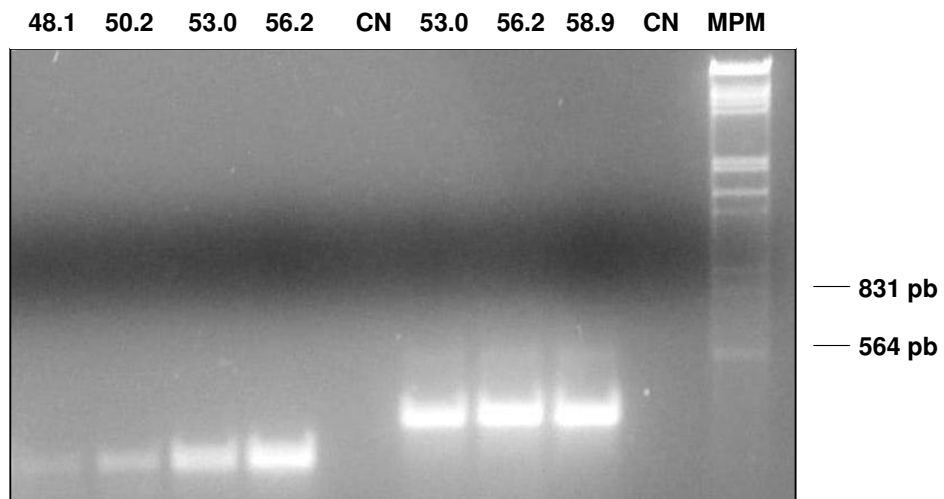


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% para los productos de PCR obtenidos utilizando los imprimadores de los genes *cMET* y *Actina* mediante un gradiente térmico, en grados centígrados.

5.3 Cuantificación de los niveles de expresión de los genes marcadores

A partir de los análisis de PCR en tiempo real para la cuantificación de los niveles de expresión génicos, se obtuvieron los valores de RQ correspondientes a cada uno de los genes en estudio. En las muestras denominadas “afectadas”, la expresión relativa tanto del gen *cIAP* como del gen *cMET*, fue menor a la expresión obtenida en las muestras “sanas”. Para el gen de *cIAP* el valor de RQ en las muestras “afectadas” fue de 0.042 mientras que para el marcador de *cMET* fue de 0.046

Los valores de RQ obtenidos para el gen de *cMET* en las muestras consideradas tratadas, presentó un aumento en relación con la expresión de este gen en las muestras sanas, con un valor de cuantificación de 3.096. De manera distinta, el marcador de *cIAP* presentó una disminución de su expresión en las muestras tratadas con un valor de RQ de 0.491 en relación con las muestras sanas. Los valores de cuantificación relativa obtenidos, se encuentran graficados en la figura 3.

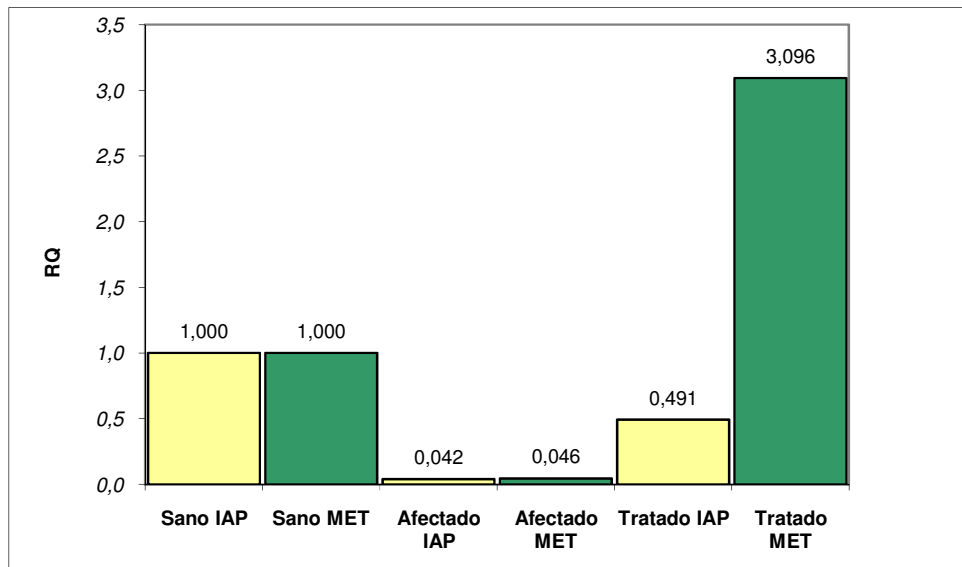


Figura 3. Valores de RQ en escala lineal, para los genes de *IAP* y *MET* en las distintas muestras utilizadas, obtenidos de las pruebas de cuantificación de expresión génica mediante PCR en tiempo real.

6. DISCUSIÓN

6.1 Extracción y retrotranscripción de ARN

El método de extracción de ARN empleado, mediante columnas de celulosa, permitió obtener una concentración de ARN suficiente para su posterior retrotranscripción. Esto considerando que de acuerdo al protocolo utilizado para la reacción de retrotranscripción, se requerían al menos 10 ng de ARN totales para llevar a cabo dicha reacción, siendo mayor la cantidad de ARN obtenida por microlitro, en todas las muestras en estudio. Esto garantiza además, que una vez que se obtengan los retrotranscritos, puedan ser utilizados en las reacciones de amplificación y de cuantificación. El éxito de las reacciones de PCR dependen en gran medida de la cantidad y calidad de la muestra analizadas, por lo que es fundamental la eficacia en los procesos de extracción de ácidos nucleicos (Cankar *et al.*, 2006)

6.2 Reacción en cadena de la Polimerasa y visualización de los productos de PCR mediante electroforesis.

Los productos obtenidos de la reacción de PCR de los distintos genes marcadores, mediante un gradiente térmico, fueron los esperados. Para el marcador del gen *cIAP* se observó una banda de aproximadamente 500 pb de acuerdo al marcador de peso molecular (figura 1). Este es semejante al tamaño de 501 pb obtenido al realizar el alineamiento de las secuencias de los imprimadores de este gen con la secuencia del cromosoma 8 de *Rattus norvegicus*, por lo que se evidencia que el fragmento obtenido es el esperado. Además, este resultado es comparable con los valores descritos por Deveraux y Reed (1999) para el tamaño del gen *cIAP*, con un tamaño de 604 pb.

