

EFFECTO DE LOS PROTOCOLOS DE PROCESAMIENTO SOBRE LA CALIDAD Y
CANTIDAD DE RNA EN PLASMA MATERNO

Liz Ariane González Roperó

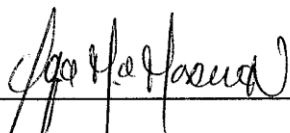


PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGIA
CARRERA DE BACTERIOLOGIA
BOGOTA D.C.

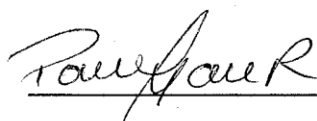
2012

EFFECTO DE LOS PROTOCOLOS DE PROCESAMIENTO SOBRE LA CALIDAD Y
CANTIDAD DE RNA EN PLASMA MATERNO

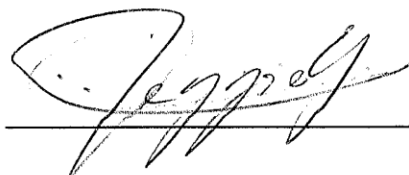
Liz Ariane González Roperó



Olga María Moreno, Biol, MSc
JURADO



Paola Andrea Ayala R, Bac MSc
DIRECTORA



Reggie Garcia Robles, MD, PhD
ASESOR CIENTIFICO

Artículo 23 de la Resolución No 13 de Julio de 1946.

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

A dios por darme la vida, y una familia que me apoyo
Incondicionalmente, y se esmeró por darme esta oportunidad
A mi novio por su paciencia en este proceso y gran apoyo, y todas aquellas
Personas que con una palabra de aliento y fortaleza, me ayudaron a hacer este
sueño realidad.

Tabla de contenido

1. Resumen	7
2. Introducción	8
3. Justificación del problema.....	9
4. Marco teórico	9
5. Metodología.....	¡Error! Marcador no definido.
6. Resultados	19
7. Discusión	17
8. Conclusiones	26
9. Recomendaciones	27
10. Bibliografía.....	¡Error! Marcador no definido.
11. Anexos.....	31

RESUMEN

Hoy en día el diagnóstico prenatal requiere de muestras de células fetales obtenidas por vías invasivas, como amniocentesis y toma de muestras de vellosidad corionica. Estos procedimientos invasivos representan un riesgo para la madre y el feto. Para evitar este riesgo potencial, se han desarrollado métodos alternativos para el diagnóstico prenatal. Estudios previos han encontrado ácidos nucleicos libres en el plasma de mujeres embarazadas. Este último proveniente de células trofoblasticas debido al tráfico celular entre el feto y la madre. Estos ácidos nucleicos pueden permitir una alternativa segura y precisa de métodos de diagnóstico no invasivo. El objetivo de este estudio fue determinar factores que afectan la calidad y cantidad del ARN en muestras de plasma de mujeres embarazadas antes de la semana 20 de gestación. Se recolectaron 33 muestras (n= 17) a mujeres gestantes. A cada gestante se le tomaron dos tubos de sangre con EDTA, se dividieron las muestras en grupos con unas características de protocolos diferentes. Uno de ellos fue almacenar las muestras a 4°C y -20°C, con y sin trizol la extracción del ARN se hizo en diferentes tiempos, se cuantificó por espectrofotometría en ARN total obtenido y 24 horas después de este procedimiento se realizó PCR en tiempo real (qRT-PCR) para amplificar los genes *hPL* (*Lactogeno placentario humano*) y *GAPDH* (*gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa*). Los resultados de este estudio mostraron que la variable que afecta las concentraciones de ARN es la temperatura; se logró evidenciar en este estudio que los niveles más altos que se obtuvieron en la cuantificación por espectrofotometría fueron las muestras almacenadas a 4°C mostrando diferencias estadísticamente significativas y que por el contrario las variables de almacenamiento como el trizol y el tiempo, no afectaron la concentración de ARN cuantificado. No se logró amplificar hPL y GAPDH posiblemente por la baja concentración de estos genes y la química utilizada.

INTRODUCCIÓN.

Hoy en día el diagnóstico prenatal requiere de muestras de células fetales obtenidas por vías invasivas, como amniocentesis y toma de muestras de vello cordón. Estos procedimientos invasivos representan un riesgo para la madre y el feto. Para evitar este riesgo potencial, se han desarrollado métodos de genética para el diagnóstico prenatal(1). En los últimos años se han logrado grandes avances en este campo. Los estudios se han encaminado en detectar ADN y ARN del feto en el plasma materno, además la utilización de la técnica de PCR en tiempo real (qRT-PCR) ha permitido detectar niveles muy bajos de estas moléculas(2).

El análisis de ácidos nucleicos en sangre materna permite identificar secuencias de ADN fetal; se puede determinar el sexo fetal, el Rh fetal en madres Rh negativas, mutaciones génicas autosómicas dominantes de origen paterno o *de novo*, y mutaciones de patologías recesivas en las que la mutación paterna es diferente de la materna, como por ejemplo en algunas parejas en riesgo de fibrosis quística(3).

Debido a que muchas veces no es posible determinar el origen del ADN encontrado en el plasma de mujeres embarazadas y se puede confundir con el ADN materno, se planteó la posibilidad de aislar el ARN de origen feto-placentario en el plasma materno y así determinar la expresión de genes específicos de la placenta(1).

Estos ácidos nucleicos fetales pueden ser objeto de estudio y contribuir a un diagnóstico temprano, para muchas complicaciones características de placenta y embarazo, como por ejemplo la preeclampsia(4); de ahí la importancia de estudiar la estabilidad de este ARN presente en plasma materno y optimizar las condiciones, para maximizar el rendimiento de ácidos nucleicos fetal libres en plasma materno que son cruciales para análisis y aplicación de diferentes pruebas(5).

El objetivo de este estudio se basa en determinar factores que afectan la calidad y cantidad del ARN en muestras de plasma de mujeres embarazadas antes de la semana 20 de gestación.

JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Se ha reportado en la literatura, que las mujeres gestantes cuentan con niveles de ARN de origen fetoplacentario en plasma materno; este hallazgo ha permitido realizar estudios encaminados a desarrollar investigaciones estratégicas para monitorear el estado fetal sin tener que recurrir a métodos invasivos, adicionalmente también se ha propuesto la medición de estas moléculas para un posible diagnóstico prenatal no invasivo de patologías obstétricas como preeclampsia, restricción de crecimiento intrauterino, placenta previa y de patologías fetales como trisomias y otras enfermedades genéticas. La calidad del ARN es un requisito indispensable para estudios de tipo molecular. Factores como transporte, temperatura, almacenamiento deben ser óptimos para garantizar el máximo rendimiento de este. Para este tipo de estudios la exploración de los factores que influyen en el rendimiento del ARN fetal a partir de muestras de sangre materna podrían ser la temperatura de almacenamiento, el intervalo de procesamiento de la muestra y aditivos con los que se almacenará la muestra(5).

Los datos obtenidos en este estudio, serán empleados en el proyecto: **estudio de marcadores tempranos para la detección y pronóstico de preeclampsia**; ya que es de vital importancia antes de iniciar a manipular las muestras de plasma de mujeres embarazadas y la respectiva extracción del ARN, tener la certeza de realizar los protocolos correctos para obtener el material de la mejor calidad y cantidad posible.

Es muy poca la bibliografía reportada acerca de la correcta manipulación de este tipo de muestras y el debido manejo para el ARN, por lo que hace que este estudio experimental sea muy importante y necesario no solo para este proyecto, si no para futuros proyectos que se vayan a desarrollar con este tipo de muestras.

MARCO TEÓRICO

Ácidos nucleicos en plasma

A raíz del descubrimiento del paso de células fetales a la sangre materna, se comenzó a estudiar si además de células también se podía aislar material genético libre en plasma materno. En 1948 se publicó la primera evidencia de ácidos nucleicos en plasma y orina.

