



FACULTAD DE FARMACIA

ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA  
LABORATORIO DE CULTIVOS CELULARES

EXTRACCIÓN DE ARN DESDE CÉLULAS CULTIVADAS EN UNA MATRIZ  
POLIMÉRICA.

Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico

**Christopher Alfonso Oliva Retamal**

Director de tesis: Dra. Caroline Weinstein Oppenheimer, PhD.

Co-director de tesis: QF Mauricio Reyna Jeldes.

**2015**

## **Resumen**

La ingeniería de tejidos representa un avance significativo en la práctica médica actual, en especial los sistemas de implantes que han permitido reparar, reemplazar y recuperar tejidos dañados. En esta disciplina, la relación entre el componente celular y los sistemas de andamiaje que lo sustentan resulta fundamental. Por este motivo es necesario ganar información sobre la influencia que tiene la interacción célula-biomaterial sobre la expresión génica.

Las matrices poliméricas pueden estar conformadas por distintos biomateriales que le otorgarán propiedades y funciones específicas. Sin embargo, estos componentes suponen una interferencia sustancial en los procesos de aislamiento de ARN convencionales. Esta interferencia ha sido detectada en un Sistema de Implante Integrado (SII) constituido por gelatina-quitosano-ácido hialurónico que se está usando en ensayos clínicos. Por este motivo es que se planteó como objetivo de esta tesis establecer un protocolo que permita una extracción de ARN de calidad desde el SII. Con este fin se efectuó un análisis comparativo entre cuatro métodos de extracción de ARN, que fueron TRIzol®, CTAB, TRIzol® mas purificación con solvente extendido y aplicando DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen®) modificado. La calidad del ARN recuperado se evaluó por indicaciones espectroscópicas de pureza y rendimiento y por su competencia para ser retro- transcrito y permitir la amplificación del gen constitutivo GAPDH. El método comercial de Qiagen® modificado resultó eficaz para producir ARN de alta pureza y funcionalidad en la amplificación de GAPDH. Además se estableció la densidad y tiempo de cultivo para las células en el SII para recuperar el ARN de calidad apropiada. Esta investigación aporta una metodología que permitiría estudiar la expresión génica de células incluidas en el SII, lo que servirá de fundamento para generar nuevas innovaciones en materia de ingeniería de tejidos.

## Indice

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| Resumen .....                 | 2  |
| Abstract .....                | 4  |
| I.Introducción.....           | 5  |
| II. Hipótesis.....            | 15 |
| III.Objetivos.....            | 16 |
| IV.Materiales y métodos ..... | 17 |
| V.Resultados .....            | 32 |
| VI Discusión.....             | 42 |
| VII Conclusiones.....         | 52 |
| Bibliografía.....             | 53 |

## **RNA extraction from cells cultured in a polymeric scaffold**

### **Abstract**

Tissue Engineering represents a significant advance to the current medical practice, especially the implant systems which allowed repairing, replacing and recovering damaged tissues. In this discipline, the relationship between the cellular component and the scaffold component that supports it is fundamental. For this reason it is needed to gain information about the influence that the relationship cell-biomaterial causes on gene expression.

Polymeric scaffolds can be constituted by several biomaterials which will provide them specific properties and functions. However, these components give raise to substantial interference with conventional processes of RNA isolation. This interference has been reported for an Integrated Implant System (IIS) made of gelatin-kitosan-hyaluronic acid, used in clinical trials. For this reason, it was proposed as the aim for this thesis was to establish a protocol to allow a good quality RNA extraction from IIS. To do this, a comparative analysis was performed among four extraction methods: TRIzol®, CTAB, TRIzol® with extended solvent purification and a modified commercial kit Plant Mini Kit (Qiagen®). The quality of the recovered RNA was determined spectroscopically for purity and yield and by its capacity for retro transcription and amplification of the constitutive GAPDH gene. The commercial modified Qiagen method was effective to yield high purity and functional ARN for GAPDH amplification. In addition, the cell density and time of culture within IIS to recover RNA of proper quality was established. This research contributes with a method that will allow studying gene expression of cells incorporated within the IIS, which will serve as the basis to generate novel innovations in tissue engineering.

## I. Introducción

En 1869 el científico Frierich Miescher logró aislar por primera vez lo que hoy se conoce como ácidos nucleicos. Este científico estudiaba la composición química de los leucocitos y describió, gracias a sus experimentos, que las propiedades de la sustancia, rica en fosfatos, sin azufre y resistente a proteasas, no correspondían ni a proteínas ni a lípidos. Esta sustancia era aislada en primera instancia desde los núcleos de los leucocitos y después de esperma de salmón mediante una técnica bastante rudimentaria. Para llevar a cabo esta extracción, Miescher, al no disponer de refrigeración, debía empezar a trabajar desde las 5 de la mañana para asegurarse que los reactivos estuviesen lo suficientemente fríos para lograr precipitar esta sustancia y debía preparar su propio extracto de proteasas a partir del estómago de cerdos recién sacrificados (Figura 1). Esta sustancia fue llamada por primera vez “nucleína”, pero después Richard Altmann logró identificar su naturaleza ácida y cambió su nombre a “ácidos nucleicos”<sup>1,2</sup>.

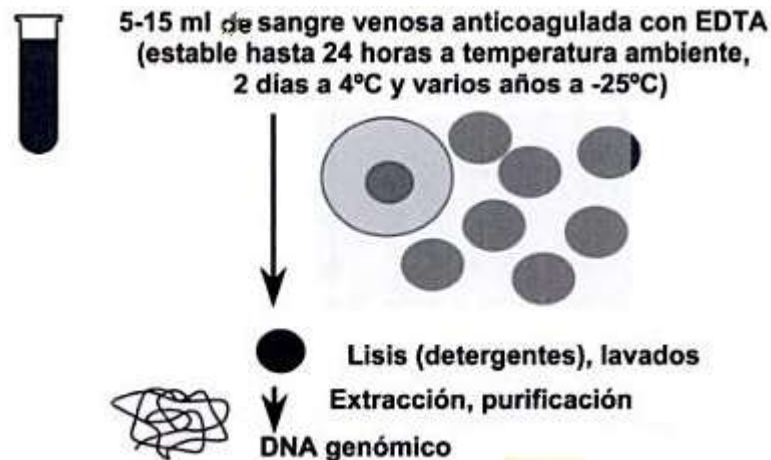


Figura 1. Aislamiento de ácidos nucleicos a partir de leucocitos utilizado por Miescher. El método ilustrado consiste en lisis de las células con detergente, digerir las proteínas mediante proteasas extraídas del estómago de cerdos recién sacrificados, purificación del ADN mediante la extracción clorofórmica de las proteínas y precipitación de ADN con etanol (Adaptado de Oliva R *et al.* 2004).

En la década de 1920 Phoebus Levene, en sus estudios de la estructura y función de los ácidos nucleicos, logró determinar la existencia de ADN y ARN, además de que el ADN está formado por 4 bases nitrogenadas: timina y citosina (pirimidinas), y guanina y adenina (purinas); un azúcar (desoxirribosa) y un grupo fosfato. Descubrió que la unidad básica de los ácidos nucleicos estaba conformada por un fosfato, un azúcar y una base nitrogenada que llamó nucleótido, en el caso del ADN el azúcar era una desoxirribosa y en el ARN una ribosa. También postuló erróneamente que los cromosomas de vegetales estaban compuestos por ARN y los cromosomas animales estaban formados por ADN. Este fue el comienzo para conocer la diferencia química y funcional del ARN con respecto al ADN<sup>3</sup>.

Los esfuerzos de la comunidad científica permitieron que a mitad del siglo XX se reconociera al ADN como la molécula que contenía la información hereditaria de la célula, sin embargo, no se sabía cómo el ADN dirigía la expresión de las proteínas, o qué papel tenía el ARN en estos procesos. Esta interrogante empezaría a ser dilucidada en 1955 cuando el bioquímico español Severo Ochoa y Marianne Grumberg-Manago descubren la polinucleótido fosforilasa, que sirvió para sintetizar oligorribonucleótidos con los que autores como Marshall Nirenberg y Heinrich Matthaei llevarían a cabo experimentos cruciales para descifrar el código genético. Entre los primeros logros del equipo de Nirenberg se encuentra la síntesis de ARN, utilizando la enzima polinucleótido fosforilasa, mediante el uso de un único nucleótido llamado uracilo presente sólo en el ARN. Gracias a esta síntesis de ARN sólo con uracilo se pudo realizar el experimento que descifra el código genético de la fenilalanina: UUU y demuestra que rol cumple el ARN en la síntesis de proteínas. Este fue el primer paso para descifrar el código genético y el papel que cumple el ARN en su expresión<sup>4</sup>.

El avance impulsado por los nuevos descubrimientos y la disponibilidad de una serie de adelantos técnicos que permitirían abordar nuevos y más complejos trabajos fue vertiginoso a finales del siglo pasado. Por citar sólo unos pocos, se desarrollaron nuevas técnicas de microscopía óptica, así como la electrónica, y aparecen la ultracentrifugación, las técnicas espectroscópicas y la resonancia magnética nuclear. Todos estos adelantos permitieron grandes descubrimientos a nivel mundial como: el primer ratón transgénico en 1980 y la comercialización en 1981 de una insulina obtenida por expresión en *E. coli* del gen humano recombinante: la humulina, entre otros<sup>5</sup>.

A medida que más se desentrañaban los misterios del ADN, más interés surgía en el ARN. Se tenía conocimiento que éste ácido nucleico estaba conformado por una inestable cadena de ribonucleótidos, que contenía la base pirimidínica uracilo en vez de timina, que existía el ARN mensajero y el ARN de transferencia y se intuía la función de cada uno. También se habían logrado identificar algunas secuencias de ARN de algunos microorganismos, como lo hizo Robert W. Holley en 1965 con el ARN de transferencia de una levadura. Todas estas investigaciones hicieron surgir la necesidad de obtener extracciones de ácidos nucleicos cada vez más eficientes, sobre todo de ARN, debido a la inestabilidad de la molécula en comparación con el ADN. Atrás habían quedado los días de 1869 en donde Miescher utilizaba detergente para romper la membrana celular. Habían pasado 100 años y el método más utilizado ahora era el uso de cloruro de guanidinio que había demostrado mayor eficiencia que el método de extracción con fenol<sup>6</sup>. Sin embargo, la necesidad de mejorar aún más el proceso llevó en 1979 a Chirgwin *et al.* a buscar nuevas estrategias experimentales. Su investigación los condujo a utilizar tiocianato de guanidinio para aislar ARN proveniente de tejido de páncreas obteniendo muy buenos resultados. Pero no es hasta 1982 cuando Chomczynski y Sacchi

revolucionan los métodos de extracción al lograr diseñar un protocolo que se ocuparía hasta la actualidad. Éste consiste en utilizar un reactivo (TRIzol®) que contiene: fenol, tiocianato de guanidinio, tiocianato de amonio, hidroxiquinina (inhibidor de ARNasas), y glicerol, como agente caotrópico y una mezcla de extracción conformada por fenol-cloroformo en condiciones ácidas para purificar la muestra. Este protocolo es uno de los más utilizados para extraer ARN de cultivos celulares y tejido animal y consiste en: utilizar el reactivo Trizol para lisar las células, purificar el ARN mediante una extracción líquido-líquido, lavar el mismo con alcohol (etanol y/o isopropanol) y resuspenderlo en agua libre de nucleasas<sup>7</sup>.

Sin embargo el método de TRIzol®, si bien efectivo, es un protocolo que requiere de mucho tiempo para su ejecución y se deben utilizar varios reactivos para llevarlo a cabo. Es por eso que en 1990 Qiagen® desarrolla un protocolo basado en una extracción por columna que consta de 4 etapas: lisar las células mediante un buffer caotrópico, unión iónica del ARN a una columna de sílice mediante la utilización de un buffer de unión con una concentración de sales adecuada y a pH levemente ácido, lavar la columna mediante un buffer de lavado que contiene etanol y elusión del ARN mediante buffer de elusión o agua libre de nucleasas<sup>8</sup>. Este protocolo tiene la ventaja de ser bastante rápido de realizar y su presentación es en un kit que incluye todo lo necesario para una extracción de ARN de alta calidad.

En general ambos protocolos permiten obtener ARN de gran pureza y concentración y realizar ensayos de biología molecular sin interferencias, para la mayoría de los tipos de muestra como tejido animal y cultivos celulares en monocapa. Sin embargo, la extracción de ácidos nucleicos de tejido vegetal producía material de baja pureza y rendimiento. El problema que presentaba la extracción a partir tejido vegetal tenía relación con las



características estructurales de sus células. Éstas están rodeadas por una pared celular rígida formada por celulosa y pectinas, entre otros, que constituye el andamiaje de la morfología y estructura del tejido de planta. El primer reto para aislar ARN de tejido vegetal fue romper esta pared celular para tener acceso al contenido intracelular y por eso se añadió un paso previo a los protocolos de extracción, que fue congelar el tejido vegetal con nitrógeno líquido, para mantener inactivas las ribonucleasas y pulverizarlo para romper la pared celular<sup>9,10</sup>. Si bien este paso previo incorporado en los protocolos tradicionales mejoró los resultados de extracción de ARN aislado desde tejido vegetal, su calidad no era comparable el ARN extraído desde cultivos celulares o tejido animal. Esto tenía una explicación química. En general el tejido de planta contiene una gran cantidad de polisacáridos que pueden tener propiedades químicas similares a los ácidos nucleicos, formando complejos con éstos y alterando la calidad y rendimiento de la extracción. La contaminación por polisacáridos además dificulta la resuspensión de ARN, en la medición espectrofotométrica<sup>11</sup> e interfiere en la actividad enzimática, que puede ser requerida en ensayos posteriores, por ejemplo, si se quiere realizar una retrotranscripción. El conocer las causas de la interferencia, permitió diseñar protocolos específicos basados en otros reactivos para extraer ácidos nucleicos desde tejido de planta. Entre estos, se encuentra el método de extracción CTAB diseñado por Murray y Thompson y publicado posteriormente por Wagner y cols en 1987. Este protocolo se basa en utilizar un buffer a base de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) como tensoactivo catiónico y una solución extractiva de cloroformo:octanol (24:1) obteniendo resultados de buena calidad en células vegetales<sup>12,13</sup>.

En general los científicos han logrado enfrentar satisfactoriamente los problemas técnicos que presentan extraer ARN de muestras vegetales haciendo puntuales

modificaciones a los protocolos según las características del tejido. Sin embargo, en cultivos tridimensionales creados para regenerar tejidos, existe un desafío en cuanto a la recuperación de ácidos nucleicos en calidad y cantidad suficientes desde matrices artificiales con alto contenido de polisacáridos.