Con respecto a la evaluación del gradiente térmico para los imprimadores de *cIAP*, no se observaron diferencias entre las bandas obtenidas en las cinco temperaturas utilizadas, por lo que se infiere que las temperaturas del ámbito entre los 53.7 y los 63.4 °C podrían utilizarse para la reacción de PCR. Sin embargo, es recomendable utilizar únicamente el gradiente entre las temperaturas de 59.1 y 63.4 °C, y en específico la temperatura de 59.1 °C, considerando que la T_m calculada de los imprimadores es de 60.6 °C. Esto con el fin de reducir al mínimo las uniones inespecíficas, obtener una mayor cantidad de producto de PCR y evitar la formación de dímeros (González, 2007).

Por su parte, la valoración del gradiente para el gen de *Actina* no mostró diferencias en las tres temperaturas evaluadas, ya que los productos de PCR obtenidos, al ser visualizados en el gel de agarosa, presentaron una intensidad semejante. No obstante, se recomienda utilizar una temperatura de alineamiento igual o mayor a 56.2°C, con el fin de obtener una mayor especificidad en la reacción, al ser esta la temperatura más cercana a la t_m calculada para ambos imprimadores.

En el caso de los productos obtenidos mediante los imprimadores de *cMET* (figura 2), la banda observada en la temperaturas de 56.2°C fue la más intensa. Para este marcador, las temperaturas de alineamiento de los imprimadores utilizados fueron de 55°C para el imprimador “forward” y 49°C para el imprimador “reverse”. Considerando dichas temperaturas, se esperaba que la banda de mayor intensidad se observara a una temperatura cercana a los 49 °C temperatura a la cual se garantiza la unión de los dos cebadores. Sin embargo, la banda de mayor intensidad se obtuvo 7 °C por encima de la temperatura esperada.

Berg y colaboradores (2008), consideran que si la diferencia entre las temperaturas de hibridación entre los imprimadores es mayor o igual a 5°C se podría generar una replicación diferente en cada una de las bandas del ADN de interés, debido a una mala hibridación de alguno de los imprimadores. Esto podría explicar las diferencias en la intensidad de las bandas obtenidas, y a su vez el por qué dichos imprimadores, aunque se hayan evaluado a una temperatura cercana a los 49°C, correspondiente al imprimador con la menor T_m, no produjeron una mayor cantidad de producto de PCR (Dieffenbach & Dveksler, 2003).

Para ambos marcadores, *Actina* y *cMET*, no fue posible determinar el tamaño de los fragmentos obtenidos de la reacción de PCR, debido a que las bandas obtenidas al visualizar los productos de PCR mediante electroforesis, fueron inferiores a la última banda del marcador de peso molecular utilizado. Sin embargo, considerando que el tamaño aproximado de los segmentos amplificados se estimó previamente mediante el alineamiento de los imprimadores, no se descarta que los productos obtenidos sean los esperados.

Las secuencias de los imprimadores de *Actina* utilizados, fueron obtenidas de la metodología descrita por Batusic y colaboradores (2004), los cuales describen un producto de PCR de 391 pb. Esto coincide con el tamaño obtenido del alineamiento realizado con las secuencia genómica de *Rattus norvegicus*. Los imprimadores empleados en la amplificación del marcador de *cMET*, fueron obtenidos de la metodología de Daveau y colaboradores (2004) los cuales mencionan un producto de reacción de 301 pb, lo cual concuerda con el tamaño del fragmento obtenido del alineamiento realizado de dichos imprimadores con la secuencia de interés.

La banda obtenida de la amplificación de *cMET* (figura 2), al ser observada mediante electroforesis, se desplazó una mayor distancia que la banda generada por el gen de *Actina*. Esto demuestra que el tamaño del producto de *cMET* es menor que el obtenido para *Actina* y este a su vez es menor que la última banda visible del marcador de peso molecular de aproximadamente 564 pb, sugiriendo a su vez que los productos observados son los esperados (García, 2000).

6.3 Cuantificación de los niveles de expresión de los genes marcadores

La menor expresión obtenida para el gen *cIAP* en muestras “afectadas” con respecto a la “sana” no coincide con lo descrito por diversos autores. Yan y colaboradores (2004), Lu y colaboradores (2005) y Augello y colaboradores (2009) mencionan una elevada sobreexpresión de este gen en tejidos que presentan hepatocarcinoma celular y carcinomas renales, respecto a tejidos que no presentaban dichas enfermedades. Además, se ha descrito que la sobreexpresión de las proteínas *cIAP* son las responsables del desarrollo de carcinomas (Srinivasula & Ashwell, J. 2008), por lo que los resultados obtenidos no reflejan esta condición.

Vinueza (2009) sugiere que esto puede ser ocasionado por la carga de una menor cantidad de muestra en los pozos de este gen y el uso de concentraciones muy bajas de los imprimadores de *cIAP* por un error en el cálculo de su concentración o al momento de preparar alícuotas. Además, se considera una posible degradación de la muestra o una baja concentración de la mezcla de reacción utilizada (Vinueza, 2009).