Otros investigadores encontraron estas moléculas plasmáticas en pacientes con lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoidea y cáncer(6). Todavía se desconoce el mecanismo por el cual estos ácidos nucleicos son liberados al suero y plasma(1). En 1997 *Lo et al.* reportaron la presencia de ADN en el plasma de mujeres embarazadas(3). Este hallazgo abrió un camino muy importante sobre el estudio del posible monitoreo fetoplacentario con procedimientos no invasivos. Adicionalmente se reportó la presencia de este ADN décadas después del embarazo, lo que sugiere que hay un mecanismo que lo protege de la degradación(7). Se ha demostrado que este ADN puede ser detectado desde la quinta semana de embarazo, lo que lo haría útil en diagnóstico de patologías fetales mucho antes de que puedan ser detectadas por ultrasonido o posterior al nacimiento(8). Debido a que muchas veces no es posible determinar el origen del ADN encontrado en el plasma de mujeres embarazadas y se puede confundir con el ADN materno, se planteó el interrogante si se podría aislar ARN de origen feto-placentario en el plasma materno y así determinar la expresión de genes específicos de la placenta(1).

En el año 2000, se detectó por primera vez la presencia de ARNm fetal libre en plasma de mujeres embarazadas con fetos masculinos, amplificando una secuencia específica del cromosoma Y (ZFY) en plasma materno(9). Estos niveles de ARNm fetal, inmediatamente después del parto se desaparecen. En el 2003 *Ng et al* estudiaron el ARNm de hPL, BhCG (gonadotropina corionica humana) y GAPDH, de plasma de mujeres embarazadas, demostrando que al pasar el ARNm por un filtro de 0,45µm, la cantidad de muestra disminuía notoriamente, en comparación con otros filtros utilizados lo que los llevo a la conclusión que estas partículas de ARNm encontradas en plasma materno pueden estar envueltas en partículas subcelulares que son las que le brindan la estabilidad(2). En el 2007 *Maron et al.* estudiaron la extracción de ARN fetal, de sangre total y de plasma, de mujeres embarazadas y lograron concluir, que la identificación de genes placentarios son fácilmente detectables en plasma materno(10). Se presume que esta aparente estabilidad de genes placentarios, en ARNm fetal extraído de plasma puede ser proporcionada, por las micropartículas que envuelven a este ARN fetal.

Utilidad del estudio de ARN en patologías del embarazo.

Se han reportado diferencias en los niveles de ARN fetal en plasma materno en complicaciones del embarazo como placenta previa, preeclampsia y embarazo ectópico.

Se logró encontrar que los niveles de ARNm de los genes β hCG y hPL disminuyeron y aumentaron, respectivamente, en pacientes con placenta previa(11). Estudiaron la expresión del gen de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en mujeres con preeclampsia en el tercer trimestre. Se encontró que la expresión de CRH se encontraba disminuida en mujeres con preeclampsia comparado con los controles(12). Adicionalmente, se han estudiado los genes involucrados en la coagulación activador de plasminógeno tisular (tPA) y PAI-1, y se encontró que su expresión está significativamente incrementada en pacientes con preeclampsia(13).

Adicionalmente, se estudiaron, 12 mujeres con embarazo ectópico y 13 mujeres con embarazo intrauterino como control. En Las pacientes con embarazo ectópico, disminuyeron significativamente los niveles 6 y 8 veces menos respectivamente de hPL y hCG en plasma materno comparado con los controles. Con este estudio se pudo concluir, que el ARNm placentario en la circulación materna se encuentra notablemente en menor número de copias en patologías como embarazo ectópico(14).

Utilidad del estudio de ARN en enfermedades fetales.

En cuanto a patologías estudiadas con muestras de ARN, que afectan directamente al feto se encuentran las aneuploidias y restricción del crecimiento intrauterino.

La aneuploidia a la que más se le han realizado estudios es a trisomía 21, se estudió el gen *LOC90625* el cual se encuentra en el cromosoma 21 y se detecta en un 100% en plasma en el primer trimestre, por lo tanto puede ser utilizado como marcador para diagnóstico prenatal de síndrome de Down(15). Ng *et al*, se planteó la hipótesis si las concentraciones de ARNm en plasma podrían ser un marcador para trisomías. Realizaron un estudio en donde se evaluaron los niveles de ARNm de la β hCG en mujeres con fetos con trisomía 18 y 21 durante el primer trimestre del embarazo. Los resultados mostraron que había diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de ARNm en plasma de mujeres con trisomía 18 y las de los controles, con concentraciones 9,4 veces menores en mujeres con fetos con trisomía 18 (15). Por lo tanto, las concentraciones de ARNm varían en algunas patologías y podrían servir como marcadores para un diagnóstico prenatal no invasivo o inclusive como factores predictores de la ocurrencia y severidad de enfermedades del embarazo(1). En la tabla 1

se muestran algunos estudios con ARNm en plasma materno en patologías fetales y obstétricas.

Posteriormente se han venido realizando estudios, de genes involucrados en el desarrollo anormal del corazón y se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los niveles encontrados en plasma de mujeres con fetos diagnosticados con cardiopatías congénitas comparados con fetos saludables(16).

Se ha reportado que la concentración de ARNm de la hormona del crecimiento (GH2) se correlaciona de manera estadísticamente significativa con el peso al nacer y las medidas biométricas fetales. Además, la concentración de ARNm de ADAM12 se encontró aumentada en gestantes con RCIU (restricción del embarazo intrauterino) y preeclampsia con diferencias estadísticamente significativas comparado con las pacientes normales(17).

Un estudio realizado en Colombia por Ayala *et al*, lograron detectar ARNm de hPL, de origen fetoplacentario en el tercer trimestre del embarazo. Los datos demuestran que estos genes pueden ser utilizados como perfil de expresión génica en placenta, analizando el plasma materno, y su presencia es probable que sea una alarma fisiopatología de enfermedades tales como la preeclampsia y RCIU.

Estabilidad de los ácidos nucleicos en plasma

El descubrimiento de ácidos nucleicos fetales en circulación plasmática materna ha abierto nuevas posibilidades para el diagnóstico prenatal no invasivo(2) Esto indica que la placenta es un órgano importante para liberar ARN fetal en plasma materno. Se han reportado resultados prometedores en la evaluación de la función placentaria y como marcadores predictores y de severidad en complicaciones del embarazo(1). Se ha logrado demostrar que las moléculas de ARN de plasma endógeno son altamente estables a 4 °C por 24 horas en comparación con ARN tisular extraído y purificado(18). Al estudiar este ARN se encontró que era mucho más estable de lo que se pensaba. Luego Ng *et al* demostraron que esas moléculas de ARN de plasma de pacientes con cáncer estaban asociadas con cuerpos apoptóticos que podrían protegerlo de la degradación de las RNAsas(19).

Tabla 1. Estudios que reportan el uso de ARNm circulante derivado de la placenta para estudio de aneuploidias y complicaciones del embarazo