La reconstitución de tejidos y órganos, aplica los conocimientos desarrollados en biología celular y molecular, y sustenta una disciplina emergente, la Ingeniería de Tejidos.

Ante una lesión tisular, dependiendo del nivel de daño y del órgano afectado, el organismo puede responder con dos fenómenos: la regeneración tisular, que corresponde a la restitución de los tejidos dañados, y la reparación tisular que corresponde a la cicatrización de los tejidos a través del reemplazo de éste por otro que no restaura totalmente la arquitectura ni la función del tejido original<sup>14</sup>. Bajo esta premisa, la ingeniería tisular ha centrado su investigación en el desarrollo de alternativas terapéuticas previsibles como lo son los polímeros fabricados de distintos biomateriales, que pueden estimular la regeneración de un tejido al ser utilizadas como injerto; a estos polímeros se les denominan matrices o andamiajes.

Las matrices para ingeniería de tejidos pueden ser elaboradas a partir de una variedad de materiales naturales tales como: fibronectina, fibrina, ácido hialurónico, quitosano y gelatina, o de materiales sintéticos como ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), ácido láctico co-glicólico (PLGA), entre otros<sup>17-20</sup>. Estas sustancias pueden ser combinadas entre sí para fabricar sistemas compuestos cuyas propiedades sean las adecuadas para imitar las características de soporte de la matriz extracelular, es decir, constituir un andamiaje tridimensional que permita que las células viables puedan proliferar y/o diferenciarse sin diseminarse hacia otros sitios y lograr así la apropiada

regeneración de los tejidos<sup>15,19,21</sup>. Un ejemplo de esta clase de polímeros compuestos es el Sistema de Implante Integrado (SII), conformado por los siguientes biomateriales: gelatina, quitosano y ácido hialurónico en proporción 7:2:1, al que se le adicionan células inmersas en un gel de fibrina formado *in situ*. El sistema antes citado fue desarrollado por investigadores del Centro de Biotecnología de la Universidad Técnica Federico Santa María, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia y del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso a través del financiamiento de los proyectos FONDEF D02i1009 y D07i1075<sup>19,22</sup>.

Este sistema ha sido desarrollado como implante de piel para pacientes que presentan pérdida su integridad por quemaduras de diverso grado, úlceras, amputaciones, heridas dérmicas por objetos corto-punzantes, entre otras aplicaciones. No obstante, un dilema para seguir avanzando en la investigación de estos novedosos sistemas se halla en el desconocimiento de los procesos moleculares que se desencadenan a nivel celular al momento de incorporarse a estas matrices<sup>10</sup>. Esta información permitiría ajustar los microambientes celulares en las matrices para ajustarlos a un fin particular, por ejemplo, estimular la diferenciación de células madre hacia un linaje determinado<sup>15,23</sup>. Sin embargo, hay un problema que está centrado en la composición química de las matrices poliméricas<sup>14,15,19</sup>. Estos materiales interfieren en el proceso extractivo de ARN, disminuyendo el rendimiento y las razones de pureza espectrofotométrica obtenidas por métodos tradicionales de aislamiento como lo es el protocolo basado en isotiocianato de guanidina TRIzol®, diseñado para utilizarse en cultivos de células en monocapa. Esta situación es un impedimento para aplicar técnicas de biología molecular para estudiar el comportamiento de las células cultivadas en el implante antes señalado.

Una vez más la necesidad de obtener ARN de alta calidad ha llevado a los investigadores a observar el problema desde distintas perspectivas. La búsqueda de la respuesta a esta interrogante condujo a la comunidad científica a centrar su atención nuevamente en los tejidos de origen vegetal y en los protocolos utilizados para extraer ácidos nucleicos de éstos, ya que la principal problemática, como se ha mencionado anteriormente, es el alto nivel de polisacáridos que contienen las paredes celulares<sup>11,24</sup>, característica similar a la de algunos polímeros utilizados en ingeniería de tejidos. Esto disminuye la calidad de extracción por diferentes mecanismos, por ejemplo los grandes fragmentos de polisacáridos pueden atrapar los ácidos nucleicos al estar en contacto con ellos y arrastrarlos a la fase orgánica en los ciclos de extracción por solvente, disminuyendo la cantidad de ARN obtenido. Por otra parte, algunos fragmentos de polisacáridos pueden disolverse en la fase acuosa, lo que supone una disminución en la pureza del ARN aislado<sup>23</sup>. Por esto, científicos como Wang y Stegemann analizaron los métodos de extracción de ARN de muestras vegetales utilizados por otros investigadores y propusieron un método de aislamiento de ARN a base de un buffer de extracción que contiene bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) como tensoactivo catiónico,  $\beta$ -mercaptoetanol como inhibidor de nucleasas, ácido etildiaminotetraacético (EDTA) como agente quelante, polivinilpirrolidona (PVP) como agente purificador de compuestos aromáticos, y una solución de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) para la extracción por solvente, inspirado en el método desarrollado por Murray y Thompson<sup>12</sup>. Este buffer fue aplicado en células madre humanas cultivadas en 3 hidrogeles: uno fabricado con agarosa, otro con colágeno tipo I y un hidrogel mixto, hecho con quitosano y colágeno tipo I, usando en todas estas condiciones una densidad celular de  $10^6$ - $10^7$  células/mL de gel<sup>25</sup>. Para comparar la eficacia del método CTAB, los autores aplicaron a las matrices con células los métodos de extracción de ARN tradicionales: TRIzol®, Qiagen® y una

combinación de ambos protocolos. El mismo día del proceso, todas las matrices fueron pulverizadas en nitrógeno líquido antes de realizar los protocolos de extracción. Los resultados obtenidos arrojaron una menor contaminación de polisacáridos en el ARN aislado (relación de absorbancia 260/230 nm entre 1,30 y 1,55) y una mejora sustancial del rendimiento de ARN obtenido con el método CTAB en comparación con métodos tradicionales, destacándose principalmente los resultados obtenidos del cultivo en hidrogel mixto por poseer quitosano en su estructura, ya que este biomaterial posee una dificultad adicional en los procesos extractivos al poseer grupos amino, que en un medio ácido se protonan formando complejos con los ácidos nucleicos, lo que ocasiona su precipitación, y por ende, disminuye el rendimiento en el aislamiento de ARN<sup>25</sup>. La solución a esta problemática se reflejó en el buen rendimiento obtenido por el método propuesto por Wang y Stegemann y que se explica porque el buffer CTAB tiene un pH básico -a diferencia de los métodos tradicionales, en los que la extracción se lleva a cabo en un medio ácido-, disminuyendo al mínimo la formación de complejos quitosano-ácidos nucleicos<sup>20,23,25</sup>. Sin embargo, los resultados de pureza obtenidos por el protocolo CTAB no fueron superiores a los conseguidos por una combinación de kit comerciales, TRIzol® + Qiagen®<sup>23</sup>.

Claire Yu y colaboradores, 2 años más tarde, buscando mejorar la pureza del ARN aislado, compararon distintos métodos de extracción de ARN basados en combinaciones de kit comerciales de aislamiento de ARN tradicionales, el método de aislamiento de CTAB propuesto por Wang y Stegemann combinado con el kit comercial RNeasy® (Qiagen®), probado con muestras pulverizadas en nitrógeno líquido y con muestras cortadas finamente en presencia de buffer CTAB, y un novedoso protocolo de extracción diseñado por ellos basado en el método TRIzol® con una extensión de purificación por solvente con dos extracciones adicionales, utilizando fenol:cloroformo:alcohol isoamílico

(proporción 25:24:1), que facilita la extracción de ARN y la eliminación de ADN genómico al proporcionar un medio levemente ácido, y cloroformo:alcohol isoamílico (en proporción 49:1), que permite remover los contaminantes remanentes<sup>23,24,26</sup>. Cabe destacar que los métodos anteriormente mencionados se replicaron añadiendo una digestión previa con una solución de 10mg/mL de la enzima lisozima, apelando a la degradación de la matriz por medio de enzimas digestivas, y aunque no arrojaron mayores ventajas, la propuesta no debe descartarse, pues la eficiencia de la digestión enzimática depende en gran medida de la naturaleza y composición de la matriz y de la enzima utilizada. Estos métodos fueron aplicados en muestras de células madre humanas cultivadas en hidrogeles de quitosán-glicol N-metacrilado con una densidad de  $10^7$  células/mL de hidrogel<sup>23</sup>. En los resultados obtenidos destaca el método propuesto por los autores, siendo el más consistente en términos de pureza, rendimiento y amplificación génica, aunque también llama la atención la pureza y rendimiento superior obtenidos mediante el método de Wang y Stegemann con las muestras cortadas finamente en presencia de buffer CTAB en comparación con las muestras pulverizadas en presencia de nitrógeno líquido<sup>23,25</sup>.

En general estos trabajos corresponden a los primeros cimientos concretos de un campo por explorar, una fuente inusitada de conocimiento que puede ser de gran utilidad para profundizar la comprensión de los sistemas de implante para optimizarlos en su función que es la recuperación de la salud y la mejoría de la calidad de vida de los pacientes afectados. Es por eso que en base a los antecedentes recientemente expuestos, surge el interés por evaluar diferentes métodos para extraer ARN de alta calidad y pureza desde células incorporadas al SII.

## **II.Hipótesis**

Lo métodos de extracción modificados, por medio de la adición de enzimas y/o solventes orgánicos, ofrecen una mejoría en términos de rendimiento y pureza a los métodos convencionales aplicados a células cultivadas en sistemas tridimensionales.

### **III.Objetivos**

#### **Objetivo general**

Establecer un protocolo que permita una extracción de ARN de calidad desde el Sistema de Implante Integrado.

#### **Objetivos específicos**

- Comparar la calidad del ARN purificado desde el Sistema de Implante Integrado por diferentes métodos de aislamiento.
- Evaluar el efecto de la digestión enzimática del Sistema de Implante Integrado sobre la calidad de ARN aislado.
- Acreditar la calidad de las muestras extraídas mediante PCR en tiempo real.



## **IV. Materiales y métodos**

### **IV.1 Cultivos celulares**

#### *IV1.1 Procesamiento de biopsia para obtención de cultivo primario*

Las células a utilizar provenían de biopsias de pacientes obtenidas con fines clínicos - previo consentimiento informado en un proceso aprobado por el Comité de Ética Institucional - y cuyo proceso de obtención se explica brevemente a continuación:

La biopsia, que fue tomada por un profesional médico del área respectiva al tejido de origen, presentó un espesor de entre 0,06 a 1 mm, y fue transportada en un tubo de centrífuga con medio de cultivo AIMV (Invitrogen, New York, EEUU) en cadena de frío a 4°C. Para su procesamiento se empleó un gabinete de bioseguridad ESCO, donde se removió la grasa utilizando pinzas y bisturí, y se lavó exhaustivamente con una solución salina tamponada con fosfato 0,1 M a pH 7,4 (PBS, Invitrogen, New York, EEUU) suplementada con 1% de una solución penicilina 10000 UI/mL y estreptomina 1000 µg/mL (Invitrogen, Carlsbad CA, EEUU). Luego del proceso de lavado, se incubó la biopsia en 1 mL de colagenasa 2mg/mL (Invitrogen, Carlsbad CA, EEUU) a 37°C con una atmósfera humidificada al 5% de dióxido de carbono (Incubador Thermo) por 2 h. Concluido el tiempo de incubación enzimática, se trituraron finamente los restos de biopsia y se añadieron a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL estéril (Eppendorf, Germany). Se centrifugó (Microcentrifuga *Minispin*®, Eppendorf) a 2000 g por 5 min a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. Tras la centrifugación, se resuspendió el precipitado en 1 mL de Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Corning, New York,

EEUU) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Invitrogen, Carlsbad CA, EEUU), con 1% de una solución penicilina 10000 UI/mL y estreptomina 1000 µg/mL (Invitrogen, Carlsbad CA, EEUU) y glutamina 2 mM (Invitrogen, Carlsbad CA, EEUU). La suspensión se añadió a un frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (Life Sciences, Korea) y se incubó a 37°C con una atmosfera humidificada al 5% de dióxido de carbono (Incubador Thermo) por 24 h. Finalmente, se lavó el frasco de cultivo con PBS y se agregó medio DMEM suplementado para posteriormente incubar en las condiciones anteriormente señaladas. Se utilizaron cultivos primarios obtenidos de diferentes individuos y fueron empleados siempre entre el cuarto y sexto pasaje.

#### IV1.2 Tripsinización

Este proceso permitió el pasaje celular durante la mantención de los cultivos celulares y la recuperación de células para efectuar los experimentos propuestos. La tripsinización se desarrolló al interior de un gabinete de bioseguridad ESCO.

Se removió y descartó el medio de cultivo del frasco de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (SPL Life Sciences, Gyeonggi-do, Korea) mediante una pipeta desechable estéril. Se agregaron 4 mL de PBS suplementado para eliminar remanentes de medio de cultivo y restos celulares, procurando abarcar toda la superficie de cultivo. Se eliminó el PBS utilizando una pipeta desechable estéril. Se agregaron 4 mL de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco Invitrogen, EEUU) con micropipeta y luego se incubó a 37°C por 5 min. Se observó en un microscopio (Lieder Microscope) si las células se habían desprendido del frasco de cultivo, se aspiró la suspensión resultante con una pipeta desechable estéril y se traspasó a un tubo de centrifuga de 15 mL (Biologix, Lenexa, EEUU). Se añadieron 4 mL de DMEM suplementado al frasco de cultivo,

para extraer cualquier posible célula que podría haber quedado, y este volumen se traspasó al mismo tubo de centrifuga de 15 mL. Se centrifugó a 2000 g por 5 min a 25°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en en 1 mL de medio de cultivo.

#### *IV1.3 Conteo celular*

La suspensión de células se mezcló en relación 1:1 con el colorante azul de Tripán (GIBCO,Invitrogen, EEUU). Se sembraron 10 µL de la suspensión celular con azul de Tripán en la cámara de Neubauer. A partir del recuento celular se determinó la dilución de la suspensión a preparar para sembrar 50.000, 250.000, 500.000 y 750.000 células en las matrices porosas correspondientes.

#### IV.2 Preparación de la matriz porosa

La matriz porosa compuesta por gelatina, quitosano y ácido hialurónico (7:2:1) se obtuvo del Centro de Biotecnología de la Universidad Federico Santa María, Valparaíso, Chile.

La preparación de la matriz porosa se realizó al interior de un gabinete de bioseguridad ESCO.