Para este mismo gen, la expresión obtenida en muestras “tratadas” con respecto a la muestra “sana” y la muestra “afectada” no coinciden con lo esperado teóricamente. A pesar de que tanto las muestras denominadas afectadas como las tratadas fueran sometidas a un proceso de inducción de carcinogénesis mediante 2-acetilaminofluoreno, como inductor celular para formar hepatocitos alterados o nódulos pretumorales (Fragoso *et al.*, 2002), posteriormente las muestras tratadas fueron sometidas a un tratamiento utilizando ácido retinoico. Moreno y colaboradores (2007) describen que el ácido retinoico promueve una inactivación de los procesos de carcinogénesis en las etapas de promoción y desarrollo, al reducir el área afectada. Considerando esto, se deduce que los valores esperados deberían reflejar una menor expresión en las muestras provenientes de individuos sanos respecto a los tratados y estos a su vez una expresión menor que las muestras denominadas afectadas.

La cuantificación realizada para el gen *cMET* presentó una disminución de su expresión respecto a la condición de tejido sano. Sin embargo, en tejidos que presentan el desarrollo de carcinomas, se ha demostrado que este gen se encuentra sobreexpresado, en contradicción con los resultados obtenidos (López *et al.*, 2008). Esto pudo haberse originado por los mismos factores citados para el gen *cIAP*.

Fujita y Sugano (1997), describen que la sobreexpresión del gen *cMET* está asociado al desarrollo del cáncer colorrectal y su posterior metástasis al hígado, donde en ambos órganos su expresión es progresivamente mayor según el desarrollo del cáncer. De igual manera se ha demostrado dicha condición de sobreexpresión para el gen *cMET* en el desarrollo del cáncer gástrico (Amemiya *et al.*, 2002).

El incremento en la expresión del gen *cMET* en las muestras tratadas mostró un valor de expresión relativa de 3.096, lo que demuestra un incremento en la expresión de dicho gen en relación con la muestra “sana”. Sin embargo, este valor también excede el valor de RQ obtenido para la expresión de este mismo en la condición de tejido afectado. Este resultado no era el esperado, debido a que la sobreexpresión de *cMET* se encuentra asociado al desarrollo neoplásico, por tanto se esperaba un valor de expresión relativa mayor en la muestras denominadas afectadas en relación con las muestras tratadas, considerando además, que a estas últimas se les aplicó un tratamiento con ácido retinoico, con el fin de atenuar el proceso carcinogénico (López *et al.*, 2008; Moreno *et al.*, 2007)

Estas diferencias en los valores obtenidos de la cuantificación de los niveles de expresión, tanto del gen *cIAP* como de *cMET*, pueden deberse al uso de *Actina* como control endógeno. Autores como Guirado y colaboradores (2002), así como Su y colaboradores (2007) validan el uso del gen de β -*actina* considerando que su expresión se mantiene constante, indistintamente del tejido en el que se encuentre. Sin embargo, en otros estudios se ha demostrado que su uso puede ser inapropiado, ya que no presenta una expresión homogénea entre las diferentes muestras, siendo estas de un mismo tejido, por lo que la normalización de los valores respecto a dicho control endógeno y su posterior comparación con la muestra de referencia se realiza de manera errónea (Dheda *et al.*, 2005).

Chang y colaboradores consideran inadecuado el uso del gen de β -*Actina* como control endógeno en estudios de carcinoma hepatocelular, debido a que este gen y sus isoformas, disminuyen su expresión para dar lugar a

un grupo denominado *K-Actina* en tejidos que presentan esta enfermedad.

Debido a la cantidad de muestras utilizadas, no fue posible el análisis estadístico de los datos que permitieran determinar si los valores obtenidos y las diferencias entre estos presentan diferencias significativas. Por esta razón se recomienda aumentar el número de muestras empleadas en las distintas condiciones, así como el número de repeticiones utilizadas para cada gen marcador y una determinada muestra. La cantidad de muestras utilizadas fue reducida debido a que la cantidad de reactivos disponibles, para las pruebas de cuantificación de los niveles de expresión, eran considerablemente limitados.

7. CONCLUSIONES

- El método de extracción de ARN totales mediante columnas de celulosa, permitió la obtención de una cantidad suficiente de ARN para su posterior retrotranscripción y análisis mediante PCR y PCR en tiempo real.
- Los tamaños de los productos obtenidos mediante PCR para los distintos genes marcadores, fueron los esperados.
- Los genes *cIAP* y *cMET* presentaron una expresión menor en las muestras denominadas afectadas respecto a las muestras consideradas sanas y tratadas.
- La cantidad de muestras y de repeticiones que fueron utilizadas no son las suficientes para realizar análisis estadísticos.

8. RECOMENDACIONES

- Rediseñar al menos uno de los imprimadores de *cMET*, debido a la diferencia en las temperaturas de hibridación del imprimador “forward” respecto al imprimador “reverse”.
- Aumentar el número de muestras, así como el número de repeticiones utilizadas en los pruebas de cuantificación de niveles de expresión génicos.
- Establecer un modelo estadístico acorde al diseño experimental, con el fin de poder analizar posteriormente los datos obtenidos.
- Considerar realizar la cuantificación de los niveles de expresión de manera absoluta y no de manera relativa, mediante el método de curva estándar, en sustitución del método de CT comparativos.
- Realizar pruebas con distintos genes de referencia y las muestras en estudio, con el fin de determinar si alguno de ellos puede ser un mejor control endógeno que la *Actina*.

