

**FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**



**MÁSTER EN FISIOLÓGÍA**

**Estudio del efecto antitumoral de las vesículas extracelulares liberadas por células mononucleares tratadas con genisteína.**

Presentado por:

**Elisa Isabel Sánchez-Morate Escrig**

Dirigido por:

Prof. Dr. Juan Gambini Buchón

Dra. Lucia Gimeno Mallench

Trabajo de fin de máster  
Julio de 2019

# CERTIFICADO DE DIRECCIÓN

VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA (Q\*)  
Facultat de Medicina i Odontologia  
Departamento de Fisiología

**Máster Universitario en Fisiología**

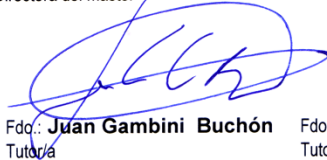
## ACEPTACIÓN DE LOS TUTORES

D./Dña. **Juan Gambini Buchón**, Profesor Titular del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València y **Lucia Gimeno Mallench** investigadora postdoctoral del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València.

### ACEPTAN:

ser tutores de D/Dña. **Elisa Isabel Sánchez-Morate Escrig**, estudiante del Máster en Fisiología de la Universitat de València en el curso académico 2018/2019, con el tema: **Estudio del efecto antitumoral de las vesículas extracelulares liberadas por células mononucleares tratadas con genisteína.**

VºBº  
Rosario Salvador  
Directora del máster

  
Fdo.: **Juan Gambini Buchón**  
Tutor/a



Fdo.: **Lucia Gimeno Mallench**  
Tutor/a

15 de Noviembre de 2018



Firma estudiante

*Este impreso deberá ser entregado por el/la estudiante en la Secretaría del Departamento de Fisiología, debidamente cumplimentado, hasta el 15 de noviembre del correspondiente curso académico.*

## ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.</b>	<b>POLIFENOLES .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>CLASIFICACIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1</b>	<b>GENISTEÍNA .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.1.1</b>	<b>PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DE LA GENISTEÍNA.....</b>	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b>VESÍCULAS EXTRACELULARES .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>CONTENIDO DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES. ....</b>	<b>5</b>
<b>2.1.1</b>	<b>miRNA .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2</b>	<b>APLICACIONES TERAPÉUTICAS. ....</b>	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>CÁNCER .....</b>	<b>6</b>
<b>II.</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>9</b>
<b>1.</b>	<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>9</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>10</b>
<b>1.</b>	<b>MATERIALES.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1</b>	<b>APARATOS .....</b>	<b>10</b>
<b>1.2</b>	<b>REACTIVOS.....</b>	<b>11</b>
<b>1.3</b>	<b>CULTIVOS DE CÉLULAS .....</b>	<b>11</b>

<b>2. MÉTODOS.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>11</b>
<b>2.2 CULTIVOS CELULARES.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2.1 AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2.2 TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS MONONUCLEARES.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2.3 AISLAMIENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.....</b>	<b>12</b>
<b>A. TRATAMIENTO CON VESÍCULAS EXTRACELULARES.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3 ANÁLISIS DE miRNA.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3.1 AISLAMIENTO DE RNA .....</b>	<b>13</b>
<b>2.3.2 CUANTIFICACIÓN, PUREZA Y CONTROL DE INTEGRIDAD DEL RNA TOTAL EXTRAÍDO .....</b>	<b>14</b>
<b>A. ESPECTROFOTOMETRÍA.....</b>	<b>14</b>
<b>B. ELECTROFORESIS CAPILAR.....</b>	<b>15</b>
<b>2.4 PERFILES DE EXPRESIÓN DE LOS RNAS NO CODIFICANTES...15</b>	
<b>2.5 ANÁLISIS DE LOS DATOS DE MICROARRAYS.....</b>	<b>16</b>
<b>2.6 DETERMINACIÓN DEL CICLO CELULAR.....</b>	<b>17</b>
<b>2.7 DETERMINACIÓN DE LA APOPTOSIS .....</b>	<b>17</b>
<b>2.8 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....</b>	<b>17</b>
<b>2.8.1 AISLAMIENTO DE RNA .....</b>	<b>17</b>