El polímero fue desinfectado en etanol 70% en una placa bacteriológica de 10 cm diámetro (BD Biosciences, Durham, EEUU) por un período de una hora. Luego de la desinfección, se secó en papel absorbente estéril y se trasladó a una nueva placa donde se acondicionó con medio de cultivo DMEM suplementado durante 24 horas. La matriz acondicionada fue cortada con un sacabocado para biopsias de 10 mm de diámetro, obteniendo circunferencias de polímero con un área aproximada de  $0,8 \text{ cm}^2$ , las que fueron secadas nuevamente con papel absorbente estéril, previo a la constitución del SII.

### IV.3 Diseño experimental

Todos los procedimientos se realizaron al interior de un gabinete de bioseguridad ESCO.

*IV.3.1 Constitución del SII.* Los polímeros se ubicaron en una placa de 24 pocillos (1 polímero por pocillo). Simultáneamente, a cada polímero se le añadieron 50  $\mu$ L de suspensión celular en plasma, abarcando toda la superficie del polímero, y esperando la absorción por 2 min. Posteriormente se agregaron 25  $\mu$ L de una solución de cloruro de calcio 30 mM y cloruro de sodio 100mM, abarcando toda la superficie del polímero y se incubó a temperatura ambiente hasta confirmar visualmente la formación del coágulo.

*IV.3.2 Incubación del SII.* Una vez observada la formación del coágulo los Sistemas de Implantes Integrados constituidos fueron incubados en DMEM o en proteinasa K según correspondía al diseño experimental.

*IV.3.2.1 SII Incubados en DMEM.* Se les agregó 1mL de medio de cultivo DMEM y se dejaron incubar a 37°C con una atmósfera humidificada al 5% de dióxido de carbono por 3, 5 o 7 días dependiendo de las condiciones propuestas. El medio de cultivo fue cambiado diariamente añadiendo la misma cantidad antes mencionada.

*IV.3.2.2 SII Incubados en Proteinasa K.* se les agregó 1 mL de solución enzimática de proteinasa K (Promega, Madison EEUU) 1mg/mL

preparada en Tris- HCl a pH 8,0 y se dejó incubar a 37°C por 3, 5 o 7 días dependiendo de las condiciones propuestas.

*IV.3.3 Disposición de la placa de 24 pocillos:* La disposición de la placa fue como se observa en la figura 2.

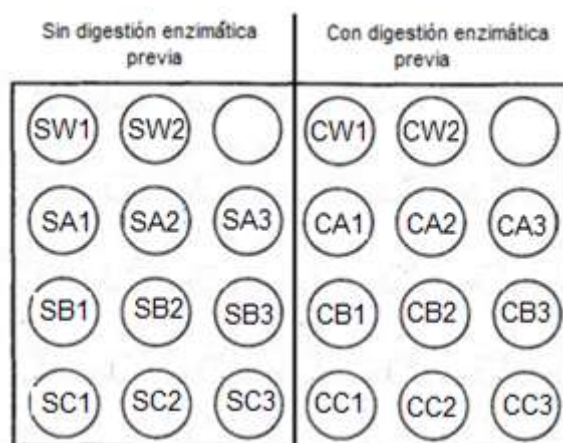


Figura 2. La disposición de la placa de 24 pocillos al realizar cada uno de los métodos de extracción obedeció el orden que se observa en la figura 1. Donde "S" representa las muestras sin digestión enzimática previa, "C" representa las muestras con digestión enzimática previa, A, B y C son muestras por triplicado y W es el polímero control, el cuál fue cultivado sin células, por duplicado.

#### *IV.3.4 Análisis estadístico.*

Los resultados se expresaron como promedio  $\pm$  desviación estándar. Por tratarse de pseudoréplicas provenientes del cultivo de un mismo paciente no se puede realizar otro tipo de análisis estadístico.

#### IV.4 Métodos de purificación de ARN.

Los métodos a evaluar fueron; TRIzol® kit, DNeasy plant mini Kit de Qiagen® con protocolo modificado, método de Wang y Stegemann<sup>14</sup>, TRIzol® más purificación de solvente extendido (Yu *et al.*, 2013)<sup>23</sup>.

##### IV.4.1 Protocolo de extracción de ARN TRIzol® (Invitrogen):

- Descripción: Este es un método tradicional basado en el reactivo TRIzol, una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, que mantiene la integridad del ARN mientras lisa las células y disuelve los componentes celulares. Además, se realiza una purificación con cloroformo para eliminar contaminantes. En general, el método TRIzol® es económico, fácil y rápido de realizar obteniéndose resultados de pureza y rendimiento aceptables en muestras de tejido vegetal y animal y en cultivos de monocapa<sup>8</sup>.

- Método: Las matrices de soporte fueron finamente trituradas mientras estaban sumergidas en 1 mL de reactivo Trizol (Ambion Invitrogen, Carlsbad CA, EEUU) previamente añadido a los pocillos. Se transfirió todo el contenido del pocillo a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Se centrifugó a 12000 g por 10 min a 2-8°C. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Se agregó 200 µL de cloroformo, se agitó el tubo por 15 s y se incubó a temperatura ambiente por 3 min. Se centrifugó a 12000 g por 15 min a 2-8 °C. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, se agregó 250 µL de isopropanol, 250 µL de una solución salina de citrato de sodio 0,8 M y de Cloruro de Sodio 1,2 M y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Se centrifugó a 12000



g por 15 min a 2-8°C y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Se descartó el sobrenadante, se lavó el precipitado con 1mL de etanol 75%. Se centrifugó a 7500 g por 5 min a 2-8°C. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar por 10 min. Se disolvió el precipitado en 30µL de agua libre de nucleasas, y se incubó por 10 min a 55-60°C. Se evaluó el rendimiento por medición de absorbancia a 230, 260, 280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop®.

#### IV.4.2 Protocolo modificado de extracción de ADN DNeasy plant mini

##### kit(Qiagen®) para extraer ARN:

- Descripción: Este es un método convencional que emplea un buffer de lisis llamado AP1, conformado por tiocianato de guanidina, que mantiene la integridad de los ácidos nucleicos mientras lisa las células y disuelve los componentes celulares. Además, utiliza una columna de giro *Qiasredder*® que contiene un filtro de sílice capaz de unir de forma selectiva el ADN mientras los contaminantes son eliminados. En este caso no se realizó el segundo paso del protocolo de este kit, el cual consiste en añadir una ARNasa a la muestra, para mantener intacto el ARN. En general *DNeasy plant mini kit* es fácil de realizar, rápido y permite aislar ADN de alta calidad en muestras de tejido vegetal de alta calidad.

- Método: Se preparó 1mL de buffer de lisis AP1 agregándole 38mL de etanol. Las matrices de soporte se traspasaron a tubos de microcentrífuga y fueron finamente trituradas mientras estaban sumergidas en 400 µL de buffer de lisis AP1, luego como modificación del protocolo entregado por el fabricante, se

agregó 50  $\mu\text{L}$  de una solución 0,2 U/ $\mu\text{L}$  de ADNasa 1 recombinante libre de ARNasa (DNase I Recombinant, RNase-free, Roche Alemania) solo si correspondía con el proceso experimental, ya que se probó con y sin ADNasa. El producto se incubó a 65°C por 10 min y se homogeneizó por inversión 3 veces cada 3 min. Se agregó 130  $\mu\text{L}$  de Buffer P3 a cada tubo, se aplicó vórtex y se incubó durante 5 min en hielo. Se centrifugó a 20000 g por 5 min y se transfirió a una columna de centrifugado *Qiasredder*® de 2 mL. Se centrifugó por 2 min a 20000 g. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga de 1,5mL, se añadió 1,5 de su volumen de Buffer AW1 y se aplicó vortex. Se transfirió 650 $\mu\text{L}$  de cada muestra a una columna de giro DNeasy con un tubo de colección de 2mL y fue centrifugada por 1 min a 8000 g, se eliminó el contenido del tubo colector, se reutilizó el tubo para repetir el paso recién mencionado y se eliminó junto con el contenido. Se transfirió la columna de giro DNeasy a un nuevo tubo colector de 2 mL. Se agregó 500 $\mu\text{L}$  de Buffer AW2, se centrifugó a 1 min 8000 g y se descartó el contenido del tubo colector. Se agregó nuevamente 500  $\mu\text{L}$  de Buffer AW2 pero esta vez fue centrifugado por 2 min a 20000 g. Se transfirió la columna de giro DNeasy a tubos de microcentrífuga de 1,5mL, se agregó 100  $\mu\text{L}$  de Buffer AE de elusión y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó por 1 min a 6000 g y se transfirió el contenido del tubo de microcentrífuga a la columna de giro y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. Finalmente se leyó la absorbancia a 230, 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop®.

#### IV.4.3 Protocolo de aislamiento de ARN de Wang y Stegemann<sup>14</sup>:

- Descripción: Este es un método originalmente utilizado para extraer ácidos nucleicos de tejido vegetal que fue adaptado por Wang y Stegemann para ser utilizado en matrices poliméricas. Esta extracción tiene como principal reactivo el buffer básico CTAB (ver anexo 1) cuya función es lisar las células, mantener la integridad del ARN al evitar la unión de polisacáridos a éste, y disolver los componentes celulares. A demás, realiza una purificación con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) por duplicado permitiendo eliminar contaminantes.
- Método: Los SII fueron sumergidos en buffer CTAB a 65°C suplementado con  $\beta$ -mercaptoetanol y a continuación, se trituraron finamente. El producto fue transferido a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Se homogenizó mediante vórtex por 5 min. Luego se incubó con 600  $\mu$ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se aplicó vórtex por 1 min y se centrifugó a 15000 g por 5 min a temperatura ambiente. Se extrajo la fase superior acuosa y se agregó 600  $\mu$ L de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se aplicó vórtex por 1 min y se centrifugó a 15000 g por 5 min a temperatura ambiente. Se aspiró la fase superior, se agregó un volumen equivalente al de la fase superior aspirada de isopropanol y se centrifugó a 15000 g por 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó, el precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 75% y fue centrifugado a 15000 g por 15 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó y el precipitado fue resuspendido en 30 $\mu$ L agua libre de nucleasas. Se leyó la absorbancia a 230, 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop®.

IV.4.4 Protocolo de extracción de ARN utilizando TRIzol® más purificación de solvente extendido<sup>23</sup>.

- Descripción: Este es un método basado en el protocolo de extracción de ARN TRIzol® al que Yu y cols. agregaron dos fases de extracción adicionales; una con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y otra con cloroformo: alcohol isoamílico (49:1) para aumentar la pureza y rendimiento del aislamiento de ARN. En general, es un proceso extenso pero no más complejo que el protocolo de extracción de ARN con TRIzol®.

- Método: Los SII fueron finamente triturados mientras estaban sumergidos en 1 mL de TRIzol®. El producto fue transferido a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, se aplicó sonicador por 1 min y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Se agregó 200 µL de cloroformo, se aplicó vórtex por 15 s. Luego se centrifugó a 12000 g por 15 min a 4°C y se incubó a temperatura ambiente por 3 min. Se extrajo la fase superior acuosa y se depositó en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Se agregó 500 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), siguió una aplicación de vórtex por 15 s, se incubó por 2 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g por 15 min a 4°C. La fase superior acuosa fue recuperada y traspasada a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Se agregó 500 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1) seguido por vórtex durante 15 s, se incubó por 2 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g por 15 min a 4°C. Se colectó la fase superior acuosa y se añadió a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Se agregó 500 µL de isopropanol puro, se mezcló por inversión durante 15 s, se incubó a temperatura ambiente por 10 min y se centrifugó a 12000 g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue descartado y el precipitado de ARN se lavó con 500 µL de etanol al 70%. Se centrifugó a 12000 g por 10 min a

4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 30 µL de agua libre de nucleasas. Se leyó la absorbancia a 230, 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop®.

#### IV.5 Retrotranscripción:

Para realizar esta técnica en las muestras de ARN se prepararon dos tubos de centrífuga de 200 µL, uno con la muestra con retrotranscriptasa y otra carente de enzima como control. A cada tubo se le agregó 4µL de muestra de ARN, 1µL de Oligo dT y se incubó en Termociclador (Thermo cycler Electron Corporation modelo PxE 0.5) bajo las siguientes condiciones: etapa 1: 70°C por 5 min; etapa 2: 4°C por 5 min. Posteriormente, al mismo tubo se le agregó los volúmenes descritos en la tabla 5.1 de los reactivos provenientes del kit Improm® (Promega, EEUU).

| <b>Tabla5.1 Volúmenes de reactivos a añadir en las muestras tratadas con OligodT</b> |                |
|--|----------------|
| Reactivos  | Volúmenes (µL) |
| Agua libre de nucleasas  | 6,1            |
| Buffer Improm®   | 4,0            |
| MgCl <sub>2</sub> 25mM   | 2,4            |
| dNTP   | 1,0            |
| Inhibidor de ARNasas   | 0,5            |

Luego de homogeneizar se volvió a incubar en el termociclador bajo las siguientes condiciones: etapa 1: 25°C por 5 min; etapa 2: 42°C por 1h; etapa 3: 70°C por 15 min y etapa 4: 4°C por 5 min. El ADN complementario (ADNc) resultante se utilizó para realizar la técnica de PCR en tiempo real.

#### IV.6 Reacción de Polimerasa en Cadena en Tiempo Real (q-PCR):

Se preparó una solución de trabajo stock de 32µL (para 4 capilares): 20,4 µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, 1,6 µL de MgCl<sub>2</sub>, 2µL de partidor S 0,5 µM, 2µL de partidor AS 0,5 µL del gen a amplificar, 2µL de DMSO y 4µL de la solución de PCR LightCycler® FastStar DNA Master SYBR GREEN I (Roche®), que contiene: Taq ADN polimerasa, dATP, dCTP, dGTP, dTTP y la sonda SYBR GREEN I. Se homogenizó y se traspasó 8µL de esta mezcla a cada uno de los 3 capilares de 20µL para PCR a utilizar (LightCycler® 1,5) y se agregó 2 µL de ADNc de la muestra control negativo, la muestra de ARN aislada y el control positivo en su respectivo capilar.

La secuencia de los partidores utilizados fueron diseñadas mediante software AmplifX 1.37 y fueron sintetizadas por Invitrogen®, correspondiendo a las siguientes:

hGAPDH2 sentido: 5'-CAAATCAAGTGGGGCGATGCTG-3'

hGAPDH2 antisentido: 5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCACGAT-3'

Para corroborar la existencia de un único producto de amplificación, se sometió cada muestra a un análisis de denaturación (curva de melting) para los amplicones de GAPDH (temperatura de denaturación =  $88,0 \pm 0,5^{27}$ ) que se realizó inmediatamente después del proceso de amplificación.

El programa de amplificación para GAPDH fue:

- Preincubación: 95°C por 10s a 20°C/s.
- Amplificación: Denaturación: 95°C por 10s a 20°C/s.