9. BIBLIOGRAFIA

- ALTSCHUL, S., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E., LIPMAN, D. 1990. Basic local alignment search tool. *Revista Journal of Molecular Biology.*, 215(3):403-410.
- AMEMIYA, H., KONO, K., ITAKURA, J., TANG, R., TAKAHASHI, A., AN, F., KAMEI, S., IIZUKA, H., FUJII, H., MATSUMOTO, Y. 2002. C-Met expression in gastric cancer with liver metastasis. *Revista Oncology.* 63(3):286-296
- ANGLADA, F., CAMPOS, P., PRIETO, R., CARAZO, J., REGUEIRO, J., VELA, F., REQUENA, M. 2009. Nuevos patrones epidemiológicos y factores de riesgo en cáncer renal. *Revista Actas Urológicas Españolas.* 33(5): 459-467.
- AUGELLO, C., CARUSO, L., MAGGIONI, M., DONADON, M., MONTORSI, M., SANTAMBROGIO, R., TORZILLI, R., VAIRA, V., PELLEGRINI, C., RONCALLI, M., COGGI, G., BOSARI, S. 2009. Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) expression and their prognostic significance in hepatocellular carcinoma. *Revista BioMed Central Cancer.* 9:125
- BANNASCH, P. HAERTEL, T. SU, Q. 2003. Significance of Hepatic Preneoplasia in Risk Identification and Early Detection of Neoplasia. *Revista Toxicologic Pathology* 31(1): 134-139.
- BARBER, R., HARMER, D., COLEMAN, R., CLARK, B. 2005. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Revista Physiological Genomics* 21(3): 389–395.
- BATUSIC, D., ARMBRUST, T., SAILE, B., RAMADORI, G. 2004. Induction of Mx-2 in rat liver by toxic injury. *Revista Journal of Hepatology.* 40(3): 446-453.
- BERG, J., STRYER, L., TYMOCZKO, J. 2008. *Biochemistry.* Trad. por José M. Macarulla. España, Reverté. 1026p.
- BERNARD, P., WITTEWER, C. 2002. Real-Time PCR Technology for Cancer Diagnostics. *Revista Clinical Chemistry.* 48(8): 1178-1185
- BOTERO, A., LONDOÑO, M., NAVAS, M. 2007. Epidemiología y factores de riesgo de carcinoma hepatocelular. *Revista Facultad de Medicina. Universidad de Antioquia.* 20(1): 64-73.

- BUSET, N., TORRES, T., BORDÓN, E., LARA, P. 2007. Aplicaciones de biología molecular en oncología clínica (II). Revista electronica de formación en oncología. (4)
- BUSTÍOS, C., DÍAZ, J., ROMÁN, R., DÁVALOS, M., ZUMAETA, E., 2009. Características Clínico- Epidemiológicas del Carcinoma Hepatocelular y su tratamiento en el departamento del aparato digestivo. Revista de Gastroenterología del Perú. 29(1): 17-23.
- CANKAR, K., STEBIH, D., DREO, T., ZEL, J., GRUDEN, K. 2006. Critical points of DNA quantification by real-time PCR - effects of DNA extraction method and simple matrix on quantification of genetically modified organisms. Revista BMC Biotechnology. 6(1):37
- CARLO, M., CROCE, M. 2008. Oncogenes and Cáncer. Revista New England Journal of Medicine. 358(5): 502-511.
- CHANG, K.W., YANG, P.Y., LAI, H.Y., YEH, T.S., CHEN, T.C., YEH, C.T. 2006. Identification of a novel actin isoform in hepatocellular carcinoma. Revista Hepatology Research. 36(1): 33-39
- COSTA, J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Revista Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 22(5): 299-305.
- DAVEAU, M., BENARD, M., SCOTTE, M., SCHOUFT, M., HIRON, M., FRANCOIS, A., SALIER, J., FONTAINE, M., 2004. Expression of a Functional C5a Receptor in Regenerating Hepatocytes and Its Involvement in a Proliferative Signaling Pathway in Rat. Revista Journal of Immunology. 173(5): 3418-3424.
- DEVERAUX, Q., REED, J. 1999. IAP family proteins – suppressors of apoptosis. Revista Genes & Development. 13: 239-252
- DHEDA, K., HUGGETT, J., CHANG, J., KIM, L., BUSTIN, S., JOHNSON, M., ROOK, G., ZUMLA, A. 2005. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization Revista Analytical Biochemistry. 344 (1): 141–143.
- DIEFFENBACH, C., DVEKSLER G. 2003. PCR Primer: A Laboratory Manual. Estados Unidos, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 505p.

- DWINELL, M., WORTHEY, E., SHIMOYAMA, M., GUNGOR, B., DEPONS, J., LAULEDERKIND, S., LOWRY, T., NIGRAM, R., PETRI, V., SMITH, J., STODDARD, A., TWIGGER, S, JACOB, H. 2008. The Rat Genome Database 2009: variation, ontologies and pathways. *Revista Nucleic Acids Research*. 37: 744-749.
- ESPY, M., UHL, J., SLOAN, L., BUCKWALTER, S., JONES, M., VETTER, E., YAO, J., WENGENACK, N., ROSENBLATT, J., COCKERILL, F., SMITH, F. 2006. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Revista CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*. 19(1): 165-256.
- FARRELL, R. 2005. RNA Methodologies. A Laboratory Guide for Isolation and Characterization. Estados Unidos, California. Academic Press. p. 170
- FIDLER, I. 2002. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Revista Nature Reviews Cancer*. 3(6):453-458
- FORNER, A., RODRÍGUEZ, C., REIG, M., RIMOLA, J., VARELA, M. 2008. Diagnóstico precoz del cáncer primario de hígado: imagen versus genética. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 100(7): 423-429.
- FRAGOSO, L., RODRÍGUEZ, A., CADENA, T., JIMÉNEZ, S., REYES, J. 2002. Cuantificación del ADN y análisis del ciclo celular en un modelo de hepatocarcinogénesis. *Revista Oncology*. 4(8):443-454.
- FUJITA, S., SUGANO, K. 1997. Expression of c-met Proto-oncogene in Primary Colorectal Cancer and Liver Metastases. *Revista Japanese Journal of Clinical Oncology*. 27(6): 378-383
- GARCÍA, A., LÓPEZ, Y., RIAÑO, N. 2006. Aplicación de una técnica de cromatografía de exclusión molecular para la purificación de adn en plantas de *Coffea sp*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*. 59(2): 3499-3507
- GARCÍA, H. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Revista Universo Diagnostico*. 1(2): 31-41.
- GIORDANO, S., MAFFE, A., WILLIAMS, T., ARTIGIANI, S., GUAL, P., BARDELLI, A., BASILICO, C., MICHIELI, P., COMOGLIO, P. 2000. Different point mutations in the met oncogene elicit distinct biological properties. *Revista The FASEB Journal* 14(2): 399-406.