2.8.2 RETROTRANSCRIPCIÓN-AMPLIFICACIÓN DEL RNA (RT-PCR)	
EN TIEMPO REAL.....	18
2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	18
IV. RESULTADOS .....	19
1. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE LOS MIRNA .....	19
A. ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES (PCA) DE LOS miRNAS. ....	19
B. HEATMAP .....	19
2. CICLO CELULAR.....	22
3. APOPTOSIS.....	23
4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA .....	25
V. DISCUSIÓN .....	26
1. DETERMINACIÓN DE MIRNAS .....	26
2. CICLO CELULAR.....	27
3. APOPTOSIS.....	28
4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA .....	28
VI. CONCLUSIONES .....	30
VII. LIMITACIONES DEL ESTUDIO .....	31
VIII. BIBLIOGRAFÍA .....	32

<b>IX. ANEXOS.....</b>	<b>39</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>39</b>
<b>ANEXO II .....</b>	<b>40</b>
<b>ANEXO III.....</b>	<b>42</b>
<b>ANEXO IV .....</b>	<b>44</b>
<b>ANEXO VI.....</b>	<b>50</b>
<b>ANEXO VII .....</b>	<b>55</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características principales de exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos.

Tabla 2: miRNA que cambian significativamente al comparar los grupos.

Tabla 3: Componentes de la mix de retrotranscripción.

Tabla 4: Secuencia de los cebadores utilizados en las PCR.

Tabla 5: qPCR componentes de la mezcla.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura química de los polifenoles.

Figura 2: Similitud estructural entre el  $17\beta$ -estradiol y la isoflavona genisteína.

Figura 3: Características generales de las células tumorales adquiridas durante el proceso de carcinogénesis.

Figura 4: PCA de los RNA no codificantes de VEs liberadas por células mononucleares.

Figura 5: Heatmap de la expresión de microARN de microvesículas aisladas de PBMC tratadas con genisteína.

Figura 6: Análisis de ciclo celular por citometría de flujo.

Figura 7: Ciclo celular.

Figura 8: Análisis de la apoptosis celular mediante citometría de flujo.

Figura 9: Apoptosis.

Figura 10: Niveles de mRNA de CDH1 en células HCT116 tratadas con VEs liberadas por células mononucleares tratadas con genisteína.

Figura 11: Niveles de mRNA de CCND2 en células HCT116 tratadas con VEs liberadas por células mononucleares tratadas con genisteína.

Figura 12: Cinética de amplificación de PCR a tiempo real (Ct).

## **ABREVIATURAS**

VEs: vesículas extracelulares

RNA: ácido ribonucleico

miRNA: micro ácido ribonucleico

ARNip: ácido ribonucleico pequeño de interferencia

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ROS: especies reactivas de oxígeno

RPMI: medio Roswell Park Memorial Institute

SBF: suero bovino fetal

DMSO: dimetilsulfóxido

PCA: análisis de componentes principales

MVB: cuerpos multi-vesiculares

PBMC: célula mononuclear de sangre periférica



# **I. INTRODUCCIÓN**

## **1. Polifenoles**

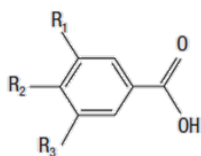
Los polifenoles son compuestos químicos cuya estructura presenta uno o más grupos hidroxilo (-OH) unidos a uno o más anillos bencénicos. Se sintetizan principalmente por las diferentes partes de las plantas, como producto de su metabolismo secundario. Pueden encontrarse en frutos, hojas, tallos, raíces, semillas, etc. Los polifenoles presentan diversas funciones, siendo algunas fundamentales en la fisiología y otras, en cambio, participan en situaciones de defensa o en respuesta a estrés (hídrico, lumínico, etc)<sup>1</sup>.

Los compuestos polifenólicos son los antioxidantes más abundantes en nuestra dieta, pues están ampliamente presentes en frutas, verduras, cereales, aceitunas, legumbres secas, chocolate y bebidas como el té, el café y el vino. Los polifenoles tienen efectos potencialmente beneficiosos para la salud como: protección contra el daño oxidativo, activar o inhibir diferentes enzimas, entre las que se encuentran la telomerasa, ciclooxigenasa y lipoxigenasa, y actuar en la interacción con vías de transducción de señales y receptores celulares. Además, recientemente han ganado interés como agentes antiinflamatorios e inmunomoduladores<sup>2</sup>, por lo que reciben cada vez una mayor atención como posibles agentes terapéuticos contra enfermedades: cardiovasculares, neurodegenerativas, obesidad y cáncer<sup>1,3</sup>.