Hibridación 57°C por 5 s a 20°C/s.

Extensión: 72°C por 12s a 20°C/s.

- Curva de fusión: 95°C por 0 s a 20°C/s.

65°C por 15 s.

95°C por 0 s a 0,10°C/s. Con lectura continua de fluorescencia.

## V. Resultados

### V.1.1 Componente celular:

Todas las extracciones se realizaron con células provenientes de distintos pacientes.

### V.1.2 Extracción de ARN

#### V.1.2.1 Densidad de 25.000células/cm<sup>2</sup> con 3 días de incubación.

Se evaluó la pureza en relación a contaminación por proteína (A 260/280) y por solventes y polisacáridos (A 260/230) y rendimiento de la extracción de ARN (A 260nm) en células de encía cultivadas en los SII con el método trizol® y el de TRizol® con purificación de solvente extendido, con y sin digestión enzimática. Los resultados se pueden observar en detalle en las tablas 1 y 2 respectivamente.

| <b>Tabla 1. Razones de absorbancia, concentración y cantidad total de ARN de muestras obtenidas de cultivos de células sembradas en SII por el protocolo TRizol®.(Detalles en anexo 2)</b> |                             |                |                |                            |                                   |
|--|-----------------------------|----------------|----------------|----------------------------|-----------------------------------|
| <b>Muestras</b>  | <b>Digestión enzimática</b> | <b>260/280</b> | <b>260/230</b> | <b>Concentración ng/μL</b> | <b>Cantidad total de ARN (μg)</b> |
| A <sub>1</sub>   | Sin                         | 1,30±0,18      | 0,39±0,14      | 440,0±98,5                 | 10,2±3,0                          |
| A <sub>2</sub>   | Con                         | 1,18±0,02      | 0,26±0,01      | 516,7±84,6                 | 15,5±2,5                          |

| <b>Tabla 2. Razones de absorbancia, concentración y cantidad total de ARN de muestras obtenidas de cultivos de células sembradas en SII por el protocolo TRizol® con purificación de solvente extendido (Yu y cols.).(Detalles en anexo 3)</b> |                             |                |                |                            |                                   |
|--|-----------------------------|----------------|----------------|----------------------------|-----------------------------------|
| <b>Muestras</b>  | <b>Digestión enzimática</b> | <b>260/280</b> | <b>260/230</b> | <b>Concentración ng/μL</b> | <b>Cantidad total de ARN (μg)</b> |
| A <sub>1</sub>   | Sin                         | 1,29±0,07      | 0,34±0,05      | 142,6±40,1                 | 4,3±1,2                           |
| A <sub>2</sub>   | Con                         | 1,16±0,05      | 0,32±0,03      | 190,3±19,5                 | 5,7±0,6                           |



El promedio de la concentración de ARN obtenida por el protocolo TRIzol® fue superior a su contraparte con purificación por solvente extendido independiente de la digestión enzimática previa. Con respecto al promedio de la razón de absorbancia 260/230, ambos métodos son limitados, siendo las muestras tratadas por digestión enzimática las más deficientes, especialmente en el caso de TRIzol®. También en los dos protocolos, tanto en las muestras con y sin digestión enzimática, los promedios de la razón de absorbancia 260/280 son deficientes.

En el método TRIzol® se obtienen resultados de concentración de ARN mejores que en las muestras tratadas con el método TRIzol® con purificación por solvente extendido. En ambos métodos la mayor concentración de ARN fue obtenida en las muestras que fueron tratadas previamente con proteinasa K.

#### V1.2.2 Densidad de 50.000 células/cm<sup>2</sup> con 5 días de incubación

Se evaluó las muestras de ARN obtenidas de células cultivadas en SII por medio de los métodos de extracción TRIzol®, TRIzol® con purificación de solvente extendido, DNeasy Plant Mini Kit modificado y de Wang y Stegemann.

En estas experiencias se consideró un blanco, es decir un SII sin cultivar que se trabajó bajo las mismas condiciones de extracción a las que se sometieron los SII cultivados, para confirmar si los residuos de los polímeros generaban interferencia con la lectura de absorbancia. Además, se aumentó la cantidad de células sembradas y el tiempo de incubación para mejorar el rendimiento de ARN.

Los resultados se detallan en la tablas 3 (TRIzol®), 4 (TRIzol® con purificación de solvente extendido), 5(DNeasy Plant Mini Kit modificado y 6(Wang y Stegemann).

**Tabla 3. Razones de absorbancia, concentración y cantidad total de ARN de muestras obtenidas de cultivos de células sembradas en SII por el protocolo TRIzol®.(Detalles en anexos 4)**

| Muestras              | Digestión enzimática | 260/280         | 260/230         | Concentración ng/ $\mu$ L | Cantidad total de ARN ( $\mu$ g) |
|-----------------------|----------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|----------------------------------|
| A <sub>1</sub>        | Sin                  | 1,23 $\pm$ 0,03 | 0,34 $\pm$ 0,05 | 183,1 $\pm$ 90,0          | 5,5 $\pm$ 2,7                    |
| Blanco A <sub>1</sub> | Sin                  | 1,17 $\pm$ 0,01 | 0,23 $\pm$ 0,01 | 404,6 $\pm$ 5,8           | -----                            |
| A <sub>2</sub>        | Con                  | 1,19 $\pm$ 0,02 | 0,35 $\pm$ 0,10 | 187,7 $\pm$ 115,7         | 5,6 $\pm$ 3,5                    |
| Blanco A <sub>2</sub> | Con                  | 1,18 $\pm$ 0,01 | 0,24 $\pm$ 0,03 | 182,7 $\pm$ 3,8           | -----                            |

**Tabla 4. Razones de absorbancia, concentración y cantidad total de ARN de muestras obtenidas de cultivos de células sembradas en SII por el protocolo TRIzol® con extracción por solvente extendido (Yu y cols.). (Detalles en anexo 5)**

| Muestras              | Digestión enzimática | 260/280         | 260/230         | Concentración ng/ $\mu$ L | Cantidad total de ARN ( $\mu$ g) |
|-----------------------|----------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|----------------------------------|
| A <sub>1</sub>        | Sin                  | 1,17 $\pm$ 0,10 | 0,27 $\pm$ 0,02 | 168,2 $\pm$ 24,5          | 5,0 $\pm$ 0,8                    |
| Blanco A <sub>1</sub> | Sin                  | 1,08 $\pm$ 0,09 | 0,20 $\pm$ 0,02 | 152,9 $\pm$ 19,9          | -----                            |
| A <sub>2</sub>        | Con                  | 1,10 $\pm$ 0,15 | 0,19 $\pm$ 0,05 | 253,4 $\pm$ 57,3          | 7,6 $\pm$ 1,7                    |
| Blanco A <sub>2</sub> | Con                  | 1,13 $\pm$ 0,04 | 0,22 $\pm$ 0,04 | 180,8 $\pm$ 25,7          | -----                            |

**Tabla 5. Razones de absorbancia, concentración y cantidad total de ARN de muestras obtenidas de cultivos de células sembradas en SII por el protocolo DNeasy Plant Mini Kit modificación.(Detalles en anexo 6)**

| Muestras              | Digestión enzimática | 260/280         | 260/230         | Concentración n ng/ $\mu$ L | Cantidad total de ARN ( $\mu$ g) |
|-----------------------|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------------------|----------------------------------|
| A <sub>1</sub>        | Sin                  | 1,24 $\pm$ 0,34 | 0,27 $\pm$ 0,02 | 2,2 $\pm$ 0,6               | 0,2 $\pm$ 0,1                    |
| Blanco A <sub>1</sub> | Sin                  | 0,55 $\pm$ 0,07 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,6 $\pm$ 0,2               | -----                            |
| A <sub>2</sub>        | Con                  | 0,73 $\pm$ 0,14 | 0,17 $\pm$ 0,10 | 1,6 $\pm$ 1,2               | 0,2 $\pm$ 0,1                    |
| Blanco A <sub>2</sub> | Con                  | 1,13 $\pm$ 0,04 | 0,22 $\pm$ 0,04 | 0,7 $\pm$ 0,3               | -----                            |

**Tabla 6. Razones de absorbancia, concentración y cantidad total de ARN de muestras obtenidas de cultivos de células sembradas en SII por el protocolo de Wang y Stegemann.(Detalles en anexo 7)**

| Muestras              | Digestión enzimática | 260/280         | 260/230         | Concentración ng/ $\mu$ L | Cantidad total de ARN ( $\mu$ g) |
|-----------------------|----------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|----------------------------------|
| A <sub>1</sub>        | Sin                  | 0,84 $\pm$ 0,05 | 0,16 $\pm$ 0,03 | 48,1 $\pm$ 6,8            | 1,4 $\pm$ 0,2                    |
| Blanco A <sub>1</sub> | Sin                  | 0,78 $\pm$ 0,01 | 0,14 $\pm$ 0,01 | 44,0 $\pm$ 9,7            | -----                            |
| A <sub>2</sub>        | Con                  | 0,80 $\pm$ 0,01 | 0,13 $\pm$ 0,01 | 32,7 $\pm$ 7,2            | 1,0 $\pm$ 0,2                    |
| Blanco A <sub>2</sub> | Con                  | 0,77 $\pm$ 0,03 | 0,13 $\pm$ 0,01 | 21,8 $\pm$ 3,3            | -----                            |

En el método TRIzol®, TRIzol® con purificación por solvente extendido y de Wang y Stegemann los blanco tienen razones de pureza y concentración similares a las muestras de ARN obtenidas de los SII de implantes cultivados, es más, en el método TRIzol® se observó una mayor concentración de ARN en las muestras blanco no tratadas con proteinasa K aun cuando estas muestras no contienen células, y por tanto, material genético.

En el caso de las muestras tratadas con el método DNeasy Plant Mini Kit Qiagen® con protocolo modificado los resultados muestran concentraciones bajas de ARN en todas las muestras en comparación con los otros métodos. Sin embargo, cuando se revisan los resultados de ambas razones de pureza en los blancos sin digestión enzimática previa se aprecian cifras menores que en las otras muestras tratadas en igualdad de condiciones. En cambio, en los blancos de las muestras que fueron tratadas con proteinasa K se aprecian mayores valores de pureza que las muestras que contenían ARN. Este protocolo presentó la menor cantidad de ARN extraído en comparación con los demás métodos.

Las muestras de ARN aisladas con el protocolo de Wang y Stegemann arrojan los resultados más bajos de pureza en comparación con los otros 3 protocolos de extracción.

V1.2.3 Densidades de 50.000, 250.000, y 500.000 células/cm<sup>2</sup> con 7 días de incubación

Se evaluó la calidad y rendimiento de extracción de ARN obtenidos a partir de diferentes densidades de celulares sembradas en SII por medio de los métodos de extracción TRIzol®, TRIzol® con purificación de solvente extendido, DNeasy Plant Mini Kit modificado y de Wang y Stegemann.

Los resultados detallados se presentan en la tablas 7 (TRIzol®), 8 (TRIzol® con purificación de solvente extendido), 9(DNeasy Plant Mini Kit modificado) y 10(Wang y Stegemann).

| <b>Tabla 7. Razones de absorbancia, concentración y cantidad total de ARN de muestras obtenidas de cultivos de células sembradas en SII por el protocolo TRIzol®.(Detalles de anexo 8)</b> |   |                             |                |                |                            |                                   |
|--|---|-----------------------------|----------------|----------------|----------------------------|-----------------------------------|
| <b>Muestras</b>  | <b>densidad Células x 1000/cm<sup>2</sup></b> | <b>Digestión enzimática</b> | <b>260/280</b> | <b>260/230</b> | <b>Concentración ng/μL</b> | <b>Cantidad total de ARN (μg)</b> |
| A <sub>1</sub>   | 50  | Sin                         | 1,23±0,05      | 0,53±0,12      | 220,7±79,9                 | 6,6±2,4                           |
| B <sub>1</sub>   | 250   | Sin                         | 1,20±0,08      | 0,66±0,08      | 173,8±38,2                 | 5,2±1,1                           |
| C <sub>1</sub>   | 500   | Sin                         | 1,06±0,08      | 0,56±0,11      | 163,7±24,5                 | 4,9±0,7                           |
| Blanco <sub>1</sub>  | --  | Sin                         | 1,17±0,01      | 0,42±0,04      | 276,1±104,8                | -----                             |
| A <sub>2</sub>   | 50  | Con                         | 1,11±0,04      | 0,28±0,12      | 138,3±83,8                 | 4,1±2,5                           |
| B <sub>2</sub>   | 250   | Con                         | 1,11±0,06      | 0,25±0,05      | 120,6±20,4                 | 3,6±0,6                           |
| C <sub>2</sub>   | 500   | Con                         | 1,17±0,04      | 0,23±0,08      | 151,9±40,1                 | 4,5±1,2                           |
| Blanco <sub>2</sub>  | --  | Con                         | 1,18±0,01      | 0,24±0,03      | 182,8±3,7                  | -----                             |

**Tabla 8. Razones de absorbancia, concentración y cantidad total de ARN de muestras obtenidas de cultivos de sembradas en SII por el protocolo TRizol® con purificación de solvente extendido (Yu y Co/s). (Detalles anexos 9)**

| Muestras            | Densidad Células x 1000/cm <sup>2</sup> | Digestión Enzimática | 260/280   | 260/230   | Concentración ng/μL | Cantidad total de ARN (μg) |
|---------------------|---|----------------------|-----------|-----------|---------------------|----------------------------|
| A <sub>1</sub>      | 50                                      | Sin                  | 1,27±0,11 | 0,29±0,06 | 168,6±21,8          | 5,0±0,6                    |
| B <sub>1</sub>      | 250                                     | Sin                  | 1,13±0,09 | 0,28±0,10 | 151,6±54,6          | 4,6±1,6                    |
| C <sub>1</sub>      | 500                                     | Sin                  | 1,19±0,15 | 0,28±0,06 | 183,9±28,2          | 5,5±0,9                    |
| Blanco <sub>1</sub> | --                                      | Sin                  | 1,10±0,07 | 0,20±0,01 | 144,8±3,0           | -----                      |
| A <sub>2</sub>      | 50                                      | Con                  | 1,01±0,06 | 0,20±0,05 | 208,6±63,2          | 6,3±1,9                    |
| B <sub>2</sub>      | 250                                     | Con                  | 1,11±0,07 | 0,17±0,04 | 131,1±27,4          | 3,9±0,8                    |
| C <sub>2</sub>      | 500                                     | Con                  | 1,07±0,10 | 0,20±0,08 | 141,3±9,7           | 4,2±0,3                    |
| Blanco <sub>2</sub> | --                                      | Con                  | 1,12±0,05 | 0,22±0,04 | 171,8±15,8          | -----                      |