ESTUDIO	EDAD DE GESTACIÓN (semanas)	GENES ESTUDIADOS	ENFERMEDAD ESTUDIADA	TÉCNICA	RESULTADO
ANEUPLOIDÍAS					
Tsui et al. 2010	Media: 12,9	PLAC4	Trisomía 21	Espectrometría de masas y PCR ^a digital	Sensibilidad diagnóstica del 100% y especificidad diagnóstica del 89,7%
Arcelli et al. 2010.	Rango: 20-22	Genes involucrados en desarrollo anormal del corazón	Cardiopatías congénitas	Microarray y QRT-PCR	Sensibilidad diagnóstica del 42% y especificidad diagnóstica del 95%. Con una tasa de falsos positivos del 10%
Tsui et al. 2009	Media: 15	SERPINE2	Trisomía 18	Espectrometría de masas	Detección de trisomía 18 en todos los casos
Lo et al. 2007	Media: 14,7	PLAC4	Trisomía 21	Espectrometría de masas	Sensibilidad diagnóstica del 90% y especificidad diagnóstica del 96,5%
Ng et al. 2004	Media 12,5	βhCG	Trisomía 18 y 21	QRT-PCR	Niveles más bajos en trisomía 18, con diferencias estadísticamente significativas
Oudejans et al. 2003	Rango: 9-13	LOC30625, PTTG1IP, DSCR4	Trisomía 21	RT-PCR ^b Secuenciación	Detección LOC30625 en 100% de las muestras utilizando 1.600µl de plasma
PATOLOGÍAS DEL EMBARAZO					
Pang et al. 2005	Rango: 16-40	CSH1, GH2, KISS1, and ADAM12	RCIU	QRT-PCR	GH2 correlacionado con peso al nacimiento y medidas biométricas y ADAM12 con gestantes con RCIU y preeclampsia.
Ayala et al. 2012	Rango: 31-42	hPL	RCIU	QRT-PCR	mRNA de hPL de origen fetoplacentaria se detectó en el plasma de todas las gestantes en el tercer trimestre del embarazo.
Masuzaki et al. 2005	37 ^c	βhCG, hPL, GAPDH	Placenta previa-percreta	QRT-PCR	Marcadores sensibles para monitorear apoptosis en la placenta y anomalías en la invasión del trofoblasto
Purwosunu et al. 2009	Rango: 15-20	Panel de mRNAs	Preeclampsia	QRT-PCR	Incremento de los niveles de FLT1, VEGFA, endoglin, PLAT, SERPINE1, PLAC1, y SELP son buenos predictores de la ocurrencia de preeclampsia
Shimizu et al. 2009	Rango 15-20	PP13	Preeclampsia	QRT-PCR	Buen marcador para predecir preeclampsia
Purwosunu et al. 2007	Media: 39	PAI-1 y tPA	Preeclampsia	QRT-PCR	Los niveles de PAI-1 y tPA se encuentran aumentados con diferencias estadísticamente significativas
Farina et al. 2006	Media: 32	Panel de RNAm	Preeclampsia	QRT-PCR	Diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles
Ng et al. 2003	Media: 37	CRH	Preeclampsia	QRT-PCR	CRH buen marcador de preeclampsia con diferencias estadísticamente significativas
Takacs P. 2012	Rango 4-7	hPL,βhCG	Embarazo ectópico	QRT-PCR	Las pacientes con embarazo ectópico, disminuyeron significativamente los niveles 6 y 8 veces menos respectivamente de hPL y hCG en plasma materno comparado con los controles.
^a Reacción en cadena de la polimerasa. ^b PCR en tiempo real. ^c Se tomaron muestras antes y después de las cirugías que se realizaron en la semana 37 y 75 días después					

Modificado de Ayala-Ramírez et al., 2012

Lactógeno placentario humano (hPL)

Una de las hormonas más importantes en el embarazo es el Lactogeno Placentario Humano (hPL). Esta es una proteína de síntesis exclusiva de la placenta producida por el trofoblasto. Modifica el metabolismo de la madre durante el embarazo para facilitar el Suministro de energía al feto(20) . Algunas de sus funciones son:

1. Lipólisis materna con incremento de ácidos grasos circulantes. Este proceso es una Fuente importante de energía para el metabolismo materno y la nutrición fetal. Estudios *in vitro* sugieren que el hPL inhibe la secreción de leptina en trofoblastos a Término.
2. Tiene acción anti-insulinémica o “diabetogénica” que incrementa los niveles maternos de glucosa. Esto favorece la síntesis de proteínas y provee una fuente disponible de aminoácidos para el feto.
3. Es una potente hormona angiogénica que desempeña un papel importante en la formación de la vasculatura fetal(20).

Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)

Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es una enzima de 37kDa, que se encarga de catalizar la conversión de gliceraldehído 3-fosfato como el nombre lo indica. Este es el sexto paso de la descomposición de la glucosa (glucólisis), una importante vía de suministro de energía y de carbono en una molécula situada en el citosol de las células eucariotas, se une a proteínas de transporte de membrana, las proteínas G-, nucleótidos poli-, adeninas, lípidos, hidratos de carbono específicos seleccionados, proteínas del citoesqueleto, proteínas nucleares de importación y exportación, diversas, ATPasas chaperones moleculares y otras moléculas.

La alta expresión de ARNm del gen constitutivo *GAPDH* en tejidos humanos, permite que sus niveles sean comparativos y se puedan utilizar como un gen housekeeping en la mayoría de patologías estudiadas(21).

OBJETIVOS

Objetivo General

- Determinar factores que afectan la calidad y cantidad del ARN en muestras de plasma de mujeres embarazadas antes de la semana 20 de gestación.

Objetivos Específicos

- Identificar en que intervalo de tiempo, entre toma de muestra y manipulación, se obtiene ARN en mayor cantidad y calidad, determinado por cuantificación por espectrofotometría y la técnica PCR en tiempo real.
- Medir factores como temperatura, condiciones de almacenamiento y analizar mediante cuantificación por espectrofotometría y PCR en tiempo real, el impacto que tienen sobre la calidad y cantidad del ARN.

METODOLOGÍA

1. Diseño de investigación

Estudio experimental descriptivo

2. Criterios de inclusión

Se incluyeron mujeres embarazadas antes de la semana 20 de gestación, que acepten su participación en el estudio y que firmaron el consentimiento informado.

3. Criterios de exclusión

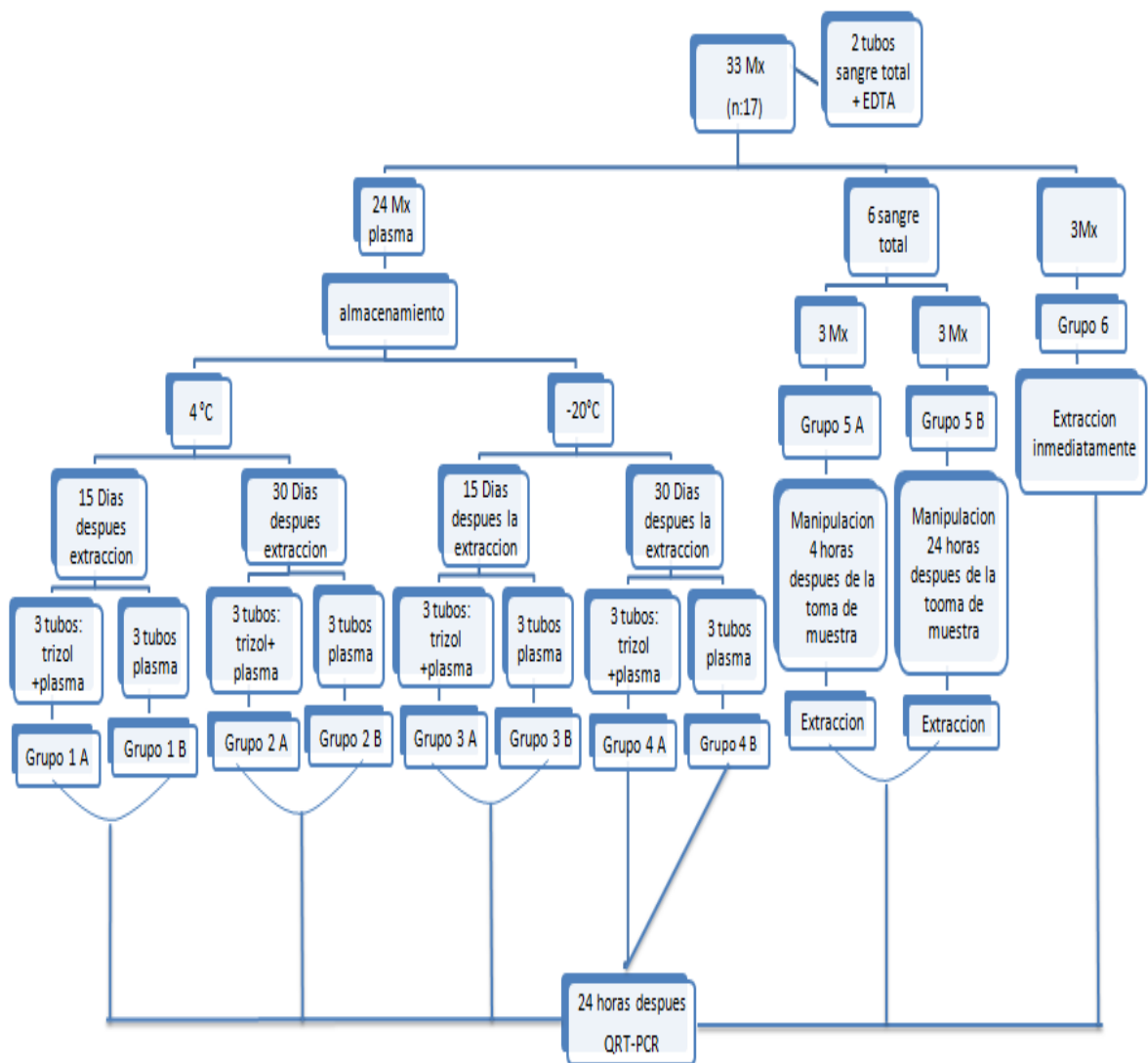
Se excluyeron del estudio mujeres que acudan, a los controles prenatales con un tiempo de gestación mayor a 20 semanas, gestantes que no hayan firmado el consentimiento informado y menores de edad que no contaron con la aprobación de un mayor de edad responsable, para su participación en el estudio.