### **1.1 Clasificación**

Los polifenoles son unos compuestos muy abundantes y diversos. En la actualidad existen más de 8000 diferentes en la naturaleza. Es por este motivo por el cual la terminología y clasificación de polifenoles es compleja y confusa. Se subdividen en seis grupos: flavonoles, flavonas, flavanonas (dihidroflavonas), isoflavonas, antocianidinas y flavanoles (figura 1). Nos centraremos en el grupo de los flavonoides, que es el grupo al que pertenece la genisteína, el polifenol estudiado en el presente trabajo<sup>1</sup>.

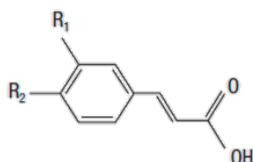
### Ácido hidroxibenzoico



$R_1=R_2=R_3=OH$ : Ácido gálico

$R_1=R_2=OH$   $R_3=H$ : Ácido protocatecuico

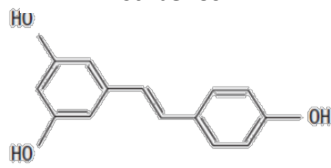
### Ácido hidroxicinámico



$R_1=OH$ : Ácido cumárico

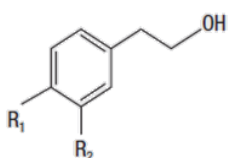
$R_1=R_2=OH$ : Ácido cafeico

### Estilbenos



Resveratrol

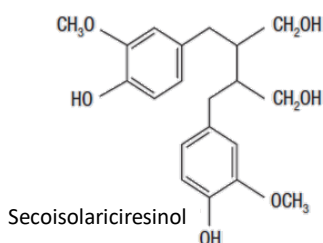
### Alcoholes fenólicos



$R_1=OH$ ,  $R_2=H$ : Tirosol

$R_1=R_2=OH$ : Hidroxitirosol

### Lignanos



Secoisolariciresinol

### Flavonoides

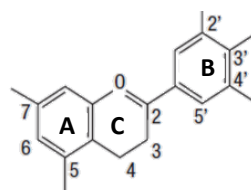


Figura 2: estructura química de los polifenoles.

#### 1.1.1 Genisteína

De todos los grupos anteriormente nombrados, la genisteína (4',5,7-Trihidroxi Isoflavona) (figura 2) es una isoflavona, cuya estructura es similar a la de los estrógenos. Presenta un esqueleto de 15 carbonos que puede unirse a receptores de estrógenos, motivo por el que se clasifican como fitoestrógenos. Se encuentran casi de manera exclusiva en leguminosas, como garbanzos y guisantes y, mayoritariamente en la soja y sus derivados.

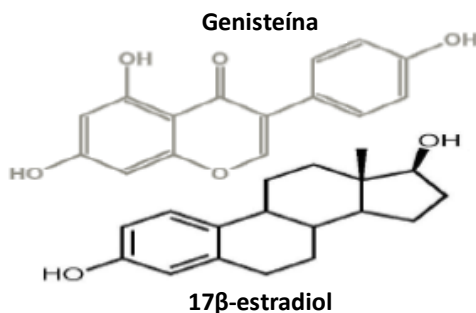


Figura 2: similitud estructural entre el 17β-estradiol y la isoflavona genisteína.

Dado que pueden actuar como agonistas o antagonistas estrogénicos, han sido agrupados dentro de los moduladores selectivos del receptor de estrógeno. Sus mecanismos de acción se pueden dividir en dos, dependiendo de si son hormono-dependientes (mediados por receptor estrogénico) o no hormonales (independientes de receptor estrogénico).

#### **1.1.1.1 Propiedades farmacológicas de la genisteína.**

Se ha observado que la ingesta de genisteína puede tener múltiples beneficios entre los que se encuentran: promueve la salud cardiovascular favoreciendo la flexibilidad de los vasos sanguíneos y reduciendo la concentración de colesterol<sup>4</sup>; interacciona con los receptores estrogénicos aliviando los síntomas asociados a la falta de estrógenos, como la osteoporosis; tiene actividad antiaromatasa, clave en la protección de cáncer de mama<sup>6</sup>. Además la genisteína tiene un papel antioxidante ya sea porque sobreexpresa enzimas antioxidantes o porque inhibe la formación de radicales libres, peróxido de hidrógeno, y aniones superóxido, por lo que tiene un papel importante en la protección contra el riesgo de ictus isquémico y desempeñar un papel neuroprotector en la enfermedad de Alzheimer reduciendo la hiperfosforilación de tau<sup>7, 8</sup>. Por último, ejerce un efecto antiinflamatorio y antitumoral, ya que es capaz de inhibir enzimas clave en la aparición y progresión de tumores y regula el microentorno tumoral provocando una mayor sensibilización a las terapias gracias a la modulación de la producción de citoquinas y quimioquinas junto con la activación de células inmunitarias<sup>9, 21</sup>.