- GONZÁLEZ, E. 2007. Papel de las caveolas/caveolina-1 en la fisiología del adipocito. Tesis Ph.D Barcelona, España. Universidad de Barcelona. 90p.
- GUBERN, C., HURTADO, O., RODRÍGUEZ, R., MORALES, J., ROMERA, V., MORO, M., LIZASOAIN, I., SERENA, J., MALLOLAS, J. 2009. Validation of housekeeping genes for quantitative real-time PCR in in-vivo and in-vitro models of cerebral ischaemia. *Revista BMC Molecular biology*. 10(57).
- GUIRADO, O., SOLANAS, M., COSTA, I., ESCRICH, E. 2002. El citoesqueleto de actina: una perspectiva desde la biología molecular del cáncer. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 21(2): 115-122.
- HAMANAKA, R., BOBROVNIKOVA, E., JI, X., LIEBHABER, S., DIEHL, A. 2009. PERK-dependent regulation of IAP translation during ER stress. *Revista Oncogene*. 28(6): 910–920.
- HANCOCK, J. 2004. A bigger mouse? The rat genome unveiled. *Revista BioEssays*. 26(10): 1039–1042.
- HERNANDEZ, R., SANGRO, B., PRIETO, J. 2006. Gene therapy of liver cancer. *Revista World Journal of Gastroenterology*. 12(38): 6085-6097.
- LEJONA, S., SILVINA, M., FAY, F., FAY, O. 2006. Avances en el Diagnóstico Molecular: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. *Anuario fundación Dr. J. R. Villavicencio*. (14): 33 – 37
- LINARES, A., RODRIGUEZ, M., RODRIGO, L. 2004. Algoritmo diagnóstico y terapéutico del carcinoma hepatocelular. *Revista Oncología*. 27(4):95-101
- LIVAK, K. & SCHMITTGEN, T. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $-2^{\Delta\Delta CT}$ Method. *Revista Methods*. 25: 402-408.
- LÓPEZ, J., RUIZ, M., MAGI, C. 2008. Carcinomas renales con papilas. *Revista Española de Patología*. 41(2): 99-107.
- LU, X., LEE, M., TRAN, T., BLOCK, T. 2005. High level expression of apoptosis inhibitor in hepatoma cell line expressing Hepatitis B virus. *Revista International Journal of Medical Sciences*. 2(1): 30-35

- MORÁN, M., ACEVES, D., PEÑA, P., GALLEGOS, M., FLORES, S., MONTOYA, H., FIGUERA, L., VILLA, L., SÁNCHEZ, J. Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en una población seleccionada del noroccidente de México. 2000. *Revista Panameña de Salud Publica*. 7(6): 389-394.
- MORENO, F., TOLEDO, L., DE CONTI, A., HEIDOR, R., JORDÃO, A., VANNUCCHI, H., TESTONI, M., PRATES, T. (2007). Lutein presents suppressing but not blocking chemopreventive activity during diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis and this involves inhibition of DNA damage. *Revista Chemico-Biological Interactions*. 168(3): 221-228.
- MOYA, L. 2005. Variaciones Cronologicas y Geograficas del Cancer del Sistema Genitourinario en Costa Rica. *Caja Costarricense del Seguro Social. Serie Estadísticas de Cancer*. (1): 1-43.
- OSBORNE, C., WILSON, P., TRIPATHY, D. 2004. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potential Diagnostic and Therapeutic Applications. *Revista The Oncologist*. 9(4): 361-377.
- PORRAS, J. 2005. Componentes Principales Supervisados para Clasificación de Datos de Expresión Genética. Tesis Mba. Mayagüez, Puerto Rico. Universidad de Puerto Rico. 115p
- PULIDO, G., CENTENO, M., REY, M., NARBÓN, S. 2007. Biología molecular del carcinoma de células claras renales: Principios para un tratamiento selectivo. *Revista Actas Urologicas Españolas*. 31(3): 233-243.
- QUIÑONEZ, E. 2009. Trasplante hepático en carcinomas hepatocelulares que exceden los criterios de Milán. *Revista Acta Gastroenterológica Latinoamericana* 39(4):291-295
- RODRÍGUEZ, E., 2007. Ética de la Investigación en Modelos Animales de Enfermedades Humanas. *Revista Acta Bioethica*. 13 (1): 25-40.
- SANNA, M., CORREIA, J., DUCREY, O., LEE, J., NOMOTO, K., SCHRANTZ, N., DEVERAUX, Q., ULEVITCH, R. 2002. IAP Suppression of Apoptosis Involves Distinct Mechanisms: the TAK1/JNK1 Signaling Cascade and Caspase Inhibition. *Revista Molecular and Cellular Biology*. 22(6): 1754-1766.
- SOCA, P., ALMAGUER, A., DE LEÓN, D., SALES, H., PÉREZ, H. 2007. El cáncer una enfermedad genética. *Revista Correo Científico Médico de Holguín*. 11(3)