4. Recolección de muestras

Se recolectaron muestras de pacientes gestantes antes de la semana 20 de gestación que acudieron al servicio médico para iniciar sus controles prenatales de las instituciones: Hospital Universitario San Ignacio, Hospital de Usaquén y Javesalud, el médico tratante les dio la información necesaria a las gestantes acerca del estudio y a las que decidieron hacer parte del estudio, se les tomaron 2 tubos de sangre total con EDTA.

5. Distribución de las muestras

Se tomaron 33 muestras a (n= 17) mujeres gestantes, a cada gestante se le tomaron dos tubos con EDTA de sangre, de donde se obtuvieron 6 muestras de sangre total y 27 de plasma, los tubos de sangre total 3 de ellos se manipularon 4 horas después de la toma de muestra (grupo 5 A) y los otros 3 a las 24 horas (grupo 5 B), luego de este intervalo de tiempo, se separó el plasma y se les realizó la extracción del ARN, 24 horas después se llevó a cabo la PCR en tiempo real (qRT-PCR); las 27 muestras de plasma se manipularon con diferentes intervalos de días y temperatura, 12 de estas muestras se almacenaron a 4°C, 6 se recolectaron con trizol y las otras 6 sin nada, estas 12 muestras se separaron en 2 grupos de tiempos para la extracción de RNA, 3 con trizol (Grupo 1 A), 3 sin nada (grupo 1 B) 15 días después, y las últimas 6 muestras, 3 con trizol (Grupo 2 A), 3 sin nada (grupo 2 B) 30 días después, 24 horas posterior a la extracción se les realizó la qRT-PCR; 12 tubos de plasma se almacenaron a -20°C, con las mismas condiciones de los 12 tubos anteriores (grupo 3 A,B Y 4 A,B), y los 3 tubos de plasmas restantes (grupo 6), se les extrajo el ARN, inmediatamente a una temperatura de 20°C.



Grafica 1. Distribución de las muestras en diferentes grupos, dependiendo de las condiciones de almacenamiento y tiempo de manipulación.

6. Extracción de RNA

Se realizó la extracción del RNA con el kit **QIAamp viral RNA Mini Kit de QIAGEN**, realizando modificaciones según lo reportado por Ng (2) luego se cuantificó el ARN en un espectrofotómetro Nano Drop 100 midiendo concentración de ARN y pureza mediante la relación de absorbancia 260/280 (Ver anexo 1).

7. Cuantificación de la expresión de hPL y GAPDH

Posteriormente se llevó a cabo una PCR en tiempo real con el kit **LightCycler de ROCHE**. Para este procedimiento se hizo uso del gen housekeeping, gliceraldehido-6-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), y la secuencia de los primers empleados fue, **GAPDH**, Forward: TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG, Reverse: TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT, tamaño del fragmento 240pb, **hPL (lactogeno placentario humano)** Forward: CATGACTCCCAGACCTCCTTC, Reverse: TGCGGAGCAGCTCTAGATTG, tamaño del fragmento 97pb (ver anexo 2 y 3).

8. Estandarización de curva de calibración

Para estandarizar la curvas de calibración de hPL y GAPDH, se utilizaron productos purificados de PCR, para obtenerlos, se tomaron placentas de pacientes sanas, se les realizo la extracción de ARN, luego de esta extracción, a este ARN se le hizo el debido tratamiento con retrotranscriptasa (Invitrogen) para obtener cDNA, y así poder realizar una PCR convencional para cada gen, y poder purificar estos productos con el kit WizardR SV GEL AND PCR CLEAR-UP SYSTEM (PROMEGA); previa confirmación del tamaño del fragmento en geles de agarosa al 1.5%. La concentración de copias se calculó con el programa Illumina DNA Copy Number calculator con estos productos purificados se procedió a realizar diluciones seriadas para la curva de calibración para hPL y para GAPDH, cada muestra fue analizada por duplicado y en cada análisis se montaron dos controles negativos en vez de cDNA se colocó agua. Para el análisis estadístico de la estandarización de la curva se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman (r^2). (Ver anexo 2 y 3)

9. Análisis estadístico

La significancia de las diferencias en los niveles de ARN total extraído y de expresión de genes *hPL* y *GAPDH* se determinaron mediante la prueba estadística Kruskal Wallis y Bonferroni. Todas las pruebas fueron evaluadas con un nivel de confianza del 95% en el programa estadístico Stata 9.1.

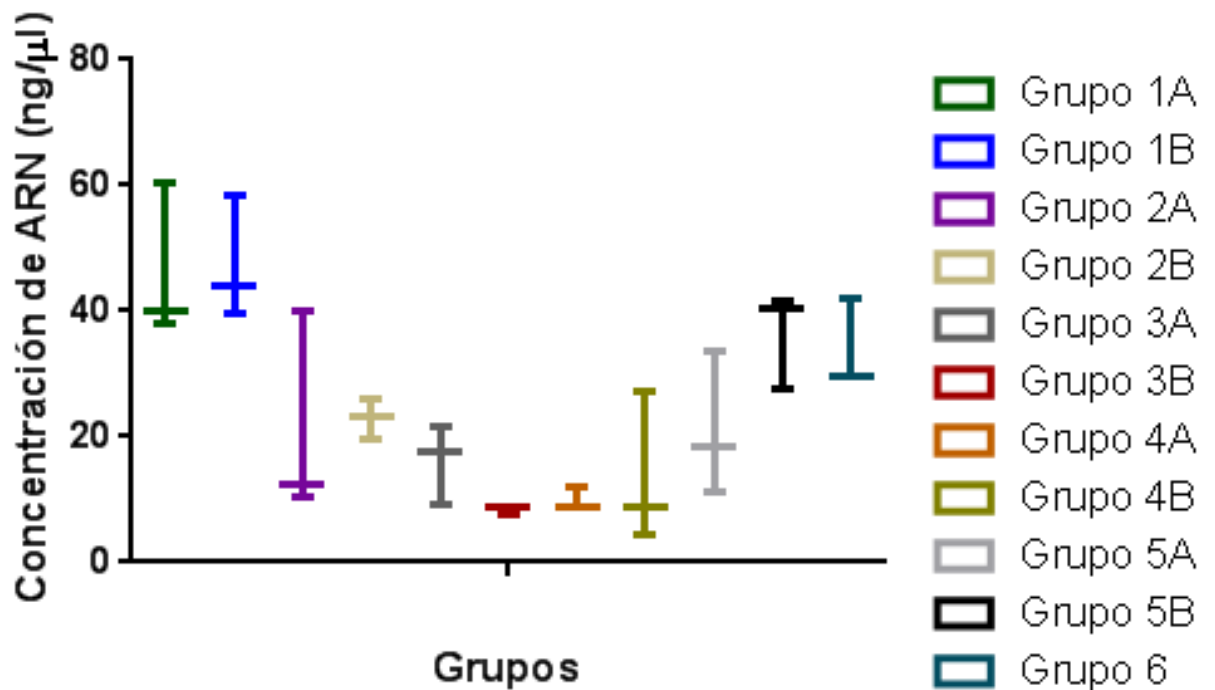
RESULTADOS

Extracción de ARN

Se logró extraer ARN de todas las muestras obtenidas. Se tomaron en cuenta datos como niveles de ARN y la relación de las proteínas al cuantificarlas mediante el método de espectrofotometría en el equipo NanoDrop 100. Los valores del ARN cuantificado fueron tabulados en la tabla 3.