En base a esto, existen numerosas investigaciones relacionadas con el uso de antioxidantes como complementos en la terapia cancerígena debido a que desempeñan funciones importantes en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmunitario del huésped<sup>11</sup>.

## **2. Vesículas extracelulares**

En los últimos años han cobrado gran relevancia en investigación las vesículas extracelulares (VEs) por su papel en la comunicación celular tanto en procesos fisiológicos como patológicos. Las VEs son vesículas heterogéneas de membrana plasmática (bicapa lipídica) liberadas de diversos tipos de células a fluidos biológicos y

que encierran contenidos biológicos derivados de la célula de origen<sup>4</sup>. La información que transportan las VEs depende de su composición, la cual viene dada por la célula de la que procede y del microentorno circundante durante su biogénesis.

Los primeros estudios acerca de VEs no daban a conocer la importancia que tenían. Chargaff y West en 1946 fueron los primeros en observar unas partículas derivadas de plaquetas en el plasma a las que Wolfen, en 1967, llamó “polvo de plaquetas”. Ya en los años 70-80, se incluyeron a las observaciones de VEs independientes, las vesículas liberadas por la membrana plasmática de otros tipos células. Prácticamente al mismo tiempo, descubrieron fragmentos de membrana que eran originarios de tumores. En el 83, con el avance de los estudios ultraestructurales, se pudo demostrar que las vesículas también se liberan por cuerpos multivesiculares (MVB) que se fusionan con la membrana celular<sup>13</sup>.

Casi diez años después, fueron Raposo junto a otros investigadores los que afirmaron que estas vesículas, ya denominadas exosomas, contaban con antígenos en su interior y eran capaces de inducir respuestas en células T. Sin embargo, no fue hasta 2006 cuando se descubrió que las VEs contenían ARN, microARN. A partir de entonces, adquirieron un mayor interés y se reconocieron como vesículas mediadoras de la comunicación intercelular. Esto fue un aliciente para aumentar el interés de los investigadores en este campo y, ya en la actualidad, se han aislado VEs de la mayoría de los tipos de células y fluidos biológicos. Con todos los datos acumulados, se ha comprobado que existe una gran heterogeneidad en contenido, tamaño y composición de membrana de las VEs y que esto depende de la fuente celular, estado y condiciones ambientales. La información que transportan las VEs depende de su composición, la cual viene dada por la célula de la que procede y del microentorno circundante durante su biogénesis<sup>12</sup>.

Finalmente, se definen 3 subgrupos de vesículas extracelulares: cuerpos apoptóticos, microvesículas y exosomas y, se investigan nuevas técnicas para su aislamiento o enriquecimiento. Las principales diferencias existentes entre ellas se muestran en la tabla 1.

CARACTERÍSTICAS	EXOSOMAS	ECTOSOMAS (microvesículas)	CUERPOS APOPTÓTICOS
Tamaño	30-100nm	100-1000nm	≥1000nm
Origen	Endosomas tardíos	Membrana plasmática	Membrana plasmática de célula apoptótica
Sedimentación (g)	100.000-110.000	10.000-100.00	1.500-100.00
Marcadores	Tetraspaninas, Anexinas, poca fosfatidilserina	Integrinas, selectinas y metaloproteinasas	Histonas, DNA
Contenido	Proteínas, lípidos, mRNA, miRNA, DNA	Proteínas, lípidos, mRNA, miRNA	Fragmentos celulares y organelas celulares

Tabla 1: características principales de exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos. Tabla modificada de Weilner et al. 2003<sup>4</sup>.

En este trabajo se empleará el término de VEs para referirse tanto a microvesículas como a exosomas debido a la dificultad para discriminar ambos tipos.

## 2.1 Contenido de las vesículas extracelulares.

Como se explica en el apartado anterior, el contenido de las VEs es variado y depende su origen. Para nuestro trabajo, son los miRNA los que resultan de mayor interés y, por tanto, nos centraremos en ellos.