- SOTO, A. & SONNENSCHAI, C. 2004. The somatic mutation theory of cancer: growing problems with the paradigm?. *Revista BioEssays*. 26(10): 1097–1107.
- SOTO, Y., MUNÉ, M., GOICOLEA, M., MORALES, E., SANTOYO, J., VALDÉS, O., RAMÍREZ, R., PIMENTEL, T. 1998 Aplicación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para la detección de secuencias de Papillomavirus humano. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 50(3): 191-198
- SRINIVASULA, S., ASHWELL, J. 2008. IAPs: What's in a name? *Revista Molecular Cell*. 30(2): 123–135.
- STAMOVA, S., APPERSON, M., WALKER, W., TIAN, Y., XU, H., ADAMCZY, P., ZHAN, X., LIU, D., ANDER, B., LIAO, I., GREGG, J., TURNER, R., JICKLING, G., LIT, L., SHARP, F. 2009. Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies in human peripheral blood. *Revista BMC Molecular biology*. 2(49).
- SU, Y., KONDRIKOV, D., BLOCK, E. 2007. β -Actin: A Regulator of NOS-3. *Revista Science*. 2007(404): 52-57.
- SUGGITT, M. BIBBY, M. 2005. 50 Years of Preclinical Anticancer Drug Screening: Empirical to Target-Driven Approches. *Revista Clinical Cancer Research*. 11(3): 971-981.
- TAMM, I., KORNBLAU, S., SEGALL, H., KRAJEWSKI, S., WELSH, K., KITADA, S., SCUDIERO, D., TUDOR, D., QUI, Y., MONKS, A., ANDREEFF, M., REED, J. 2000. Expression and Prognostic Significance of IAP-Family Genes in Human Cancers and Myeloid Leukemias. *Revista Clinical Cancer Research*. 6(5): 1796-1803.
- TOVAR, V., VILLANUEVA, A., LLOVET, J. *Biología celular y genética en el cáncer de hígado. Revista Gastroenterología y hepatología*. 30(6):360-369.
- VAN DER HOEVEN, J., MOSHAGE, H., SCHUURS, T., NIJBOER, M., VAN SCHILFGAARDE, R., PLOEG, R., 2003. Brain death induces apoptosis in donor liver of the rat. *Revista Transplantation*. 76(8): 1150-1154.
- VAN LANCKER, J. 2006. Apoptosis, genomic integrity, and cancer. *Estados Unidos, Los Angeles. Jones & Bartlett Publishers*. p. 396.

- VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE A., SPELEMAN, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Revista Genome Biology*. 3(7)
- VEGA, I., GRAEF, A., GARCÍA, J., ORNELAS, M. 2005. Nuevas modalidades de imagen: PET-CT. *Revista Medica Sur*. 12(1): 11-25.
- VINUEZA, C. 2009. PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. *Revista electrónica de Veterinaria*. 10(2).
- YAN, Y., MAHOTKA, C., HEIKAUS, S., SHIBATA, T., WETHKAMP, N., LIEBMANN, J., SUSCHEK, C., GUO, Y., GABBERT, H., GERHARZ, C., RAMP, U. 2004. Disturbed balance of expression between XIAP and Smac/DIABLO during tumour progression in renal cell carcinomas. *Revista British Journal of Cancer*. 91:1349-1357.
- ZIMONJIC, D.; BROOKS, M.; POPESCU, N.; WEINBERG, R.; HAHN, W. 2001. Derivation of Human Tumor Cells in Vitro without Widespread Genomic Instability. *Revista Cancer Research*. 61(9): 8838-8844.

10. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ARN totales provisto en el Kit de extracción NucleoSpin®L (Macherey-Nagel)

NucleoSpin® RNA L

5.6 Total RNA purification from cultured cells and tissue with NucleoSpin® RNA L

Before starting the preparation:

- Check if Wash Buffer RA3 and rDNase were prepared according to section 3.

1 Homogenize sample

Disrupt up to **100 mg** of **tissue** (for homogenization methods see section 2.3).

Up to **4 x 10⁷** eukaryotic **cultured cells** are collected by centrifugation and lysed by addition of Buffer RA1 directly.

To choose an appropriate amount of starting material see section 2.2.



Disrupt sample

2 Lyse cells

Add **1.8 ml Buffer RA1** and **18 µl β-mercaptoethanol (β-ME)** to the disrupted material in a 15 ml centrifuge tube (not supplied) and vortex vigorously.

For appropriate sample and lysis buffer amounts see section 2.2.

Note: As alternative to β-ME the reducing agent DTT or TCEP may be used. Use a final concentration of 10-20 mM DTT or TCEP within the Lysis Buffer RA1.



+ 1.8 ml RA1
+ 18 µl β-ME

3 Filtrate lysate

Apply the lysate to a **NucleoSpin® Filter L** placed in a Collection Tube and centrifuge sample for **10 min** at **4,500 x g**. This step will homogenize the sample by removal of residual insoluble material and simultaneous reduction of lysate viscosity.

In case of visible pellet formation (depending on sample amount and nature) transfer supernatant without any formed pellet to a new 15 ml centrifuge tube (not supplied).

If working with small amounts of cultured cells (e. g. <1 x 10⁷ HeLa cells) step 3 may be substituted by vigorous mixing of the sample.



4,500 x g
10 min

4 Adjust RNA binding conditions

Discard the NucleoSpin® Filter L and add **1.8 ml ethanol (70%)** to the lysate in the Collection Tube and mix by vortexing 2 x 5 s (use 3.6 ml of 70% ethanol if working with large sample amounts, see step 2).

After addition of ethanol a stringy precipitate may become visible which will not affect the further procedure. Resuspend precipitates thoroughly before loading onto the NucleoSpin® RNA L Column.



**+ 1.8 ml
70% ethanol**
Mix

5 Bind DNA

Load the lysate-ethanol mixture (maximal 3.8 ml) onto a NucleoSpin® RNA L Column. Centrifuge for **3 min** at **4,500 x g**.

If working with large sample amounts, apply the rest of the lysate-ethanol mixture (max. 3.8 ml) onto the column and centrifuge again.

If the lysate has not passed through the column, centrifuge again at 4,500 x g for 10 min.

In case of column-overloading incomplete flow-through of the sample might be observed, e.g. the membrane is still wet or some lysate has not passed through. Remove the lysate, which has not passed through the column, and continue with the next protocol step. Use less starting material and carefully remove insoluble material in step 3 next time.