**Tabla 9. Razones de absorbancia, concentración y cantidad total de ARN de muestras obtenidas de cultivos de células de pared vestibular sembradas en SII por el protocolo modificado DNeasy Plant Mini Kit Qiagen®.(detalles en anexo 10)**

| Muestras            | Densidad Células x 1000/cm <sup>2</sup> | Digestión Enzimática | 260/280   | 260/230   | Concentración ng/μL | Cantidad total de ARN (μg) |
|---------------------|---|----------------------|-----------|-----------|---------------------|----------------------------|
| A <sub>1</sub>      | 50                                      | Sin                  | 1,82±0,23 | 2,09±0,58 | 2,3±1,0             | 0,2±0,1                    |
| B <sub>1</sub>      | 250                                     | Sin                  | 1,10±0,16 | 1,00±0,01 | 1,6±1,4             | 0,2±0,1                    |
| C <sub>1</sub>      | 500                                     | Sin                  | 1,20±0,06 | 2,08±0,12 | 1,7±0,1             | 0,2±0,0                    |
| Blanco <sub>1</sub> | --                                      | Sin                  | 0,14±0,16 | 0,02±0,04 | 0,2±0,4             | -----                      |
| A <sub>2</sub>      | 50                                      | Con                  | 1,25±0,21 | 0,40±0,23 | 0,8±0,4             | 0,1±0,0                    |
| B <sub>2</sub>      | 250                                     | Con                  | 0,92±0,41 | 0,28±0,04 | 1,1±0,4             | 0,1±0,0                    |
| C <sub>2</sub>      | 500                                     | Con                  | 0,26±0,01 | 0,44±0,24 | 1,1±0,1             | 0,1±0,0                    |
| Blanco <sub>2</sub> | --                                      | Con                  | 0,24±0,16 | 0,14±0,01 | 2,1±2,5             | -----                      |

| <b>Tabla 10. Razones de absorbancia, concentración y cantidad total de ARN de muestras obtenidas de cultivos de células de pared vestibular sembradas en SII por el protocolo de Wang y Stegemann.(detalles en anexo 11)</b> |   |                             |                |                |                            |                                   |
|--|---|-----------------------------|----------------|----------------|----------------------------|-----------------------------------|
| <b>Muestras</b>  | <b>densidad células x 1000/cm<sup>2</sup></b> | <b>Digestión enzimática</b> | <b>260/280</b> | <b>260/230</b> | <b>Concentración ng/μL</b> | <b>Cantidad total de ARN (μg)</b> |
| A <sub>1</sub>   | 50  | Sin                         | 0,74±0,11      | 0,12±0,02      | 52,0±2,4                   | 1,5±0,1                           |
| B <sub>1</sub>   | 250   | Sin                         | 0,78±0,01      | 0,15±0,03      | 50,8±8,2                   | 1,5±0,2                           |
| C <sub>1</sub>   | 500   | Sin                         | 0,81±0,02      | 0,12±0,02      | 31,0±5,6                   | 0,9±0,2                           |
| Blanco <sub>1</sub>  | --  | Sin                         | 0,74±0,01      | 0,13±0,00      | 51,4±3,4                   | -----                             |
| A <sub>2</sub>   | 50  | Con                         | 0,76±0,04      | 0,12±0,01      | 31,3±3,3                   | 0,9±0,1                           |
| B <sub>2</sub>   | 250   | Con                         | 0,78±0,03      | 0,13±0,01      | 33,3±6,8                   | 1,0±0,2                           |
| C <sub>2</sub>   | 500   | Con                         | 0,73±0,05      | 0,15±0,02      | 22,5±2,9                   | 0,7±0,1                           |
| Blanco <sub>2</sub>  | --  | Con                         | 0,70±0,07      | 0,12±0,04      | 21,2±0,2                   | -----                             |

El protocolo propuesto por Wang y Stegemann sigue teniendo los resultados más bajos de pureza en comparación con los otros métodos de extracción, no apreciándose diferencia entre las muestras de ARN y los blancos tanto de las muestras tratadas como las no tratadas con digestión enzimática.

En el método TRIzol®, TRIzol® con purificación por solvente extendido y de Wang y Stegemann nuevamente los blanco tienen razones de pureza y concentración similares a las muestras de ARN obtenidas de los SII de implantes cultivados y la evaluación de distintas densidades no presentaron una mejoría en los resultados.

En el caso del protocolo *DNeasy Plant Mini Kit Qiagen®* modificado, el promedio de las razones de pureza 260/280 y 260/230 de la muestra A<sub>1</sub> fueron 1,82 y 2,09 respectivamente. Además en el blanco<sub>1</sub> las razones de pureza fueron cercanas a cero lo que indica que las lecturas de ARN de las muestras A<sub>1</sub> no son artificiales. Por el contrario el uso de proteinasa K como digestión enzimática previa en las células cultivadas en los SII no presentó una ventaja en los resultados. Éste protocolo nuevamente presentó la menor cantidad de ARN total extraído en comparación con los demás.

V1.2.4 Densidades de 50.000, 500.000 y 750.000 células/cm<sup>2</sup> con 7 días de incubación utilizando el método con mejores resultados.

Se evaluó las muestras de ARN obtenidas de células cultivadas en SII por medio del método de extracción DNeasy Plant Mini Kit modificado con y sin incubación con ADNasa (ver sección IV.4.2).

Se decidió incluir una densidad de células sembradas mayor que en las otras experiencias para evaluar si eso aumentaba la concentración de ARN al utilizar ADNasa.

Los resultados se encuentran detallados en la tabla 11 (con ADNasa) y 12 (sin ADNasa). El anexo 12 describe los datos individuales para esta experiencia.

| <b>Tabla 11. Razones de absorbancia, concentración y cantidad total de ARN de muestras obtenidas de cultivos de células sembradas en SII por protocolo modificado DNeasy Plant Mini Kit Qiagen® utilizando ADNasa.</b> |  |                |                |                            |                                   |
|--|--|----------------|----------------|----------------------------|-----------------------------------|
| <b>Muestras</b>  | <b>Densidad de Células x 1000/cm<sup>2</sup></b> | <b>260/280</b> | <b>260/230</b> | <b>Concentración ng/μL</b> | <b>Cantidad total de ARN (μg)</b> |
| A <sub>1</sub>   | 50   | 0,86±0,19      | 0,60±0,15      | 1,4±0,1                    | 0,1±0,0                           |
| B <sub>1</sub>   | 500  | 0,80±0,36      | 0,66±0,39      | 1,1±0,1                    | 0,1±0,0                           |
| C <sub>1</sub>   | 750  | 1,07±0,65      | 0,52±0,25      | 2,1±2,0                    | 0,2±0,2                           |
| Blanco <sub>1</sub>  | --   | 1,82±0,98      | 0,10±0,12      | 0,8±0,7                    | 0,1±0,1                           |

| <b>Tabla 12. Razones de absorbancia, concentración y cantidad total de ARN de muestras obtenidas de cultivos de células sembradas en SII por protocolo modificado DNeasy Plant Mini Kit Qiagen®.(Detalles en anexo 13)</b> |                                   |                |                |                            |                                   |
|--|-----------------------------------|----------------|----------------|----------------------------|-----------------------------------|
| <b>Muestras</b>  | <b>Densidad de Células x 1000</b> | <b>260/280</b> | <b>260/230</b> | <b>Concentración ng/μL</b> | <b>Cantidad total de ARN (μg)</b> |
| A <sub>1</sub>   | 50                                | 1,56±0,27      | 0,45±0,49      | 2,0±0,4                    | 0,2±0,0                           |
| B <sub>1</sub>   | 500                               | 1,88±0,44      | 0,60±0,14      | 5,9±0,6                    | 0,6±0,0                           |
| C <sub>1</sub>   | 750                               | 2,00±0,00      | 0,41±0,16      | 3,0±0,1                    | 0,3±0,0                           |
| Blanco <sub>1</sub>  | --                                | 0,14±0,10      | 0,04±0,02      | 0,4±0,1                    | 0,0±0,0                           |

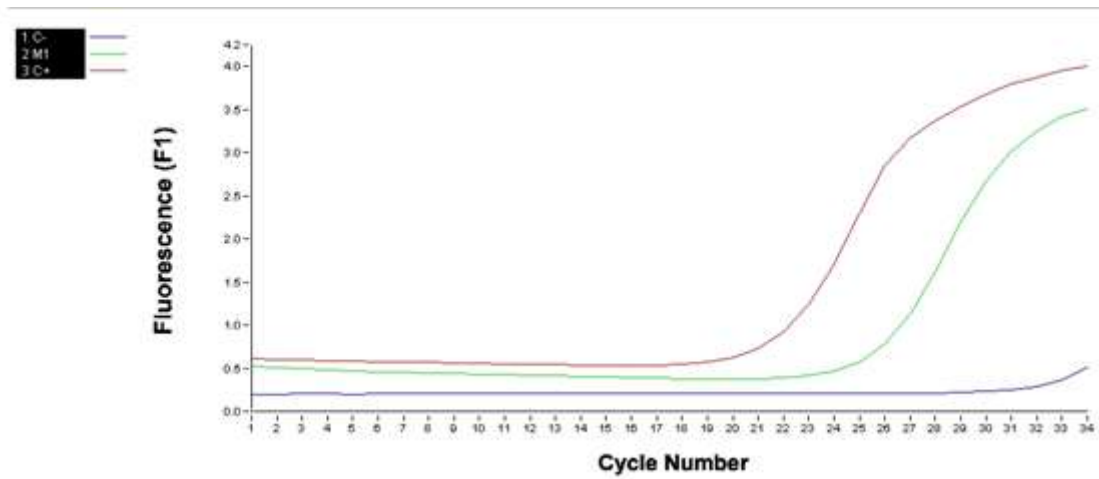
La utilización de ADNasa no presentó una ventaja en los resultados de pureza y rendimiento buscados. Los resultados de ambas razones de pureza y la concentración de ARN en los blancos al utilizar ADNasa son mayores que en los blancos donde no se utilizó la nucleasa, mostrando un mayor grado de contaminación. Por otra parte, en las muestras de ARN extraídas de los cultivos de células en los SII se puede observar que en la razón de pureza 260/280 existe una gran diferencia entre ambos ensayos, con el uso de ADNasa perjudicando los valores obtenidos. En cambio en la razón de pureza 260/230 se vislumbró una leve mejora en los resultados al utilizar ADNasa en las muestras.

### V1.3 PCR en Tiempo Real utilizado para amplificar GAPDH:

La reacción de transcripción reversa y PCR se realizaron en una muestra seleccionada según sus parámetros de pureza y rendimiento (muestra A<sub>2</sub> sin digestión enzimática previa, detalles en anexo 10). Esta fue obtenida por el protocolo de extracción de ARN DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen®, cuyos resultados se presentan en la tabla 9.

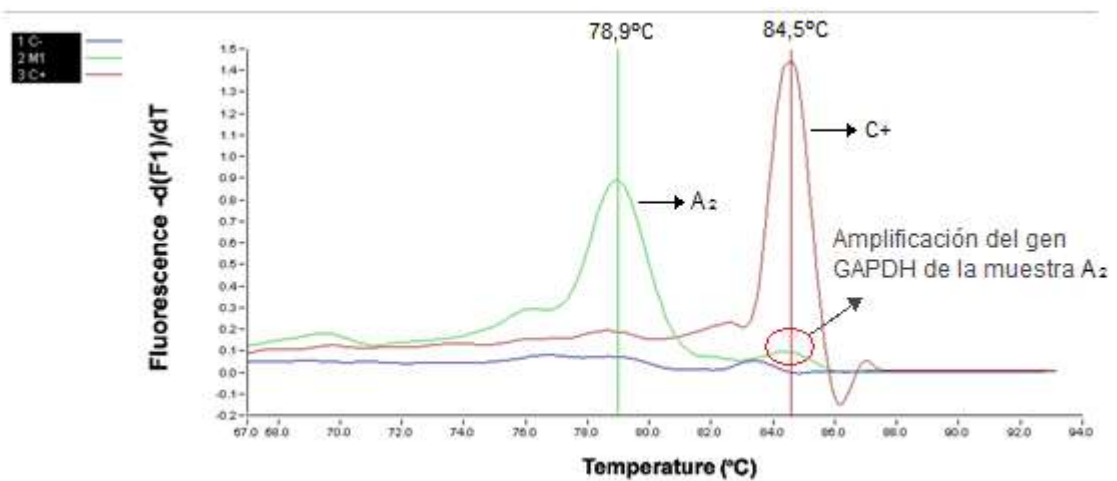
El gen constitutivo GAPDH presentó amplificación positiva aproximadamente a los 25 ciclos. Un ADNc control obtenido en el laboratorio desde cultivos en monocapa amplificó a los 22 ciclos. La curva de amplificación se presenta en la figura 3.





**Figura 3. Curva de amplificación GAPDH.** En rojo amplificación de ADNc control positivo, en verde ADNc proveniente del SII y azul, control negativo.

Sin embargo, la curva de fusión presentada en la figura 4 demuestra que el producto de amplificación contiene señales inespecíficas cuya temperatura de denaturación fue 78,9°C. Aún así se observa una señal menor que coincide con la temperatura de denaturación del gen constitutivo GAPDH que es de 84,5°C, siendo esta menos que la temperatura teórica de  $88,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ .



**Figura 4. Curva de fusión para GAPDH.** En rojo amplificación de una muestra control positivo (C+), verde de una muestra proveniente del SII (A<sub>2</sub>) y azul es una muestra control negativo.

## VI Discusión

El establecer un método de aislamiento de ARN desde células cultivadas en matrices poliméricas se ha vuelto una necesidad para estudiar los procesos moleculares que se desencadenan en la célula al interactuar con estos andamiajes y poder comprender estas respuestas a nivel molecular mediante ensayos de tales como PCR en tiempo real. Tener conocimiento de esta información permitiría a la ingeniería de tejidos realizar las modificaciones necesarias a las matrices para optimizar la respuesta celular para una aplicación en específico. Sin embargo, la extracción de ARN de alta calidad, especialmente en matrices que contienen polisacáridos, se ha transformado en un desafío desde el punto de vista técnico. Es por esto que en este estudio se realizó un análisis comparativo de distintos métodos de aislación de ARN proveniente de células sembradas en una matriz polimérica conformada por: gelatina, quitosano y ácido hialurónico en proporción 7:2:1, una matriz que actualmente se utiliza en ensayos clínicos para tratamiento de lesiones cutáneas de espesor total.