Tabla 3. Tabla de resultados

Grupo	Numero de días/horas de la muestra	Semanas de gestacion	T y Conservacion	Cuantificacion RNA	Relacion proteinas/RNA (260/280)
GRUPO 1A	15 Dias	15 Semanas	4°C Plasma + Trizol	60.6 ng/lul	1.31
	15 Dias	15 Semanas	4°C Plasma + Trizol	37.9 ng/lul	1.33
	15 Dias	15 Semanas	4°C Plasma + Trizol	40.1 ng/lul	1.42
GRUPO 1B	15 Dias	15 Semanas	4°C Plasma	58.5 ng/lul	1.32
	15 Dias	15 Semanas	4°C Plasma	39.8 ng/lul	1.32
	15 Dias	15 Semanas	4°C Plasma	44 ng/lul	1.37
GRUPO 2A	30 Dias	11 Semanas	4°C Plasma + Trizol	39.9 ng/lul	1.43
	30 Dias	16 Semanas	4°C Plasma + Trizol	10.3 ng/lul	1.50
	30 Dias	10 Semanas	4°C Plasma + Trizol	12.4 ng/lul	1.56
GRUPO 2B	30 Dias	14 Semanas	4°C Plasma	23.4 ng/lul	1.4
	30 Dias	14 Semanas	4°C Plasma	25.9 ng/lul	1.34
	30 Dias	14 Semanas	4°C Plasma	19.7 ng/lul	1.36
GRUPO 3A	15 Dias	13 Semanas	-20°C Plasma + Trizol	9.2 ng/lul	1.26
	15 Dias	13 Semanas	-20°C Plasma + Trizol	21.7 ng/lul	1.40
	15 Dias	12 Semanas	-20°C Plasma + Trizol	17.8 ng/lul	1.15
GRUPO 3B	15 Dias	13 Semanas	-20°C Plasma	7.6 ng/lul	1.68
	15 Dias	13 Semanas	-20°C Plasma	8.6 ng/lul	1.59
	15 Dias	13 Semanas	-20°C Plasma	8.6 ng/lul	1.36
GRUPO 4A	30 Dias	11 Semanas	-20°C Plasma + Trizol	8.8 ng/lul	1.25
	30 Dias	11 Semanas	-20°C Plasma + Trizol	8.6 ng/lul	1.44
	30 Dias	13 Semanas	-20°C Plasma + Trizol	12 ng/lul	1.44
GRUPO 4B	30 Dias	11 Semanas	-20°C Plasma	4.4 ng/lul	1.21
	30 Dias	11 Semanas	-20°C Plasma	8.8 ng/lul	1.40
	30 Dias	12 Semanas	-20°C Plasma	27.3 ng/lul	1.41
GRUPO 5A	4 Horas	18 Semanas	Sangre total	11.1 ng/lul	1.36
	4 Horas	18 Semanas	Sangre total	33.7 ng/lul	1.37
	4 Horas	18 Semanas	Sangre total	18.2 ng/lul	1.47
GRUPO 5B	24 Horas	13 Semanas	Sangre total	27.5 ng/lul	1.38
	24 Horas	12 Semanas	Sangre total	40.5 ng/lul	1.28
	24 Horas	12 Semanas	Sangre total	41.5 ng/lul	1.41
GRUPO 6	0 Horas	16 Semanas	20°C	42.1 ng/lul	1.38
	0 Horas	16 Semanas	20°C	29.5 ng/lul	1.41
	0 Horas	13 Semanas	20°C	29.7 ng/lul	1.48



Grafica 2. Grafica de cajas y bigotes, donde se analizaron cada uno de los grupos (eje X), vs concentraciones de ARN obtenidas (eje Y).

Se obtuvo que el grupo con mayor concentración de RNA, de los analizados, fue el grupo 1 B que cumplía con las características de temperatura de conservación 4°C y 15 días de almacenamiento, sin ningun aditivo o conservante.

Tabla 4. Valores estadísticos.

Grupos	Muestra			Mediana	Rango mínimo-maximo	Bonferroni
	Mx 1	Mx 2	Mx 3			
1 A	60.6 ng/μl	37.9 ng/μl	40.1 ng/μl	40,1	37,9 - 60,6	1A - 3A (0,042) 1B - 3A (0,029) 1A - 3B (0,003) 3B-1B (0,002) 1A - 4A (0,006) 1B - 4A (0,004) 1A - 4B (0,018) 1B - 4B (0,012)
1 B	58.5 ng/μl	39.8 ng/μl	44 ng/μl	44	39,8 - 58,5	
2 A	39.9 ng/μl	10.3 ng/μl	12.4 ng/μl	12,4	10,3 - 39,9	
2 B	23.4 ng/μl	25.9 ng/μl	19.7 ng/μl	23,4	19,7 - 25,9	
3 A	9.2 ng/μl	21.7 ng/μl	17.8 ng/μl	17,8	9,2- 21,7	
3 B	7.6 ng/μl	8.6 ng/μl	8.6 ng/μl	8,6	7,6 - 8,6	
4 A	8.8 ng/μl	8.6 ng/μl	12 ng/μl	8,8	8,6 - 12	
4 B	4.4 ng/μl	8.8 ng/μl	27.3 ng/μl	8,8	4,4 - 27,3	
5 A	11.1 ng/μl	33.7 ng/μl	18.2 ng/μl	18,2	11,1 - 33,7	
5 B	27.5 ng/μl	40.5 ng/μl	41.5 ng/μl	40,5	27,5 - 41,5	
6	42.1 ng/μl	29.5 ng/μl	29.7 ng/μl	29,7	29,5 - 42,1	
P-KW	0,0001					

Con respecto a la relación 260/280 (DNA/ proteínas), se realizó el análisis con el programa ANOVA, donde no se encontraron, diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados (P: 0,0583).

Análisis de la expresión de *hPL* y *GAPDH*

Curva de calibración

Se realizó la curva de calibración realizando 5 diluciones seriadas con un rango entre 1×10^9 a 1×10^1 copias, para *hPL* y *GAPDH*, en la tabla 2 se describen los resultados de la curva.

Tabla 2. Resultados de la curva de calibración

	hPL	GAPDH
r² (1)	0,96	0,94
P (0,05)	0,0002	0,0138
Eficiencia curva	2,32	2,27

r²: Coeficiente de correlación de spearman

Estos datos nos muestran que cada uno de los datos tabulados tenían un coeficiente de correlacion cercano a 1, una P menor a 0,05 y una eficiencia de la curva dentro de los límites establecidos hasta 2,5.

Lactogeno placentario humano (hPL)

Se realizó amplificación por tiempo real de ARN de plasma de mujeres en gestación y no se logró amplificar el gen en ninguna de las muestras analizadas con las diferentes condiciones ya descritas. Se utilizó como control positivo para cada reacción un punto de la curva estándar (Figura 1), donde se observó un pico en la curva melting lo cual coincide con lo esperado (Figura 2) y como control negativo agua en vez de cDNA. El protocolo de amplificación para el gen *hPL* se presenta en el anexo 2.