**Load max.
3.8 ml lysate**



**4,500 x g
3 min**

6 Desalt silica membrane

Add **2.2 ml MDB** (Membrane Desalting Buffer) to the NucleoSpin® RNA L Column. Centrifuge for **3 min** at **4,500 x g**. Discard flow-through.

If the silica membrane is not completely dry after centrifugation, centrifuge again at 4,500 x g for 10 min. This step will create optimal reaction conditions for the rDNase.



+ 2.2 ml MDB

7 Digest DNA

Prepare DNase reaction mixture: in a sterile microcentrifuge tube mix **235 µl Reaction Buffer for rDNase** and **25 µl reconstituted rDNase** (see section 3) per NucleoSpin® RNA L Column. Mix thoroughly but gently.

Digest with rDNase

Apply **250 µl DNase reaction mixture** directly onto the center of the silica membrane. Incubate at **room temperature** for **15 min**.



+ 250 µl
rDNase
reaction
mixture

RT
15 min

8 Wash and dry silica membrane**1st wash**

Add **2.6 ml Buffer RA2** to the NucleoSpin® RNA L Column. Incubate at room temperature for 2 min. Centrifuge for **3 min** at **4,500 x g**. Discard flow-through and place the column back into the Collection Tube.

Buffer RA2 will inactivate the rDNase.

2nd wash

Add **2.6 ml Buffer RA3** to the NucleoSpin® RNA L Column. Centrifuge for **3 min** at **4,500 x g**.

The flow-through has not to be discarded in this step. Leave the NucleoSpin® RNA L Column in the Collection Tube.

3rd wash

Add **2.6 ml Buffer RA3** to the NucleoSpin® RNA L Column. Centrifuge for **5 min** at **4,500 x g** to dry the membrane completely. Place the column into a fresh Collection Tube (15 ml, supplied).



+ 2.6 ml RA2

4,500 x g
3 min

+ 2.6 ml RA3

4,500 x g
3 min

+ 2.6 ml RA3

4,500 x g
5 min

9 Elute DNA highly pure RNA

Pipette **500 µl RNase-free H₂O** (supplied) directly onto the center of the silica membrane. Incubate at **room temperature** for **2 min** and centrifuge for **3 min** at **4,500 x g**.

Reduction of elution volume will generally not result in an increased concentration of eluted nucleic acid with the NucleoSpin® RNA L kit (see section 2.4 for alternative elution procedures).



+ 500 µl
RNase-free
H₂O

RT
2 min

4,500 x g
3 min

Anexo 2. Protocolo de retrotranscripción provisto en el kit RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas)

PROTOCOLS

Please read the Notes section of the manual (p.3-5) before starting.

RT-PCR

I. First Strand cDNA Synthesis

After thawing, mix and briefly centrifuge the components of the kit. Store on ice.

- ❶ Add the following reagents into a sterile, nuclease-free tube on ice in the indicated order:

Template RNA	total RNA or poly(A) mRNA or specific RNA	10 ng - 5 µg 1 ng - 0.5 µg 0.01 pg - 0.5 µg
Primer	oligo (dT) ₁₈ primer or random hexamer primer or gene-specific primer	1 µl 1 µl 15-20 pmol
DEPC-treated water		to 12 µl
Total volume		12 µl

- ❷ **Optional.** If the RNA template is GC-rich or contains secondary structures, mix gently, centrifuge briefly and incubate at 65°C for 5 min. Chill on ice, spin down and place the vial back on ice.

- ❸ Add the following components in the indicated order:

5X reaction buffer	4 µl	
RiboLock™ RNase Inhibitor (20 u/µl)	1 µl	
10 mM dNTP mix	2 µl	
RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/µl)	1 µl	
Total volume		20 µl

- ❹ Mix gently and centrifuge.
- ❺ For oligo(dT)₁₈ or gene-specific primed cDNA synthesis, incubate for 60 min at 42°C. For random hexamer primed synthesis, incubate for 5 min at 25°C followed by 60 min at 42°C.
Note. For GC-rich RNA templates, the reaction temperature can be increased up to 45°C.
- ❻ Terminate the reaction by heating at 70°C for 5 min.

The reverse transcription reaction product can be directly used in PCR applications or stored at -20°C for less than one week. For longer storage, -70°C is recommended.

II. PCR Amplification of First Strand cDNA

The product of the first strand cDNA synthesis can be used directly in PCR or qPCR. The volume of first strand cDNA synthesis reaction mixture should not comprise more than 1/10 of the total PCR reaction volume. Normally, 2 µl of the first strand cDNA synthesis reaction mixture is used as template for subsequent PCR in 50 µl total volume. Taq DNA polymerase, PCR Master Mix (2X) or PyroStart™ Fast PCR Master Mix (2X) can be used to amplify fragments less than 3 kb. DreamTaq™ DNA polymerase is suitable for amplification of longer fragments up to 6 kb. The Long PCR Enzyme Mix and High Fidelity PCR Enzyme Mix are recommended to generate amplicons up to 20 kb. See related products on p.11 for ordering information.

CONTROL REACTIONS

Positive and negative control reactions should be used to verify the results of the first strand cDNA synthesis steps.

- **Reverse transcriptase minus (RT-) negative control** is important in RT-PCR or qRT-PCR reactions to assess for genomic DNA contamination of the RNA sample. The control RT- reaction contains every reagent for the reverse transcription reaction except for the RT enzyme.
- **No template negative control (NTC)** is important to assess for reagent contamination. The NTC reaction contains every reagent for the reverse transcription reaction except for RNA template.
- **Positive control** RNA template and gene-specific primers are supplied with the kit. The human GAPDH control RNA (1.3 kb) was produced by *in vitro* transcription. The GAPDH-specific control PCR primers are designed to be complementary to human, mouse and rat GAPDH genes and generate 496 bp RT-PCR product. The protocol for the positive control RT-PCR is provided below.