### 2.1.1 miRNA

Los miRNA son pequeñas moléculas monocatenarias de RNA no codificantes de 18 a 25 nucleótidos que juegan un importante papel en la regulación de la expresión génica. Tras el descubrimiento del primer miRNA en *C. elegans*, aumentó el interés por estas moléculas y se vio que abundaban en plantas, animales y virus. Actualmente existen 2588 miRNA humanos descritos, pudiendo cada uno regular la expresión de diferentes genes y, a la vez, distintos miRNA pueden regular la expresión de un mismo gen diana<sup>6</sup>.

De este modo, los miRNA desempeñan importantes papeles en múltiples procesos celulares como la diferenciación, proliferación, apoptosis, respuesta al estrés, y su alteración contribuye al desarrollo de muchas enfermedades humanas: cardiovasculares, cáncer, enfermedades hepáticas, alzheimer, etc.

Partiendo de modelos preclínicos de miRNA específicos, se utilizaron estas moléculas como herramientas terapéuticas para tratar el cáncer. Principalmente se distinguen dos estrategias terapéuticas: directas (empleando oligonucleóticos o construcciones basadas en virus para bloquear la expresión de miRNA oncogénicos o bien introducir miRNA supresores de tumores) e indirectas (mediante el uso de fármacos para interferir en la transcripción de los miRNA).

## **2.2 Aplicaciones terapéuticas.**

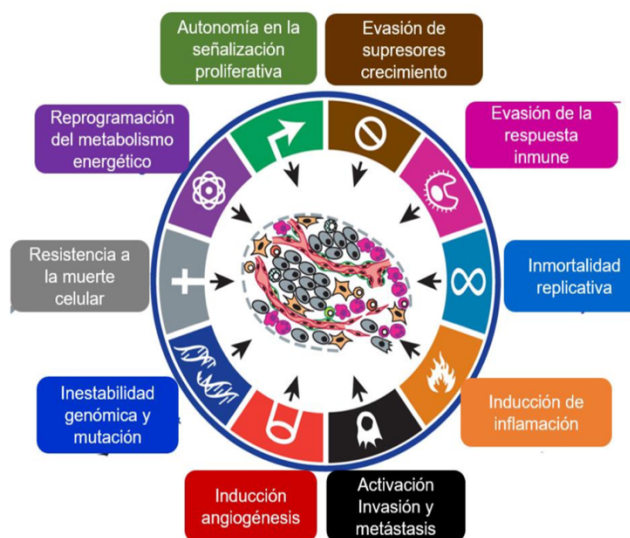
Debido al creciente interés por las VEs, en la actualidad existen numerosos estudios que plantean la posibilidad de sustituir terapias clásicas basadas en células por terapias basadas en señalización por VEs, ya que presentan grandes ventajas: no tienen que ser viables para ser funcionales, mantienen su integridad durante la congelación y descongelación, son estables por naturaleza, presentan un gran número de proteínas de adhesión a la membrana, su membrana es muy resistente, lo que permite el almacenamiento a largo plazo sin degradación biológica y pueden evadir el sistema inmunitario del huésped y circular para realizar sus funciones.

Por todo esto, y sumado a que podemos introducir en su interior agentes terapéuticos como miRNA, siRNA, mRNA y proteínas, las VEs resultan de gran utilidad para administrar tratamientos. Los últimos avances en el campo son que han conseguido desarrollar vesículas artificiales que funcionan igual, o incluso mejor que las naturales. Esto todavía está poniéndose a punto pero, en un futuro, estas vesículas, serán un nuevo sistema de administración de multitud de moléculas terapéuticas.

## **3. Cáncer**

El cáncer es una de las enfermedades de mayor relevancia en el mundo por su incidencia, prevalencia y mortalidad siendo la segunda principal causa de muerte, detrás de las enfermedades cardíacas. Cada año su incidencia aumenta, pero también disminuye su mortalidad, lo cual refleja los avances en el diagnóstico precoz y el tratamiento. Además, el envejecimiento de la población y el incremento de la supervivencia de los enfermos de cáncer ha supuesto un aumento de la prevalencia del cáncer. Esta enfermedad se

desarrolla por células que proliferan de manera excesiva e incontrolada capaces de invadir o difundirse a otros tejidos del cuerpo a través del sistema vascular sanguíneo y linfático para proliferar en la nueva localización<sup>16</sup>. Entre estas capacidades se incluyen la autonomía en la producción de señales de crecimiento, la evasión de los supresores del crecimiento, resistencia a la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis, activar la invasión y la metástasis, reprogramación del metabolismo energético y la evasión de la respuesta inmune<sup>17</sup>.