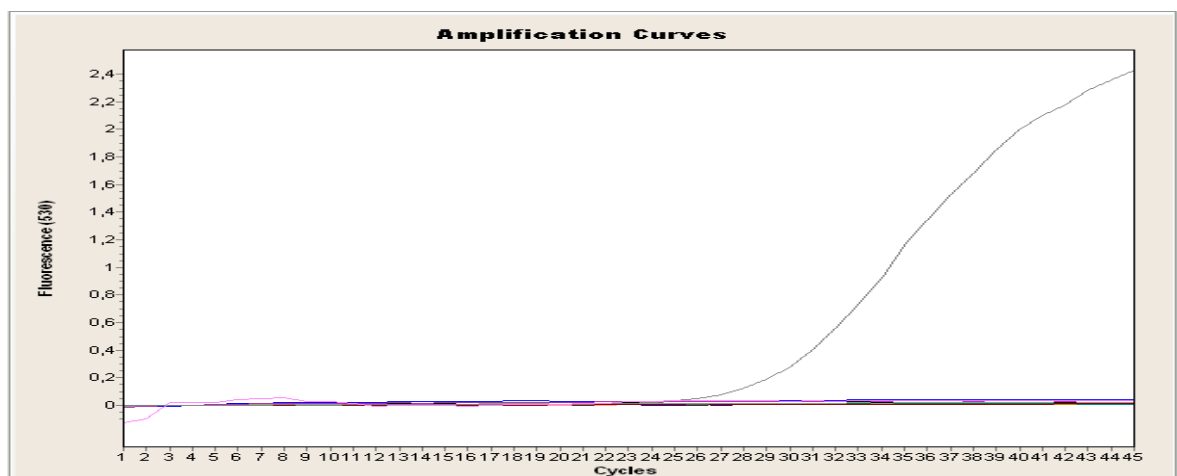


Figura 1. Amplificación del control positivo de *hPL* por PCR en tiempo real, 12 muestras, y un control negativo que no amplificaron.

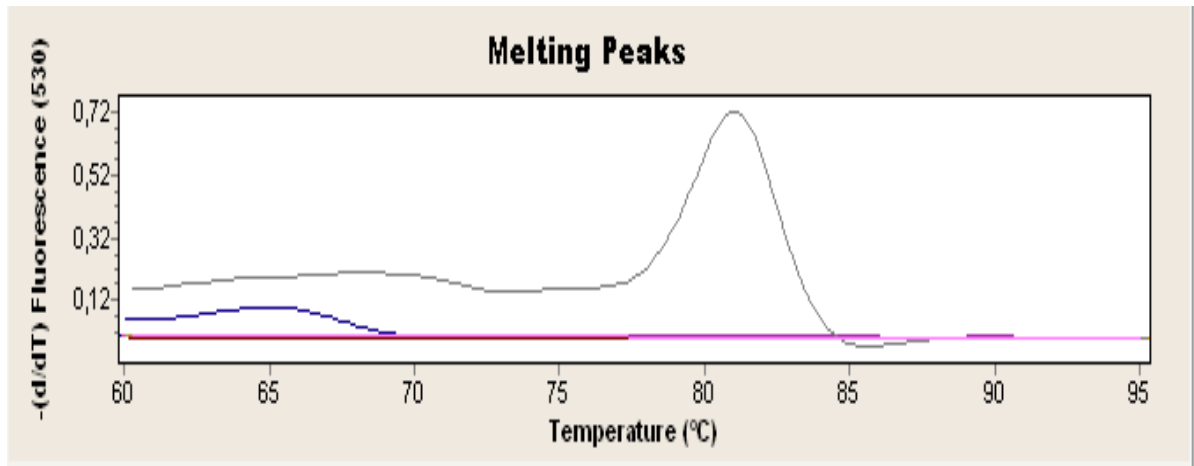


Figura 2. Curva melting, de *hPL* (control positivo, curva amplificada), 12 muestras y un control negativo, que no amplificaron.

Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*)

Se realizó amplificación por tiempo real de un fragmento del gen *GAPDH* como housekeeping, para normalizar los resultados del otro gen. Con las condiciones óptimas de la PCR en tiempo real en ninguna de las muestras analizadas se logró amplificar el fragmento; la curva estándar de *GAPDH* fue utilizada como control positivo (Figura 3) en cada reacción, y se evidenció un único pico en la curva melting lo cual coincide con lo esperado (Figura 4). El protocolo de amplificación para el gen *GAPDH* se presenta en el anexo 3.

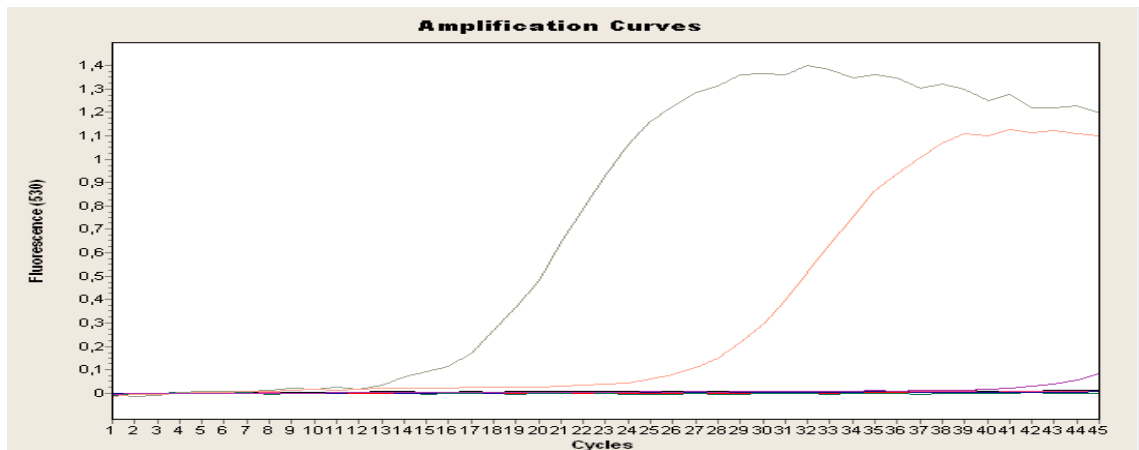


Figura 3. Amplificación de dos puntos de la curva (control positivo de *GAPDH*) por PCR en tiempo real, 7 muestras, y un control negativo, que no amplificaron.

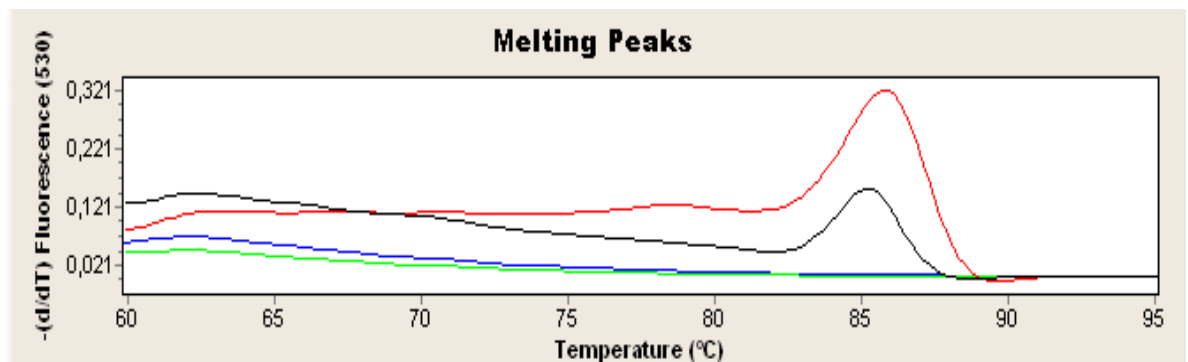


Figura 2. Amplificación de la curva melting (dos controles positivos), de *GAPDH*, muestras y un control negativo que se lograron amplificar.

DISCUSIÓN.

El objetivo principal del estudio fue buscar las mejores condiciones para el procesamiento y almacenamiento de muestras de plasma materno en las cuales se realizaría extracción de ARN. Se encuentran en la literatura pocos experimentos al respecto. Es importante investigar qué condiciones son las que mejor preservan el ARN, ya que es una molécula inestable con una vida media más corta que el ADN; y por la aplicación clínica que tiene. La circulación de moléculas de ARN de origen fetoplacentario en plasma materno placentario abren la posibilidad de que sean usadas para monitorear eventos fisiológicos y/o patológicos del embarazo(22).