### VI.1 Extracción de ARN en SII con una densidad de células de 25.000/cm<sup>2</sup> y 3 días de incubación

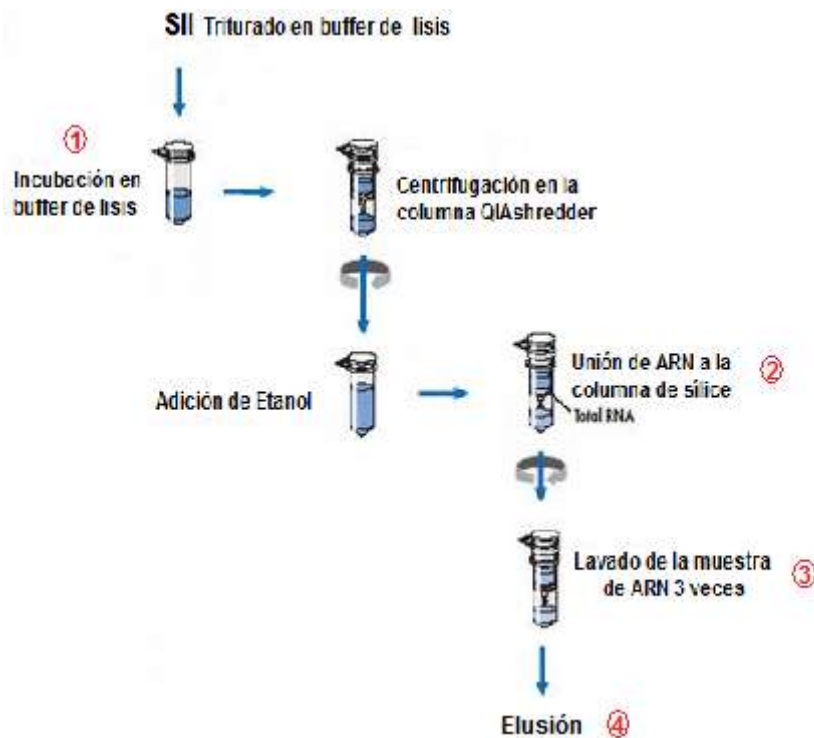
En ambos métodos de extracción (tablas 1 y 2), la pureza espectroscópica de las muestras de ARN señalan una gran contaminación con polisacáridos (razón de absorbancia 260/230 mucho menor a 1) proveniente de la matriz polimérica. A esto se suma un nivel considerable de contaminación por proteínas (razón de absorbancia 260/280 cercano a 1). Este exceso de impurezas hace pensar que las propiedades físicas del polímero interfieren, no solo de forma química, sino que también mecánica en el proceso de extracción, esto debido a que al tener este sistema una consistencia semisólida entrecruzada químicamente, dificulta más el trabajo extractivo al compararse

con los hidrogeles utilizados como andamiajes en los trabajos de Wang y Stegemann y Yu *et al*<sup>23, 25</sup>. Si bien los resultados de pureza no son los requeridos para trabajos posteriores en técnicas de biología molecular, las concentraciones obtenidas por el método TRIzol® son casi 4 veces más altas que las obtenidas por el método TRIzol® con solvente extendido de Yu *et al*. Posiblemente estos resultados son producto de la purificación extendida por solvente, donde tras cada extracción agregada se pierde material genético por la formación de complejos ARN-polisacáridos como por las condiciones levemente ácidas en las que se trabaja al hacer la extracción con cloroformo alcohol:isoamílico (49:1). También es un factor a considerar el arrastre a la fase orgánica del ARN, el cual queda atrapado en los fragmentos de polímero de mayor tamaño al centrifugar, precipitando en conjunto con el material interferente, lo que disminuye la cantidad de material genético efectivamente aislado<sup>23,25,31</sup>.

#### VI.2 Densidad de 50.000 células/cm<sup>2</sup> con 5 días de incubación

En 3 de los 4 métodos de extracción utilizados, los blancos sometidos y no sometidos a digestión enzimática tenían razones de absorbancia y concentración similares a las muestras de ARN aún cuando estos no tenían células. Esto significa que las partículas de polímero que posiblemente quedaron tras los procesos de extracción absorben a la misma longitud de onda que el ARN, fenómeno que da cuenta de la considerable interferencia espectroscópica presente en las muestras, la cual conduce a la cuantificación errónea del material extraído. Esta es una observación de gran relevancia y es un aporte al estado del arte, ya que otros estudios reportados en la literatura no consideran este control, que es de obvia importancia en la evaluación de un método para la extracción de ácidos nucleicos desde células cultivadas en matrices poliméricas.

Por otra parte, se destacan los resultados del método *DNeasy Plant Mini Kit* en el cual el blanco sin tratar con digestión enzimática muestra razones de absorbancia 260/280 y 260/230 iguales a cero. Este método no se basa en el principio de extracción por separación de fases como los métodos TRIzol®, TRIzol® con purificación por solvente extendido y CTAB (Wang y Stegemann), sino que efectúa la extracción y posterior purificación de material genético mediante columnas de sílice (figura 5).



**Figura 5. Extracción de ARN utilizando el protocolo *DNeasy Plant Mini Kit* modificado.** Paso 1: lisis de la célula. Paso 2: Unión de ARN a la columna de sílice. Paso 3: Lavar el ARN unido a la columna de sílice. Paso 5: Elusión del ARN con H<sub>2</sub>O libre de nucleasas o buffer de elusión.

Este protocolo presenta la desventaja de un bajo rendimiento de ARN respecto a los otros. Sin embargo, resulta más relevante tener un cierto grado de certeza que, especialmente en el caso de las muestras no tratadas con proteinasa K, se cuenta efectivamente con ARN dado que los blancos de éstas poseen absorbancias cercanas a 0. Si se considera que el ARN se puede amplificar, una vez que se retrotranscribe, resulta de mayor importancia contar con un material de suficiente pureza para uso posterior en biología molecular. En este sentido, se considera este protocolo satisfactorio para trabajar en estudios de expresión génica para células cultivadas en matrices poliméricas.

En los protocolos TRIzol® y TRIzol® con purificación por solvente extendido, no se observa una mejora en las razones de pureza en comparación con el primer ensayo a pesar de haber aumentado el tiempo de incubación y la cantidad de células. Esto posiblemente se debe al grado de interferencia provocado por la matriz polimérica demostrado en las señales arrojadas en el blanco.

En el caso del protocolo de Wang y Stegemann, en el cual se utiliza el buffer de extracción con el agente tensoactivo CTAB, los resultados exhibieron valores bajos, contrastando los resultados que estos autores obtuvieron al aplicar su método y el propuesto por Yu *et al.* Esto puede atribuirse a las propiedades mecánicas del polímero. El quitosano (biomaterial utilizado para conformar el SII) es un polisacárido de naturaleza ácida, por ende al estar a un pH ácido este tiende a estar protonado, o dicho de otra forma, adquiere carga positiva y forma complejos con moléculas de carga negativa, como el ARN disminuyendo el rendimiento de la extracción. Ante esto el buffer de extracción con el agente tensoactivo CTAB presenta una ventaja por sobre los otros métodos de extracción, ya que este buffer es una solución básica con un pH cercano a 8 que evita la protonación del quitosano, a diferencia de los otros métodos utilizados que

trabajan con buffers en condiciones levemente ácidas.<sup>20,22,25,28</sup>. Sin embargo, el Sistema de Implante Integrado tiene la característica de ser semisólido (entrecruzado químicamente) y no un hidrogel de dos componentes y baja resistencia mecánica como en los trabajos de Wang y Stegemann y Yu y cols. Además, el SII fue disgregado solamente con tijeras estériles dejando, quizás, trozos de un tamaño lo suficientemente grandes como para evitar una completa interacción entre el buffer y las células, provocando una coprecipitación al momento de centrifugar, efecto que disminuye el rendimiento de la extracción. Este problema pudo haber afectado también a las muestras de ARN extraídas con el método TRIzol® y TRIzol® con purificación por solvente extendido. En el caso de la razón de absorbancia 260/280, esta es considerablemente más baja que las obtenidas mediante otros métodos, esto pudo deberse a los reactivos que componen el buffer. La polivinilpirrolidona (PVP) soluble, que previene la oxidación de polifenoles (detalles en anexo 1), puede interactuar con el fenol dificultando la extracción y provocando contaminación por solvente, por ende este último no se utiliza en el protocolo. El problema yace en que se ha demostrado que las soluciones extractivas que contienen fenol son más eficientes en la remoción de residuos proteicos que las soluciones basadas solamente en cloroformo<sup>23, 29, 32</sup>.

### V1.3 Densidades de 50.000, 250.000 y 500.000 células/cm<sup>2</sup> con 7 días de incubación

En esta experiencia se extrae ARN de SII constituidos con distintas densidades de células e incubados por 7 días para corroborar si con el aumento de tiempo de incubación y la densidad de celular se consigue un aumento en el rendimiento de la extracción.

Nuevamente en el método TRIzol®, TRIzol® con purificación por solvente extendido y Wang y Stegemann se observan los mismos resultados que en la experiencia anterior. Esto podría reflejar que los 3 métodos mencionados no son capaces de extraer ARN apreciable en la medición de las razones de pureza porque los blancos siguen teniendo resultados semejantes a las muestras sin importar la cantidad de células sembradas ni el tiempo de incubación.

También cabe destacar que el uso de proteinasa K como agente de digestión enzimática previa a realizar los métodos de extracción no presentó ninguna ventaja en los resultados registrados. Si bien el uso de esta enzima estaba teóricamente justificado por que podría aportar a la desintegración del SII al romper los enlaces peptídicos formados entre los residuos COOH del quitosano y los residuos amina de la gelatina durante el proceso de entrecruzamiento. Esta interacción se logra al añadir una solución hidroalcohólica, compuesta por hidroxisuccinimida (NHS) y 1-etil-3-(3-dietilaminopropil)carbodiimida (EDC), y ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) como agente estabilizador de pH<sup>19</sup>. Por otra parte el uso de proteinasa K se encontraba avalado por sobre el uso de otras enzimas digestivas pues ésta posee propiedades protectoras del material genético al inhibir las nucleasas y puede eliminarse tras la extracción<sup>30</sup>. Se esperaba que el polímero, al perder su integridad, lograra disolverse y liberara las células. Sin embargo, solo se observó una pérdida en la consistencia del polímero, a pesar de la alta concentración de proteinasa K que presentaba la solución 1mg/mL que se utilizaba para incubar el SII por 3, 5 y 7 días.

VI.4 Densidades de 50.000, 500.000 y 750.000 células/cm<sup>2</sup> con 7 días de incubación utilizando el protocolo modificado *DNeasy Plant Mini Kit* con y sin el uso de ADNasa.

Como el protocolo establecido por Qiagen® fue aquel que presentó las mayores razones de pureza, se evaluó la incorporación de ADNasa al método se optimizaban los resultados especialmente para el uso posterior del material en retrotranscripción acoplado a qPCR. A pesar de lo anterior, los resultados no fueron congruentes con la teoría planteada de uso de ADNasa. En el paso dos del protocolo original de DNasa Plant Mini Kit se añadía ARNasa para purificar el ADN a extraer, bajo esta lógica se decidió cambiar este paso y ya sea omitirlo o añadir ADNasa, según corresponda al diseño experimental. Como no se logró tener acceso a la información de la composición del buffer de lisis porque la empresa Qiagen® no lo señala, se ignora si se produjo una incompatibilidad con la solución de ADNasa elaborada utilizando el protocolo del fabricante (Promega®) que pudiera explicar los modestos resultados con esta modificación. Otra explicación posible es que el kit comercial contenga un inhibidor de ADNasa, para favorecer la purificación de ADN, lo que detuvo la acción de la enzima en cuestión. Sea cual sea la razón, en los blancos tratados con el kit con ADNasa se observa una razón de absorbancia 260/280 cercana a 2 aún cuando estos SII no contenían células. Esto lleva a pensar que la incorporación de ADNasa sólo provocó interferencia y resultados artificiales. En consecuencia la aplicación de ADNasa no representa una ventaja en el protocolo en evaluación.

Al comparar los resultados del protocolo modificado DNeasy Plant Mini kit sin ADNasa con los que están expuestos en la tabla 9, específicamente los resultados de las muestras que no fueron sometidas a digestión enzimática y en la que se trabajó el mismo método de extracción bajo las mismas condiciones, se destaca una diferencia sustancial



en las razones de pureza 260/230. En las muestras A<sub>1</sub> no tratadas con proteinasa k de la tabla 9 son cercanas a 2, en cambio en el protocolo de la tabla 12, éstas se encuentran por debajo de 1. Esta diferencia puede deberse a múltiples causas que incluyen errores experimentales en la realización del protocolo o mala deficiente adherencia de las células al polímero, entre otras.

#### VI.5 PCR en Tiempo Real utilizado para amplificar GAPDH:

Con el objetivo de calificar la funcionalidad del ARN para pruebas posteriores de Biología Molecular se efectuó un ensayo de retrotranscripción y posterior amplificación de un gen constitutivo como lo es GAPDH en la muestra A<sub>2</sub> (sin digestión enzimática, detalles en anexo 10), seleccionada por obtener los mejores resultados de pureza y rendimiento.

La curva de amplificación demuestra que la muestra de ADNc producto de la retrotranscripción de la muestra A<sub>2</sub>, anteriormente señalada, amplificó dentro del rango de 20 a 30 ciclos, lo que es aceptable.

En el gráfico de la curva de fusión, específicamente en la curva de la muestra A<sub>2</sub>, podemos observar dos aumentos de fluorescencia: una gran señal de producto inespecífico a los 78,9°C y otra leve que coincide con la temperatura de denaturación del control positivo, que corresponde al gen constitutivo GAPDH, a los 84,5°C. La temperatura teórica del gen constitutivo GAPDH es de 88,0±0,5. Esta diferencia se puede atribuir a que dentro de los reactivos utilizados para llevar a cabo la reacción de amplificación se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO). El DMSO es utilizado en las reacciones de polimerasa en cadena (PCR) para inhibir la formación de estructuras secundarias, como por ejemplo ADN de partidores o “pinzas”, que pueden interferir con la señal del gen de interés que se quiere amplificar. También el utilizar DMSO facilita la amplificación de ADNc que poseen

regiones ricas en C-G (uniones Cisteina-Guanina) porque interfiere en la formación de enlaces de hidrógenos entre ambas cadenas de ADN, disminuyendo la energía requerida para separar las cadenas de ADN y reduciendo la Temperatura de fusión<sup>33</sup>. Independiente de esto se puede afirmar que la muestra A<sub>2</sub> permitió la amplificación del gen constitutivo GAPDH, aunque en poca cantidad. Esto es consistente con una muestra con bajo rendimiento de ARN. Sin embargo, también hay una posibilidad que la muestra de ARN obtenida en la extracción haya estado degradada, por eso se sugiere en un trabajo futuro llevar a cabo un análisis de integridad de ARN por electroforesis antes de realizar PCR en Tiempo Real<sup>23,25</sup>.