*Figura 3. Características generales de las células tumorales adquiridas durante el proceso de carcinogénesis.<sup>7</sup> Modificada de Hanahan y Weinberg, 2011<sup>6</sup>.*

Existen más de 100 variedades de cáncer, las cuales, por lo general, reciben el nombre de los órganos o tejidos donde se forman. Nosotros nos centraremos en el que se origina en el colon. El cáncer colorrectal es el segundo más letal tras el de pulmón. Más de la mitad de los casos tienen lugar en regiones desarrolladas. A medida que crece la economía, también lo hace este tipo de cáncer debido a que los hábitos alimenticios y estilos de vida no son los más adecuados. Aparece una inflamación crónica junto con daños de la mucosa por el exceso de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) pudiendo generar la aparición y progresión de cáncer además de la difusión de la metástasis<sup>18</sup>.

En relación a esto, se han llevado a cabo estudios experimentales que demuestran la importancia de algunos compuestos bioactivos de la dieta como agentes antitumorales modulando dianas moleculares implicadas en supervivencia y proliferación, invasión y metástasis del cáncer. Entre estos compuestos, los polifenoles podrían ser buenos candidatos para prevenir y tratar el cáncer debido a su capacidad para disminuir la inflamación y daño oxidativo junto con la activación de células inmunitarias. Entre los estudios, destacan la eficacia terapéutica del resveratrol dependiente de la dosis (dosis baja: 50mg/kg por día; dosis alta: 100mg/kg por día) reduciendo el número y tamaño de los tumores y el efecto de un oligómero del resveratrol Trans-Scirpusin A (TSA), administrado por vía intraperitoneal (10mg/kg) 3 veces por semana, que inhibe el crecimiento del cáncer colorrectal en modelos in vivo.<sup>19, 20, 21</sup> Por otra parte, en estudios con líneas celulares, han observado que la genisteína inhibe de manera significativa la proliferación e invasión de varias líneas debido a que detienen la fase G2/M del ciclo celular<sup>22</sup>.



## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **1. HIPÓTESIS**

El tratamiento *in vitro* de células tumorales con vesículas extracelulares derivadas de células mononucleares tratadas con genisteína podría inducir variaciones en la proliferación celular.

### **2. OBJETIVOS**

El objetivo general es estudiar el efecto de las vesículas extracelulares, liberadas por células mononucleares tratadas con genisteína, sobre células tumorales.

Los objetivos específicos del presente trabajo son:

1. Analizar el contenido de las vesículas extracelulares.
2. Estudiar el papel de las vesículas extracelulares en la proliferación celular.
3. Estudiar el papel de las vesículas extracelulares en la apoptosis celular.
4. Estudiar alguno de los genes diana de los miRNA contenidos en las vesículas extracelulares.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. MATERIALES

##### 1.1 Aparatos

**Balanzas:** Balanza de precisión Sartorius (modelo TECATOR 6110), con una sensibilidad de  $\pm 0.0001$  g; balanza de precisión Sartorius (modelo Aculab), sensibilidad  $\pm 0.0001$  g, balanza Gram Precision (modelo AHZ), sensibilidad 0.01 g); **Centrífugas:** Centrífuga Sorvall (modelo GLC-1); centrífuga Sigma (modelo 1-14); centrífuga Hettich, rotor 35 R para tubos eppendorfs; centrífuga de placas (marca Eppendorf, modelo Centrifuge); **Autoclave:** Marca Selecta (modelo Autester-G); **Baño seco:** Marca Stuart (Block heater, SBH 130 D); **Baño termostatzado:** Marca SBS (modelo BT de agitación automática regulable); **Campanas de flujo laminar:** Marca Burdinola (modelo OR-ST 1200); Marca Crumair; **Congeladores:** -80°C marca Froilabo (modelo BMT690); -20 °C marca Liebherr, (modelo Comfort Nofrost); 4 °C Nevera Lynx; **Ultracentrífuga:** Beckman Optima XL-100 K Ultracentrifuge; rotor 70.1 Ti). **Block heater:** Marca Stuart (modelo SBH130D); **Tubos de ultracentrífuga:** Bottle assy, PC 10.4 mL (REF. 355603); **Nanodrop:** Espectrofotómetro Nanodrop 2000. **Termocicladores:** marca Applied Biosystems (modelos GeneAmp® PCR System 9700; 7900HT Fast Real-Time PCR System; QuantStudio® 5 Real-Time PCR Systems); Termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystem); **Cabina de hipoxia:** whitley H35 HEPA hypoxystation; **Tubos vacutainer:** BD Vacutainer® CPT™ Ficoll™: 2.0 mL. **Microarrays:** GeneChip®miRNA 4.0 Array Affymetrix; **Horno de hibridación:** Hybridization Oven 640 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA); **Estación de lavados:** GeneChip®Fluidics Station 450 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA); GeneChip®Scanner 3000 7G (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA); **Softwares:** software miRNA QC Tool v.1.1.10, software GeneChip®Command Console (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), software Partek Genomic Suite 6.6 (Partek Inc., St Louis, MO).