Las variables estudiadas fueron: tiempo, temperatura, y almacenamiento con y sin trizol. En cuanto a tiempo y almacenamiento, no se logró evidenciar una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, sin embargo Barrett *et al.* Demostraron que después de 8 horas de tomada la muestra y sin manipular, los niveles de ADNtotal aumentan significativamente, y que por el contrario los niveles de ADN fetal son estables durante 24 horas, después de este tiempo empiezan a disminuir; Müller, concluyó que el ADN fetal en plasma materno, es un biomarcador estable en EDTA, hasta 5 días. Lo encontrado en la literatura es concordante con los resultados obtenidos, ya que se observa que los niveles de ARN en las muestras manipuladas 24 horas después (Grupo 5 B) tienden a aumentar, y esto puede ser causado por la lisis celular, durante el tiempo antes de la extracción. En los estudios de Tsui *et al.*, se observa que conservan sus muestras de plasma con trizol. En el presente estudio esta variable no influyo en la concentración de ARN. En cuanto a la temperatura de almacenamiento de la muestra, la temperatura a 4°C se asoció con mayor concentración de ARN. Se encuentra evidencia que las moléculas de ARN de plasma endógeno son altamente estables a 4°C por 24 horas en comparación con ARN tisular extraído y purificado(18). Además al pasar el plasma por filtros de 0,45 µm se encontraban diferencias estadísticamente significativas al medir la expresión del ARNm de la subunidad beta de la hormona gonadotrofina coriónica humana (βhCG), lactógeno placentario humano (hPL) y gliceraldehido-6-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), en comparación con plasma no filtrado. Esto sugiere que las moléculas de ARN podrían estar asociadas a algún tipo de estructura celular o membranal que lo protege de su degradación(2).

Se logró evidenciar, que las muestras que necesitaron de un descongelamiento para su manipulación porque habían sido almacenadas previamente a -20°C, presentaron niveles de ARN bajos, esto puede estar asociado a los efectos negativos en la muestra, por la congelación y descongelación; En un estudio previo por Kopeski *et al.* Demostraron que la congelación y descongelación de suero fueron factores que provocaron la degradación de ARN, un único ciclo de congelación-descongelación condujo a una reducción de 10 - a 100-veces la reducción de ARNm *c-abl* y tirosinasa en el suero, los niveles de ARNm fueron indetectables después de que el suero fue descongelado durante 30 minutos(23). Es importante resaltar que de acuerdo a la literatura revisada este parece ser el primer

estudio que realiza cuantificación de ARN de plasma materno por espectrofotometría en las primeras 20 semanas de gestación.

El ARN extraído en las diferentes condiciones descritas fue usado para amplificación de los genes *hPL* y *GAPDH* por medio de PCR en tiempo real con SYBR Green I, sin lograr la amplificación de estos genes. La técnica del fluorocromo SYBR Green I, es una técnica exigente en emplear condiciones de amplificación óptimas, es más económica y permite considerar una evaluación de costos en función de los beneficios para la aplicación de rutina. Se han descrito como fuente de discrepancias factores relacionados con la técnica, como baja concentración de ADN y contaminación(24). Respecto a nuestros resultados, se cree que los niveles de ARN en las muestras de las pacientes gestantes en el primer trimestre de embarazo son muy bajos y este tipo de técnica utilizada podría no ser la más favorable. Son escasos los estudios que han logrado demostrar, la presencia de hPL, en el primer trimestre de embarazo, *Ng et al* al logro demostrar que el ARNm expresado en placenta es detectable en plasma materno en primer trimestre, utilizando ARNm codificante para hPL por la técnica de qRT-PCR; cabe resaltar que ellos realizaron PCR en tiempo real, con sondas de hidrólisis (Taq Man), este tipo de técnica, tiene mejor sensibilidad en comparación a SYBR I Green, sin embargo, el SYBR I Green, ensayo es más sencillo, económico y fácilmente asequible(25). En cuanto al gen housekeeping *GAPDH*, es uno de los genes más usados comúnmente en comparaciones de datos de expresión génica(21) *Barber et al*, lograron demostrar que *GAPDH*, es un gen constitutivo, que se expresa en más de 72 tejidos, entre ellos la placenta, del ser humano. Los datos proporcionan pruebas de que no hay ningún efecto de la edad o el sexo del donante que alteren significativamente los niveles de este, probablemente la falla en la amplificación de este gen sea la misma que se ha planteado previamente para el gen *hPL*. La qRT-PCR se considera hoy como el gold estándar, ya que brinda información precisa, medición sensible y rápida de la expresión génica, son diferentes las variables que se deben tener en cuenta a la hora de llevar a cabo esta técnica, el control de calidad es esencial, extracción y almacenamiento de los ácidos nucleicos, son variables que se asocian con el éxito de esta prueba(26).

La importancia de este estudio radica en la poca información que se encuentra en la literatura acerca de protocolos de almacenamiento y procesamiento de muestras de plasma en las que se realizara extracción de ARN.

CONCLUSIONES

Se logró extraer ARN de todas las muestras de plasma de las gestantes en las primeras 20 semanas de gestación, y cuantificar por espectrofotometría, donde se pudo evidenciar que la temperatura de almacenamiento, es una variable que afecta la concentración de ARN obtenida, y que por el contrario variables de almacenamiento, como el trizol y el tiempo, no afectaron la concentración de ARN.

No se logró amplificar los genes *hPL* y *GAPDH*, posiblemente por la baja concentración de estos genes en las primeras 20 semanas de gestación y la química de reacción utilizada. Este tipo de estudios tienen una gran importancia clínica, ya que abre nuevas posibilidades para estrategias en la detección de condiciones fetales que predispongan a enfermedad, diagnóstico prenatal no invasivo, determinación de riesgo para sufrir complicaciones del embarazo y severidad de la patología.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda almacenar muestras de plasma materno para posterior análisis de genes fetoplacentarios a una temperatura de 4°C.
- Futuros experimentos que realicen amplificación de genes fetoplacentarios en las primeras 20 semanas de gestación, continuar estudios con sondas de hibridación o Taq man.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ayala-Ramírez P, García-Robles R, Bernal J, Bermúdez M. Detección de ácidos nucleicos fetales en plasma materno: hacia un diagnóstico prenatal no invasivo. *Clínica e Investigación en Ginecología y Obstetricia*. 2012 7//;39(4):164-70.
2. Ng EKO, Tsui NBY, Lau TK, Leung TN, Chiu RWK, Panesar NS, et al. mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(8):4748.
3. Lo Y, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CWG, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *the lancet*. 1997;350(9076):485-7.
4. Lachmeijer A, Dekker GA, Pals G, Aarnoudse JG, ten Kate LP, Arngrímsson R. Searching for preeclampsia genes: the current position. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2002;105(2):94-113.
5. Barrett AN, Zimmermann BG, Wang D, Holloway A, Chitty LS. Implementing Prenatal Diagnosis Based on Cell-Free Fetal DNA: Accurate Identification of Factors Affecting Fetal DNA Yield. *PloS one*. 2011;6(10):e25202.
6. Lindstedt G, Lundberg PA, Iwarsson S, Lindberg J. Circulating heat-labile DNA binder (s) in chronic active hepatitis and rheumatoid arthritis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1975;62(1):183.
7. Invernizzi P, Biondi M, Battezzati P, Perego F, Selmi C, Cecchini F, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma decades after pregnancy. *Human genetics*. 2002;110(6):587-91.
8. Thomas M, Tutschek B, Frost A, Rodeck C, Yazdani N, Craft I, et al. The time of appearance and disappearance of fetal DNA from the maternal circulation. *Prenatal diagnosis*. 1995;15(7):641-6.
9. Sesarini C, Argibay P, Otaño L. Diagnóstico prenatal no invasivo: Ácidos nucleicos de origen fetal en sangre materna. *Medicina (Buenos Aires)*. 2010;70(6):537-42.
10. Maron JL, Johnson KL, Slonim D, Lai C, Ramoni M, Alterovitz G, et al. Gene expression analysis in pregnant women and their infants identifies unique fetal biomarkers that circulate in maternal blood. *Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(10):3007.
11. Masuzaki H, Miura K, Yoshiura K, Yamasaki K, Miura S, Yoshimura S, et al. Placental mRNA in maternal plasma and its clinical application to the evaluation of

placental status in a pregnant woman with placenta previa-percreta. *Clinical chemistry*. 2005;51(5):923-5.