En relación a la señal de fluorescencia inespecífica es posible atribuirla a la formación de dímeros de partidores, ya que la muestra A<sub>2</sub> resulta muy diluida dado que en la etapa de elusión del Kit de Qiagen® se aplican 100 µL de buffer de elusión para lograr recuperar el ARN de la columna de sílice, por ende en el proceso de retrotranscripción la cantidad de ADNc del gen de interés probablemente era muy baja, facilitando la formación de los dímeros de partidores antes mencionados. Este fenómeno ha sido reportado en la literatura en condiciones de baja concentración de material de partida<sup>33, 34</sup>. Se propone como una mejora futura para este protocolo, concentrar el ácido nucleico por precipitación o centrifugación al vacío.

El seleccionar un método de aislamiento de ARN apropiado desde matrices utilizadas en ingeniería de tejidos depende en gran medida de las características de las mismas. Actualmente se utilizan una gran variedad de polímeros conformados por distintos biomateriales a los que se les atribuye propiedades particulares y que deben demostrarse no solo a nivel celular sino que también molecular. Esta tesis es una contribución al conocimiento sobre los factores que inciden en una recuperación de ARN

de calidad y rendimiento suficiente para efectuar las necesarias pruebas moleculares que permitan comprender los eventos implicados en la interacción célula-biomaterial.

## **VII Conclusiones**

Se ha establecido una condición de cultivo y protocolo de aislamiento de ARN que permite obtener un producto cuya pureza cumple con los estándares establecidos para realizar trabajos posteriores de biología molecular. Sin embargo, es necesario mejorar el rendimiento de aislamiento de ARN a partir de células sembradas en matrices poliméricas para garantizar la detección y cuantificación génica.

La adición de una digestión enzimática con proteinasa K previa a la extracción de ARN no permite optimizar los resultados.

### **Bibliografía**

1. Judson HF. 1996. The Eighth Day of Creation: Makers of the Revolution in Biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 35-40.
2. Oliva R, Ballesta F, Oriola J, Clària J. 2004. Genética Médica. Universidad de Barcelona. 61-62.
3. Bello F, Fernández C, Más Emilia, Peper M, Preciado M. 2009. Genética: Un enfoque conceptual. Panamericana, España. 266-273.
4. Valpuesta J. Sánchez M. 2008. A la búsqueda del secreto de la vida: Una breve historia de la biología molecular. Hélice, España. 180-182.
5. Claros G. 2003. Aproximación histórica a la biología molecular a través de sus protagonistas, los conceptos y la terminología fundamental. Tribuna Universidad de Malaga España. 168-180.
6. Poptsova M. 2014. Genome Analysis: Current procedures and applications. Caister Academic Press. 23-26.
7. Chomczynski P, Mackey K. 1995. Short technical report. Modification of the TRIZOL reagent procedure for isolation of RNA from Polysaccharide-and proteoglycan-rich sources. Biotechniques 19: 942-5.
8. Matson, Robert S. 2008. Microarray Methods and Protocols. Boca Raton, Florida: CRC. pp. 27–29.
9. Rogers, SO y Bendish AJ. 1988. Extraction of DNA from plant tissues. Plant molecular biology manual, pp. 1- 10.
10. Krieg P. 1996. Laboratory guide to RNA: Isolation, Analysis, and Synthesis. Wiley-Liss.USA. 21-25.
11. Sharma AD, Gill PK y Singh P. 2003. RNA isolation from plant tissues rich in polysaccharides. Analytical Biochemistry. 314:319-32.

12. Murray MG, Thompson WF. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids. Res* 1980;8:4321–4325.
13. Wagner DB, Furnier GR, Saghai-Maroo MA, Williams SM, Dancik BP, Allard RW. 1987. Chloroplast DNA polymorphisms in Lodgepole and Jack pines and their hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:2097-2100.
14. Wang H-L, Greenwell H, Fiorellini J, Giannobile W, Offenbacher S, Salkin L, et al. 2005. Periodontal regeneration. *J. Periodontol.*76:1601–22.
15. Polimeni G, Xiropaidis AV, Wikesjo UME. 2006. Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol* 2000.41:30–47.
16. Buckley MJ, Agarwal S, Gassner R. 1999. Tissue engineering and dentistry. *Clinics in Plastic Surgery.*;26:657–62.
17. Zhong SP, Zhang YZ, Lim CT. 2010. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *Wires Nanomed Nanobiotechnol* 2. 510-525.
18. P. X. Ma. 2004 .Scaffolds for tissue fabrication, *Materials Today.*7:5: 30–40.
19. Reyna M. 2012. Expresión y secreción de factor de crecimiento transformante  $\beta_3$  en células madre mesenquimáticas CD105 positiva. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico. Universidad de Valparaíso. Valparaíso.
20. Hoemann CD, Sun J, Chrzanowski V, Buschmann MD. 2002. A multivalent assay to detect glycosaminoglycan, protein, collagen, RNA, and DNA content in milligram samples of cartilage or hidrogel-based repair cartilage. *Anal Biochem* 2002; 300:1-10.
21. Patrick Jr CW. 2001. Tissue engineering strategies for adipose tissue repair. *The Anatomical Record.*263:361–6.
22. Cerianni R. 2006. Desarrollo de tecnologías para el cultivo de células de piel para trasplante autólogo. Estudios preclínicos realizados en conejos para su posterior uso

en humanos. Memoria para optar al título de profesor de Biología y Ciencias. Universidad de Playa Ancha. Valparaíso.

23. Yu C, Young S, Russo V, Amsden BS, Flynn LE. 2013. Techniques for the isolation of high-quality RNA from cells encapsulated in chitosan hydrogels. *Tissue Engineering: Part C*.19:11.
24. Vasanthaiah, H. K. N, Katam, R., & Sheikh, M. B. 2008. Efficient protocol for isolation of functional RNA from different grape tissue rich in polyphenols and polysaccharides for gene expression studies. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(3).
25. Wang L y Stegemann JP. 2010. Extraction of high-quality RNA from Polysaccharide matrices using cetyltrimethylammonium bromide. *Biomaterials* 31:1612.
26. Chomczynski, P, Sacchi, N. 2006. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on. *Nature Prot.* 1: 581–585.
27. Somoza Palacios R. 2012. Secreción de TGF- $\beta_3$  por células troncales mesenquimáticas y su aplicación en ingeniería de tejidos. Tesis para optar al grado académico de Doctor en Biotecnología. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso y Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso.
28. Kim I, Moon H, Yoo M, Park I, Kim B. 2008. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnol Adv* 26,1.
29. Brawerman G, Mendecki J, Lee S. 1972. A procedure for the isolation of mammalian Messenger ribonucleic acid. *Biochemistry* 11, 637.
30. Miller S, Dykes D, Polesky H. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*; 16:1215.
31. Zeng Y, Yang T. 2002. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Mol. Biol Rep* 20, 417.

32. Salzman R, Fujita T, Zhu-Salzman K, Hasegawa P, Bressan R. 1999. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. *Plant mol Biol Rep* 17,11.
33. Chakrabarti R, Schutt C. 2001. The enhancement of PCR amplification by low molecular-weight sulfones. *Gene* 274 (1–2): 293–298.
34. Fonseca D, MateusH, Contreras N. 2010. *Prácticas de Laboratorio de Biología Molecular: su aplicación en genética básica*. Universidad del Rosario. Colombia. 33-35.



## Anexo 1

Tabla de preparación del Buffer CTAB: se debe calentar el buffer de extracción a 65°C y luego agregar, como último componente, el  $\beta$ -mercaptoetanol.

| <b>Componentes</b>      | <b>Masa (g)/ Volumen (mL)</b> | <b>Función</b>  |
|-------------------------|-------------------------------|---|
| CTAB                    | 2,00 g                        | Surfactante catiónico que separa los ácidos nucleicos de polisacáridos.   |
| Polivinilpirrolidona    | 1,00 mL                       | Ayuda a prevenir la oxidación de polifenoles presentes en el medio intra o extracelular que pueden dificultar la extracción.  |
| Cloruro de Sodio        | 8,00 g                        | Permite disolver los polisacáridos y los complejos CTAB-ARN, ayudando a la remoción de CTAB y polisacáridos en la fase de extracción con cloroformo.                                  |
| Tris-HCL                | 1,20g                         | Amortiguador de pH. Mantiene un pH estable cercano a 8,0.   |
| EDTA                    | 0,75g                         | Agente quelante que impide:<br>-La unión de metales al material genético.<br>-La acción de nucleasas al capturar Mg e impidiendo que este metal actúe como cofactor de estas enzimas. |
| $\beta$ -mercaptoetanol | 1,00mL                        | Fuerte agente reductor que actúa denaturando irreversiblemente cualquier nucleasa que pueda estar presente.   |
| Agua libre de nucleasas | $\approx$ 98 mL               | Solvente. Evita la digestión enzimática del ARN al no contener nucleasas.   |

## Aexo 2

| <b>Razones de absorbancia y concentración de ARN de muestras obtenidas de cultivos de células sembradas en SII por el protocolo TRIzol®.</b> |                                    |                       |                       |                                    |
|--|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------------------|
| <b><u>Muestras</u></b>   | <b><u>Digestión enzimática</u></b> | <b><u>260/280</u></b> | <b><u>260/230</u></b> | <b><u>ng/<math>\mu</math>L</u></b> |
| A <sub>1</sub>   | Sin                                | 1,5                   | 0,54                  | 337,4                              |
| A <sub>2</sub>   | Sin                                | 1,22                  | 0,36                  | 242,8                              |
| A <sub>3</sub>   | Sin                                | 1,17                  | 0,26                  | 439,7                              |
| A <sub>1</sub>   | Con                                | 1,17                  | 0,25                  | 491,0                              |
| A <sub>2</sub>   | Con                                | 1,21                  | 0,27                  | 447,9                              |
| A <sub>3</sub>   | con                                | 1,17                  | 0,26                  | 611,1                              |

**Anexo 3**

| <b>Razones de absorbancia y concentración de ARN de muestras obtenidas de cultivos de células sembradas en SII por el protocolo TRizol® con purificación de solvente extendido (Yu y cols.).</b> |                                    |                       |                       |                     |
|--|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| <b><u>Muestras</u></b>   | <b><u>Digestión enzimática</u></b> | <b><u>260/280</u></b> | <b><u>260/230</u></b> | <b><u>ng/μL</u></b> |
| A <sub>1</sub>   | Sin                                | 1,21                  | 0,28                  | 187,4               |
| A <sub>2</sub>   | Sin                                | 1,34                  | 0,38                  | 110,0               |
| A <sub>3</sub>   | Sin                                | 1,33                  | 0,35                  | 130,5               |
| A <sub>1</sub>   | Con                                | 1,18                  | 0,30                  | 167,8               |
| A <sub>2</sub>   | Con                                | 1,20                  | 0,35                  | 202,4               |
| A <sub>3</sub>   | con                                | 1,10                  | 0,30                  | 200,6               |

**Anexo 4**

| <b>Razones de absorbancia y concentración de ARN de muestras obtenidas de cultivos de células sembradas en SII por el protocolo TRizol®.</b> |                                    |                       |                       |                     |
|--|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| <b><u>Muestras</u></b>   | <b><u>Digestión enzimática</u></b> | <b><u>260/280</u></b> | <b><u>260/230</u></b> | <b><u>ng/μL</u></b> |
| A <sub>1</sub>   | Sin                                | 1,20                  | 0,28                  | 287,1               |
| A <sub>2</sub>   | Sin                                | 1,24                  | 0,38                  | 132,2               |
| A <sub>3</sub>   | Sin                                | 1,25                  | 0,35                  | 130,1               |
| Blanco 1   | Sin                                | 1,16                  | 0,24                  | 408,7               |
| Blanco 2   | Sin                                | 1,18                  | 0,22                  | 400,5               |
| A <sub>1</sub>   | Con                                | 1,19                  | 0,29                  | 199,7               |
| A <sub>2</sub>   | Con                                | 1,21                  | 0,47                  | 296,9               |
| A <sub>3</sub>   | con                                | 1,17                  | 0,29                  | 66,4                |
| Blanco1  | Con                                | 1,18                  | 0,26                  | 185,3               |
| Blanco2  | con                                | 1,17                  | 0,22                  | 180,1               |

### Anexo 5

| <b>Razones de absorbancia y concentración de ARN de muestras obtenidas de cultivos de células sembradas en SII por el protocolo TRIzol® con extracción por solvente extendido (Yu y cols.).</b> |                             |                |                |              |
|---|-----------------------------|----------------|----------------|--------------|
| <u>Muestras</u>   | <u>Digestión enzimática</u> | <u>260/280</u> | <u>260/230</u> | <u>ng/μL</u> |
| A <sub>1</sub>  | Sin                         | 1,22           | 0,30           | 193,4        |
| A <sub>2</sub>  | Sin                         | 1,05           | 0,25           | 166,7        |
| A <sub>3</sub>  | Sin                         | 1,23           | 0,27           | 144,5        |
| Blanco 1  | Sin                         | 1,02           | 0,19           | 167,0        |
| Blanco 2  | Sin                         | 1,15           | 0,22           | 138,8        |
| A <sub>1</sub>  | Con                         | 1,00           | 0,15           | 187,6        |
| A <sub>2</sub>  | Con                         | 1,27           | 0,25           | 280,1        |
| A <sub>3</sub>  | con                         | 1,02           | 0,18           | 292,5        |
| Blanco1   | Con                         | 1,16           | 0,25           | 162,6        |
| Blanco2   | con                         | 1,10           | 0,20           | 198,9        |

### Anexo 6

| <b>Razones de absorbancia y concentración de ARN de muestras obtenidas de cultivos de células sembradas en SII por el protocolo DNeasy Plant Mini Kit modificación.</b> |                             |                |                |              |
|---|-----------------------------|----------------|----------------|--------------|
| <u>Muestras</u>   | <u>Digestión enzimática</u> | <u>260/280</u> | <u>260/230</u> | <u>ng/μL</u> |
| A <sub>1</sub>  | Sin                         | 1,22           | 0,30           | 2,9          |
| A <sub>2</sub>  | Sin                         | 0,91           | 0,25           | 1,8          |
| A <sub>3</sub>  | Sin                         | 1,6            | 0,27           | 1.75         |
| Blanco 1  | Sin                         | 0,5            | 0,00           | 0,8          |
| Blanco 2  | Sin                         | 0,6            | 0,00           | 0,5          |
| A <sub>1</sub>  | Con                         | 0,62           | 0,13           | 0,3          |
| A <sub>2</sub>  | Con                         | 0,68           | 0,10           | 2,0          |
| A <sub>3</sub>  | con                         | 0,88           | 0,28           | 2,5          |
| Blanco1   | Con                         | 1,16           | 0,25           | 0,5          |
| Blanco2   | con                         | 1,10           | 0,20           | 0,9          |