## 1.2 Reactivos

**Aislamiento de RNA total:** Se utilizó el *kit TRIzol® Reagent (Invitrogen™)*; **Retrotranscripción y amplificación:** *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystem)*, *Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (thermo Scientific)*; **Citometría:** *kit PI/RNASE* y *kit ANEXINA V FITC (immunostep)* **Otros reactivos:** *Genisteína ref: G 6649* y *Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma)*.

## 1.3 Cultivos de células

Para el presente trabajo de fin de máster todos los ensayos se realizaron con la línea celular de cáncer de colon HCT116 y células mononucleares de humanos. Las HCT116 se mantuvieron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 3% de O<sub>2</sub> en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) con suero bovino fetal (SBF) al 10% y 1% antibiótico (penicilina-estreptomicina) de biowest y, las células mononucleares al 21% de O<sub>2</sub>.

El cultivo se llevó a cabo en frascos T-25 y T-75 de cell culture flask (25 y 75cm<sup>2</sup>, Filter cap) de SPL Lifesciences y, los ensayos en placas de poliestireno de 6 pocillos de *6well cell culture plate* de SPL Lifesciences.

## 2. MÉTODOS

### 2.1 Diseño experimental

Los estudios *in vitro* nos permiten estudiar la proliferación de las células HCT116 al tratarlas con VEs de células mononucleares. Para ello contamos con 4 voluntarias de entre 18 y 25 años a las que tomamos una muestra sanguínea bajo la aprobación del Comité de Ética de Investigación de la Universidad de Valencia H1511260556759, adjunto en el anexo I. Una vez realizada la extracción, se aíslan y cultivan las células mononucleares de las cuales se aislaron las VEs para tratar las células tumorales. Finalmente, se determinaron los parámetros de ciclo celular y apoptosis. A continuación, se describe el plan de trabajo en orden cronológico:

## **2.2 Cultivos celulares**

### **2.2.1 Aislamiento de células mononucleares**

Para separar las células mononucleares de las muestras sanguíneas se emplearon tubos vacutainer (Ref: 362780) con ficoll para separar las fracciones celulares. Obtenidas las células deben sembrarse en frascos de cultivo.

- **Procedimiento**

1. Obtención de muestras de sangre.
2. Centrifugar los tubos a 1800g, 20 minutos a T<sup>a</sup> ambiente.
3. Retirar el plasma de los tubos.
4. Recoger las células mononucleares de cada muestra en tubos falcon.
5. Centrifugar 10 minutos a 1500g.
6. Eliminar el sobrenadante y lavar con PBS.
7. Centrifugar a 500g durante 10 minutos y decantar el sobrenadante.
8. Contar las células en la cámara de Neubauer con ayuda del microscopio.
9. Sembrar  $7,5 \times 10^6$  células mononucleares en cada frasco T-75.

### **2.2.2 Tratamiento de las células mononucleares**

El tratamiento de células mononucleares se lleva a cabo con genisteína disuelta con DMSO a una concentración final de 0,5 uM en placa. Tras preparar el tratamiento, se filtra.

- **Procedimiento**

1. Pasadas 3 horas tras la siembra de las células mononucleares, tratar con 0.5uM de genisteína o DMSO (como control).
2. Incubar durante 48 horas.

### **2.2.3 Aislamiento de vesículas extracelulares**

El aislamiento de microvesículas se ha realizado mediante el protocolo extraído de Haqqani et al. (2013)<sup>20</sup>, a partir del sobrenadante del cultivo de células mononucleares.