I. Positive control first strand cDNA synthesis reaction

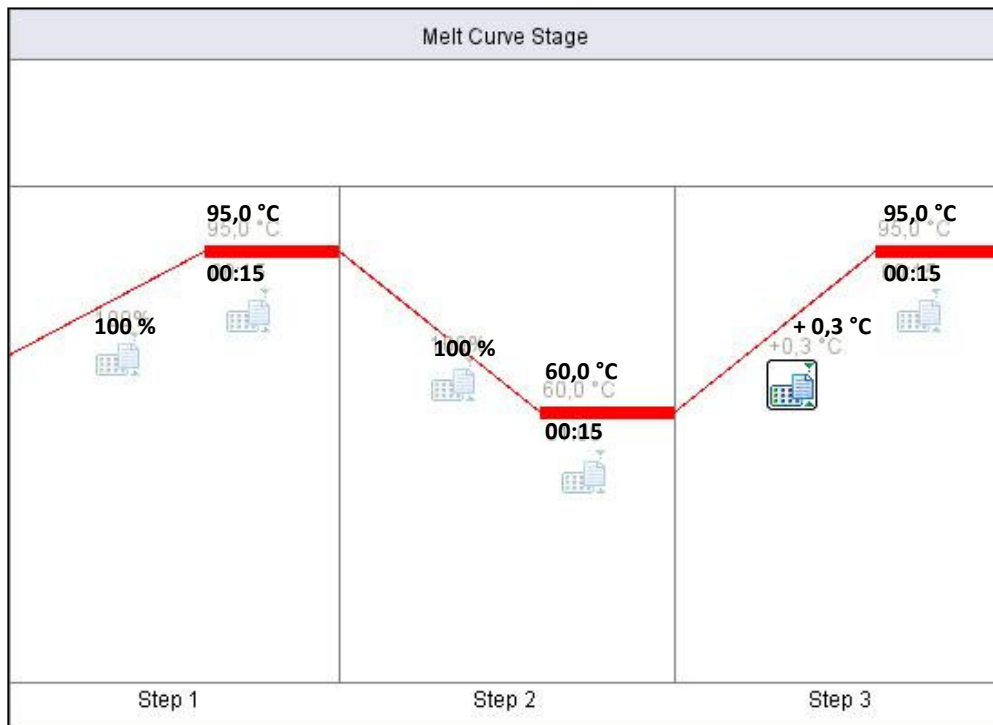
Mix and briefly centrifuge all components after thawing, keep on ice.

- 1 Add the following reagents into a sterile, nuclease-free tube on ice in the indicated order:

Control GAPDH RNA (50 ng/μl)	2 μl
Oligo (dT) ₁₈ primer <i>or</i> Random hexamer primer <i>or</i> Reverse GAPDH primer	1 μl
5X reaction buffer	4 μl
RiboLock™ RNase Inhibitor (20 u/μl)	1 μl
10 mM dNTP mix	2 μl
RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/μl)	1 μl
DEPC-treated water	9 μl
Total volume	20 μl

- 2 Mix gently and centrifuge.
- 3 For oligo(dT)₁₈ or gene-specific primed cDNA synthesis, incubate for 60 min at 42°C.
For random hexamer primed synthesis, incubate for 5 min at 25°C followed by 60 min at 42°C.
- 4 Terminate the reaction by heating at 70°C for 5 min.

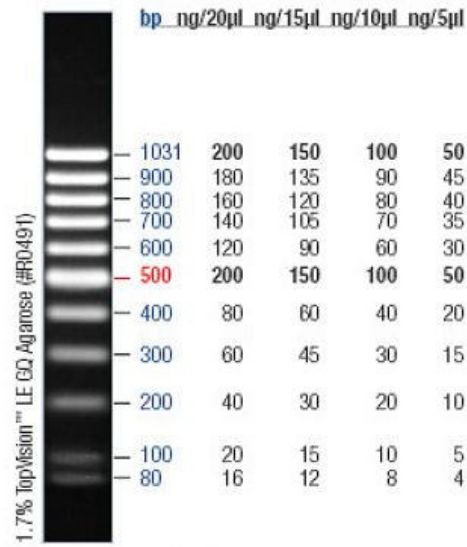
Anexo 3. Curva de disociación determinada por el programa StepOne™ Software en las pruebas de PCR en tiempo real.



Anexo 4. Distribución de las muestras y marcadores en la placa de reacción en las pruebas de cuantificación de niveles de expresión por PCR en tiempo real.

	1	2	3	4	5	6	7
A	Normal1 U Actina	Normal1 U Actina	Cancer1 U Actina	Cancer2 U Actina	Tratada1 U Actina	Tratada2 U Actina	N Actina
B	Normal1 U Actina	Normal1 U Actina	Cancer1 U Actina	Cancer2 U Actina	Tratada1 U Actina	Tratada2 U Actina	N Actina
C	Normal1 U IAP	Normal1 U IAP	Cancer1 U IAP	Cancer2 U IAP	Tratada1 U IAP	Tratada2 U IAP	N IAP
D	Normal1 U IAP	Normal1 U IAP	Cancer1 U IAP	Cancer2 U IAP	Tratada1 U IAP	Tratada2 U IAP	N IAP
E	Normal1 U MET	Normal1 U MET	Cancer1 U MET	Cancer2 U MET	Tratada1 U MET	Tratada2 U MET	N MET
F	Normal1 U MET	Normal1 U MET	Cancer1 U MET	Cancer2 U MET	Tratada1 U MET	Tratada2 U MET	N MET

Anexo 5. Distribución de bandas y pesos moleculares de acuerdo al marcador de peso molecular MassRuler™ Low Range (Fermentas)



10µl/lane, 8cm length gel,
1X TBE, 5V/cm, 1.5h

Range

11 fragments (in bp): 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80.

Anexo 6. Distribución de bandas y pesos moleculares de acuerdo al marcador de peso molecular Lambda DNA/EcoRI + HindIII Marker, 3 (Fermentas)