**Anexo 7**

| <b>Razones de absorbancia y concentración de ARN de muestras obtenidas de cultivos de células sembradas en SII por el protocolo de Wang y Stegemann.</b> |                                    |                       |                       |                     |
|--|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| <b><u>Muestras</u></b>   | <b><u>Digestión enzimática</u></b> | <b><u>260/280</u></b> | <b><u>260/230</u></b> | <b><u>ng/μL</u></b> |
| A <sub>1</sub>   | Sin                                | 0,90                  | 0,19                  | 55,9                |
| A <sub>2</sub>   | Sin                                | 0,80                  | 0,14                  | 43,5                |
| A <sub>3</sub>   | Sin                                | 0,82                  | 0,15                  | 44,9                |
| Blanco 1   | Sin                                | 0,78                  | 0,13                  | 37,1                |
| Blanco 2   | Sin                                | 0,77                  | 0,14                  | 50,8                |
| A <sub>1</sub>   | Con                                | 0,79                  | 0,13                  | 27,5                |
| A <sub>2</sub>   | Con                                | 0,80                  | 0,14                  | 40,9                |
| A <sub>3</sub>   | con                                | 0,80                  | 0,12                  | 29,8                |
| Blanco1  | Con                                | 0,75                  | 0,12                  | 19,4                |
| Blanco2  | con                                | 0,79                  | 0,14                  | 24,1                |

**Anexo 8**

| <b>Razones de absorbancia y concentración de ARN de muestras obtenidas de cultivos de células sembradas en SII por el protocolo TRizol®.</b> |   |                                    |                       |                       |                     |
|--|---|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| <b><u>Muestras</u></b>   | <b><u>Densidad de Células x 1000/cm<sup>2</sup></u></b> | <b><u>Digestión Enzimática</u></b> | <b><u>260/280</u></b> | <b><u>260/230</u></b> | <b><u>ng/μL</u></b> |
| A <sub>1</sub>   | 50  | Sin                                | 1,23                  | 0,41                  | 281,7               |
| A <sub>2</sub>   | 50  | Sin                                | 1,18                  | 0,65                  | 250,2               |
| A <sub>3</sub>   | 50  | Sin                                | 1,28                  | 0,53                  | 130,3               |
| B <sub>1</sub>   | 250   | Sin                                | 1,16                  | 0,60                  | 132,9               |
| B <sub>2</sub>   | 250   | Sin                                | 1,15                  | 0,75                  | 208,5               |
| B <sub>3</sub>   | 250   | Sin                                | 1,29                  | 0,64                  | 180,1               |
| C <sub>1</sub>   | 500   | Sin                                | 0,98                  | 0,68                  | 135,6               |
| C <sub>2</sub>   | 500   | Sin                                | 1,05                  | 0,50                  | 180,4               |
| C <sub>3</sub>   | 500   | Sin                                | 1,15                  | 0,49                  | 175,1               |
| Blanco   | --  | Sin                                | 1,16                  | 0,40                  | 350,2               |
| Blanco   | --  | Sin                                | 1,18                  | 0,45                  | 202,0               |
| A <sub>1</sub>   | 50  | Con                                | 1,15                  | 0,29                  | 118,1               |
| A <sub>2</sub>   | 50  | Con                                | 1,10                  | 0,15                  | 230,4               |
| A <sub>3</sub>   | 50  | Con                                | 1,07                  | 0,40                  | 66,4                |
| B <sub>1</sub>   | 250   | Con                                | 1,05                  | 0,29                  | 140,9               |
| B <sub>2</sub>   | 250   | Con                                | 1,17                  | 0,26                  | 100,2               |
| B <sub>3</sub>   | 250   | Con                                | 1,11                  | 0,19                  | 120,6               |
| C <sub>1</sub>   | 500   | Con                                | 1,20                  | 0,30                  | 110,7               |
| C <sub>2</sub>   | 500   | Con                                | 1,12                  | 0,23                  | 190,8               |
| C <sub>3</sub>   | 500   | Con                                | 1,19                  | 0,15                  | 154,1               |
| Blanco   | --  | Con                                | 1,19                  | 0,26                  | 185,4               |
| Blanco   | --  | Con                                | 1,17                  | 0,22                  | 180,1               |

### Anexo 9

| <b>Razones de absorbancia y concentración de ARN de muestras obtenidas de cultivos de células sembradas en SII por el protocolo TRIzol® con purificación de solvente extendido (Yu y Co/s).</b> |   |                                    |                       |                       |                     |
|---|---|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| <b><u>Muestras</u></b>  | <b><u>Densidad de Células x 1000/cm<sup>2</sup></u></b> | <b><u>Digestión Enzimática</u></b> | <b><u>260/280</u></b> | <b><u>260/230</u></b> | <b><u>ng/μL</u></b> |
| A <sub>1</sub>  | 50  | Sin                                | 1,20                  | 0,29                  | 192,3               |
| A <sub>2</sub>  | 50  | Sin                                | 1,40                  | 0,23                  | 164,0               |
| A <sub>3</sub>  | 50  | Sin                                | 1,22                  | 0,35                  | 149,5               |
| B <sub>1</sub>  | 250   | Sin                                | 1,23                  | 0,18                  | 92,3                |
| B <sub>2</sub>  | 250   | Sin                                | 1,10                  | 0,28                  | 162,8               |
| B <sub>3</sub>  | 250   | Sin                                | 1,05                  | 0,38                  | 199,8               |
| C <sub>1</sub>  | 500   | Sin                                | 1,02                  | 0,27                  | 201,2               |
| C <sub>2</sub>  | 500   | Sin                                | 1,30                  | 0,22                  | 199,1               |
| C <sub>3</sub>  | 500   | Sin                                | 1,25                  | 0,35                  | 151,3               |
| Blanco  | --  | Sin                                | 1,05                  | 0,19                  | 142,6               |
| Blanco  | --  | Sin                                | 1,15                  | 0,21                  | 146,9               |
|   |   |                                    |                       |                       |                     |
| A <sub>1</sub>  | 50  | Con                                | 1,00                  | 0,15                  | 185,6               |
| A <sub>2</sub>  | 50  | Con                                | 1,08                  | 0,19                  | 280,1               |
| A <sub>3</sub>  | 50  | Con                                | 0,95                  | 0,25                  | 160,2               |
| B <sub>1</sub>  | 250   | Con                                | 1,16                  | 0,18                  | 100,1               |
| B <sub>2</sub>  | 250   | Con                                | 1,03                  | 0,13                  | 140,7               |
| B <sub>3</sub>  | 250   | Con                                | 1,13                  | 0,20                  | 152,4               |
| C <sub>1</sub>  | 500   | Con                                | 1,05                  | 0,19                  | 150,3               |
| C <sub>2</sub>  | 500   | Con                                | 1,18                  | 0,29                  | 131,1               |
| C <sub>3</sub>  | 500   | Con                                | 0,98                  | 0,12                  | 142,6               |
| Blanco  | --  | Con                                | 1,17                  | 0,25                  | 160,6               |
| Blanco  | --  | Con                                | 1,10                  | 0,20                  | 182,9               |

### Anexo 10

| <b>Razones de absorbancia y concentración de ARN de muestras obtenidas de cultivos de células sembradas en SII por el protocolo modificado DNeasy Plant Mini Kit Qiagen®.</b> |   |                                    |                       |                       |                     |
|---|---|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| <b><u>Muestras</u></b>  | <b><u>Densidad de Células x 1000/cm<sup>2</sup></u></b> | <b><u>Digestión Enzimática</u></b> | <b><u>260/280</u></b> | <b><u>260/230</u></b> | <b><u>ng/μL</u></b> |
| A <sub>1</sub>  | 50  | Sin                                | 1,67                  | 1,68                  | 1,6                 |
| A <sub>2</sub>  | 50  | Sin                                | 1,98                  | 2,50                  | 3,0                 |
| B <sub>1</sub>  | 250   | Sin                                | 0,98                  | 1,00                  | 0,6                 |
| B <sub>2</sub>  | 250   | Sin                                | 1,21                  | 1,01                  | 2,6                 |
| C <sub>1</sub>  | 500   | Sin                                | 1,15                  | 2,00                  | 1,6                 |
| C <sub>2</sub>  | 500   | Sin                                | 1,24                  | 2,17                  | 1,8                 |
| Blanco  | --  | Sin                                | 0,03                  | 0,00                  | 0,0                 |
| Blanco  | --  | Sin                                | 0,25                  | 0,05                  | 0,5                 |
| A <sub>1</sub>  | 50  | Con                                | 1,10                  | 0,56                  | 1,1                 |
| A <sub>2</sub>  | 50  | Con                                | 1,40                  | 0,23                  | 0,5                 |
| B <sub>1</sub>  | 250   | Con                                | 1,21                  | 0,30                  | 0,8                 |
| B <sub>2</sub>  | 250   | Con                                | 0,63                  | 0,25                  | 1,3                 |
| C <sub>1</sub>  | 500   | Con                                | 0,25                  | 0,61                  | 1,2                 |
| C <sub>2</sub>  | 500   | Con                                | 0,26                  | 0,27                  | 1,0                 |
| Blanco  | --  | Con                                | 0,13                  | 0,15                  | 0,3                 |
| Blanco  | --  | Con                                | 0,35                  | 0,13                  | 3,8                 |

### Anexo 11

| <b>Razones de absorbancia y concentración de ARN de muestras obtenidas de cultivos de células sembradas en SII por el protocolo de Wang y Stegemann.</b> |   |                                    |                       |                       |                     |
|--|---|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| <b><u>Muestras</u></b>   | <b><u>Densidad de Células x 1000/cm<sup>2</sup></u></b> | <b><u>Digestión Enzimática</u></b> | <b><u>260/280</u></b> | <b><u>260/230</u></b> | <b><u>ng/μL</u></b> |
| A <sub>1</sub>   | 50  | Sin                                | 0,82                  | 0,15                  | 54,8                |
| A <sub>2</sub>   | 50  | Sin                                | 0,61                  | 0,10                  | 50,3                |
| A <sub>3</sub>   | 50  | Sin                                | 0,78                  | 0,12                  | 51,0                |
| B <sub>1</sub>   | 250   | Sin                                | 0,79                  | 0,14                  | 45,3                |
| B <sub>2</sub>   | 250   | Sin                                | 0,77                  | 0,13                  | 46,9                |
| B <sub>3</sub>   | 250   | Sin                                | 0,78                  | 0,19                  | 60,3                |
| C <sub>1</sub>   | 500   | Sin                                | 0,81                  | 0,11                  | 25,4                |
| C <sub>2</sub>   | 500   | Sin                                | 0,79                  | 0,11                  | 36,5                |
| C <sub>3</sub>   | 500   | Sin                                | 0,83                  | 0,15                  | 31,1                |
| Blanco   | --  | Sin                                | 0,75                  | 0,13                  | 53,8                |
| Blanco   | --  | Sin                                | 0,73                  | 0,13                  | 49,0                |
| A <sub>1</sub>   | 50  | Con                                | 0,79                  | 0,11                  | 30,4                |
| A <sub>2</sub>   | 50  | Con                                | 0,77                  | 0,13                  | 28,5                |
| A <sub>3</sub>   | 50  | Con                                | 0,72                  | 0,12                  | 35,0                |
| B <sub>1</sub>   | 250   | Con                                | 0,80                  | 0,14                  | 27,7                |
| B <sub>2</sub>   | 250   | Con                                | 0,75                  | 0,14                  | 31,2                |
| B <sub>3</sub>   | 250   | Con                                | 0,80                  | 0,12                  | 40,9                |
| C <sub>1</sub>   | 500   | Con                                | 0,79                  | 0,14                  | 19,4                |
| C <sub>2</sub>   | 500   | Con                                | 0,70                  | 0,17                  | 25,1                |
| C <sub>3</sub>   | 500   | Con                                | 0,71                  | 0,14                  | 23,1                |
| Blanco   | --  | Con                                | 0,75                  | 0,10                  | 21,3                |
| Blanco   | --  | Con                                | 0,65                  | 0,15                  | 21,0                |

**Anexo 12**

| <b>Razones de absorbancia y concentración de ARN de muestras obtenidas de cultivos de células de encía sembradas en SII por protocolo modificado DNeasy Plant Mini Kit Qiagen® utilizando ADNasa.</b> |   |                       |                       |                     |
|---|---|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| <b><u>Muestras</u></b>  | <b><u>Densidad de Células x 1000/cm<sup>2</sup></u></b> | <b><u>260/280</u></b> | <b><u>260/230</u></b> | <b><u>ng/μL</u></b> |
| A <sub>1</sub>  | 50  | 1,00                  | 0,71                  | 1,4                 |
| A <sub>2</sub>  | 50  | 0,73                  | 0,50                  | 1,3                 |
| B <sub>1</sub>  | 400   | 0,54                  | 0,38                  | 1,1                 |
| B <sub>2</sub>  | 400   | 1,05                  | 0,93                  | 1,0                 |
| C <sub>1</sub>  | 750   | 0,61                  | 0,70                  | 0,7                 |
| C <sub>2</sub>  | 750   | 1,53                  | 0,35                  | 3,5                 |
| Blanco  | --  | 2,52                  | 0,18                  | 1,3                 |
| Blanco  | --  | 1,13                  | 0,01                  | 0,3                 |

**Anexo 13**

| <b>Razones de absorbancia y concentración de ARN de muestras obtenidas de cultivos de células sembradas en SII por protocolo modificado DNeasy Plant Mini Kit Qiagen®.</b> |   |                       |                       |                     |
|--|---|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| <b><u>Muestras</u></b>   | <b><u>Densidad de Células x 1000/cm<sup>2</sup></u></b> | <b><u>260/280</u></b> | <b><u>260/230</u></b> | <b><u>ng/μL</u></b> |
| A <sub>1</sub>   | 50  | 1,37                  | 0,80                  | 1,7                 |
| A <sub>2</sub>   | 50  | 1,75                  | 0,10                  | 2,3                 |
| B <sub>1</sub>   | 400   | 1,57                  | 0,50                  | 6,3                 |
| B <sub>2</sub>   | 400   | 2,20                  | 0,70                  | 5,5                 |
| C <sub>1</sub>   | 750   | 2,00                  | 0,52                  | 3,0                 |
| C <sub>2</sub>   | 750   | 2,00                  | 0,30                  | 2,9                 |
| Blanco   | --  | 5,78                  | 0,02                  | 0,5                 |
| Blanco   | --  | 1,28                  | 0,05                  | 0,3                 |