12. Ng EKO, Leung TN, Tsui NBY, Lau TK, Panesar NS, Chiu RWK, et al. The concentration of circulating corticotropin-releasing hormone mRNA in maternal plasma is increased in preeclampsia. *Clinical chemistry*. 2003;49(5):727-31.

13. Purwosunu Y, Sekizawa A, Koide K, Farina A, Wibowo N, Wiknjosastro GH, et al. Cell-free mRNA concentrations of plasminogen activator inhibitor-1 and tissue-type plasminogen activator are increased in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Clinical chemistry*. 2007;53(3):399-404.

14. Takacs P, Jaramillo S, Datar R, Williams A, Olczyk J, Barnhart K. Placental mRNA in maternal plasma as a predictor of ectopic pregnancy. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2012.

15. Oudejans CBM, Go ATJJ, Visser A, Mulders MAM, Westerman BA, Blankenstein MA, et al. Detection of chromosome 21-encoded mRNA of placental origin in maternal plasma. *Clinical chemistry*. 2003;49(9):1445-9.

16. Arcelli D, Farina A, Cappuzzello C, Bresin A, De Sanctis P, Perolo A, et al. Identification of circulating placental mRNA in maternal blood of pregnancies affected with fetal congenital heart diseases at the second trimester of pregnancy: implications for early molecular screening. *Prenatal diagnosis*. 2010;30(3):229-34.

17. Pang WWI, Tsui MHY, Sahota D, Leung TY, Lau TK, Lo Y, et al. A strategy for identifying circulating placental RNA markers for fetal growth assessment. *Prenatal diagnosis*. 2009;29(5):495-504.

18. Tsui NBY, Ng EKO, Lo YMD. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clinical chemistry*. 2002;48(10):1647-53.

19. Ng EKO, Tsui NBY, Lam NYL, Chiu RWK, Simon C, Wong SCC, et al. Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals. *Clinical chemistry*. 2002;48(8):1212-7.

20. Molina LM, Barbosa RH. Retardo de crecimiento intrauterino (RCIU) y sus alteraciones bioquímicas. *Nova*. 2005 (003):88-94.

21. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological genomics*. 2005;21(3):389-95.

22. Chiu RWK, Lui W, Cheung M, Kumta N, Farina A, Banzola I, et al. Time profile of appearance and disappearance of circulating placenta-derived mRNA in maternal plasma. *Clinical chemistry*. 2006;52(2):313-6.
23. Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, Gocke CD. Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clinical cancer research*. 1999;5(8):1961-5.
24. Sesarini C, Giménez ML, Redal MA, Izbizky G, Aiello H, Argibay P, et al. Diagnóstico genético prenatal no invasivo de factor Rh y sexo fetal a través del análisis de ADN fetal libre en plasma materno. *Archivos argentinos de pediatría*. 2009;107(5):405-9.
25. Kumar B, Kumar P, Rajput R, Daga MK, Singh V, Khanna M. Comparative reproducibility of SYBR Green I and TaqMan real-time PCR chemistries for the analysis of matrix and hemagglutinin genes of Influenza A viruses.
26. Derveaux S, Vandesomepele J, Hellemans J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*. 2010;50(4):227-30.
27. Ayala-Ramírez P, García-Robles R, Bernal J, Bermúdez M; Rojas, J. Identification of messenger RNA of fetoplacental source in maternal plasma of women with normal pregnancies and pregnancies with intrauterinegrowth restriction. 2012;43(3):119-123.

ANEXOS

Anexo 1. Extracción de RNA en plasma KIT QIAamp viral RNA Mini Kit de QIAGEN

1. Tomar la muestra de sangre en tubos con EDTA
2. Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos
3. Pasar a un tubo Falcón el plasma
4. Adicionar 2 ml de trizol y mezclar
5. Adicionar 400µl de cloroformo y mezclar
6. Centrifugar a 4000 rpm durante 15 minutos
7. Sacar el sobrenadante a otro tubo
8. Adicionar la misma cantidad de etanol al 70% y mezclar
9. Agregar 700µl de la mezcla a la columna
10. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto
11. Descartar el precipitado del tubo recolector
12. Repetir los pasos 9-11 con toda la mezcla
13. Adicionar 500µl de buffer AW1
14. Centrifugar 8000 rpm durante 1 minuto
15. Descartar precipitado del tubo colector
16. Adicionar 500µl de AW2 centrifugar a 14000 rpm durante 3 minutos
17. Descartar precipitado del tubo colector
18. Cambiar tubo colector por uno de 1.5 ml
19. Adicionar 40µl de Buffer AVE
20. Incubar durante 1 minuto
21. Centrifugar a 800 rpm durante 1 minuto
22. Descartar columna y cuantificar.

23. Cuantificación de RNA en el Nano Drop 100

Tratamiento con DNAsa

1. Para cada tubo 22,5µl buffer y 2.5µl DNAsa
2. Resuspender 1µg de RNA en la suspensión anterior
3. Incubar a 37°C durante 10 minutos
4. Nuevamente Cuantificar RNA en el NanoDrop 100.

Retrotranscripción cDNA

1. Tomar 1µg del RNA+ DNAsa y adicionar
2. 1µl de Random
3. 1µl de dNTP 10 mM
4. Completar a 13µl con agua
5. Incubar a 65°C por 5 minutos y en hielo por 1 minuto
6. Centrifugar suavemente
7. Adicionar
8. 4 µl de buffer 5x
9. 1µl de DTT 0.1M
10. 1µl de RNase OUT
11. 1µl de Super Script
12. Mezclar por pipeteo
13. Incubar 25°C durante 5 minutos
14. Incubar 50°C durante 50 minutos
15. Inactivar incubando a 70°C durante 15 minutos
16. Centrifugar suavemente
17. Almacenar a -20°C

Anexo 2. Protocolo QT-PCR *hPL*

Muestras

Agua	
Primer F	0,5 µl
Primer R	0,5 µl
Master mix	10 µl
cDNA	10 µl
Volumen final	21 µl

Curva

Agua	8 µl
Primer F	0,5 µl
Primer R	0,5 µl
Master mix	10 µl
cDNA	1 µl
Volumen final	20 µl

Protocolo de las condiciones de amplificación del gen *Hpl*

	Temperatura	tiempo
Denaturación inicial	95°C	10 minutos
45 Ciclos		
Denaturación	95°C	10 segundos
Anillamiento	56°C	10 segundos
Elongación	72°C	10 segundos
Lectura	78°C	single
Curva melting	95°C	0 segundos
	60°C	1 minuto
	95°C	0 segundos
	Lectura cada 0,2°C	continuo
Enfriamiento	40°C	30 segundos

Anexo 3. Protocolo QT-PRC *GAPDH*

Muestras

Agua	
Primer F	0,5 µl
Primer R	0,5 µl
Master mix	10 µl
cDNA	10 µl
Volumen final	21 µl

Curva

Agua	8 µl
Primer F	0,5 µl
Primer R	0,5 µl
Master mix	10 µl
cDNA	1 µl
Volumen final	20 µl

Protocolo de las condiciones de amplificación del gen *GAPDH*

	Temperatura	tiempo
Denaturación inicial	95°C	10 minutos
45 Ciclos		
Denaturación	95°C	10 segundos
Anillamiento	62°C	10 segundos
Elongación	72°C	10 segundos
Lectura	83°C	single
Curva melting	95°C	0 segundos
	60°C	1 minuto
	95°C	0 segundos
	Lectura cada 0,2°C	continuo
Enfriamiento	40°C	30 segundos