- **Procedimiento**

1. Recoger el medio de cada frasco.
2. Centrifugar a 300g 10 minutos a 4°C y recoger el sobrenadante.
3. Centrifugar a 2000g 10 minutos a 4°C y recoger el sobrenadante.
4. Centrifugar a 20.000g 30 minutos a 4°C, recoger el sobrenadante y ponerlo en los tubos de ultracentrífuga.
5. Centrifugar a 100.000g 1h a 4°C
6. Lavar el pellet con PBS
7. Centrifugar a 100.000g 1h a 4°C
8. Resuspender el pellet con PBS.

**a. Tratamiento con vesículas extracelulares.**

Para tratar, debe retirarse el medio de los frascos y placas de cultivo, y añadir medio de cultivo nuevo con un 1% de SBF en los frascos destinados a medir ciclo celular y, sin SBF en aquellos que empleamos para medir apoptosis. Los frascos que reservamos para realizar posteriormente PCR también se dejaron sin suero.

A continuación, se añaden las VEs en una relación 2:1 en cuanto a números de células, es decir a una relación de las vesículas liberados por dos millones de células mononucleares se incuban con un millón de células HCT116.

Las células HCT116 se co-incubaron durante 48 con las VEs derivadas de las células mononucleares, tras este periodo las células fueron recogidas en función del análisis que se iba a realizar.

## **2.3 Análisis de miRNA**

### **2.3.1 Aislamiento de RNA**

Para realizar el aislamiento de RNA procedente de VEs se empleó el kit *Total Exosome RNA and Protein Isolation* siguiendo el protocolo (anexo II).

### **2.3.2 Cuantificación, pureza y control de integridad del RNA total extraído**

Uno de los pasos críticos en los análisis de microarrays es la calidad de las muestras de RNA, que se mide en base a tres parámetros básicos: pureza, concentración e integridad.

#### **a. Espectrofotometría**

La medida de la concentración del RNA total y la pureza de este se determinó mediante técnicas espectrofotométricas para controlar la calidad del material genético.

Los ácidos nucleicos absorben luz ultravioleta gracias a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de las cadenas del DNA o RNA, la cual es característica de la molécula y es usada para determinar su concentración. Para calcular la cantidad de RNA en una muestra, se realiza una determinación de la absorbancia a 260 nm y automáticamente el espectrofotómetro nos proporciona la concentración del RNA presente en cada muestra. Al ser muy baja la concentración de RNA de nuestras muestras individuales, se hicieron *pulls* de 3 muestras independientes que se trataron como una única muestra para el posterior estudio. Obteniendo así 4 muestras de miRNA procedentes de VEs de células mononucleares tratadas con genisteína y 4 procedentes de VEs de células mononucleares tratadas con DMSO.

La contaminación de las muestras con impurezas orgánicas e inorgánicas (p.ej. fenol, cloroformo) y proteína afecta significativamente a la sensibilidad y especificidad del resultado. Para comprobar la pureza de las muestras, se mide espectrofotométricamente la absorbancia a 280nm (A280), ya que mientras los ácidos nucleicos tienen su máximo de absorción a 260nm, las proteínas lo tienen a 280nm. La relación entre ambas absorbancias (A260/A280) nos indicará el estado del RNA total extraído. Las extracciones puras de RNA tienen una relación A260/A280 cercana a 2,0.

Las mediciones se realizaron con el espectrofotómetro GeneQuant Pro (GE Healthcare). Cada muestra se introdujo en un capilar de cuarzo para su medición en el espectrofotómetro. La medida de referencia o blanco se realizó con 3uL del agua de grado BPC utilizada para la disolución.

## **b. Electroforesis capilar**

La absorbancia a 260 nm y la relación A260/280 sólo nos da una indicación de la cantidad de RNA y del grado de contaminación de impurezas orgánicas e inorgánicas, pero no nos dice nada sobre el nivel de degradación del RNA. La integridad del RNA es un parámetro de gran importancia en los estudios de expresión génica. Existen dos métodos para determinar el grado de degradación del RNA total:

- Relación entre las bandas ribosomales 28S y 18S que se observan en un gel de agarosa como bandas discretas y cuya relación 28S/18S en un RNA íntegro es cercano a dos.
- RIN: el algoritmo RIN (RNA Integrity Number) pretende proporcionar una medida universal mucho más robusta. Permite la clasificación de las muestras en base a un sistema numérico de 1 a 10. Para las aplicaciones de microarrays se recomienda un RIN mínimo de 7. Este valor nos permite, además de evaluar la integridad del RNA, comparar directamente muestras de RNA y garantizar la reproducibilidad de los experimentos.

## **2.4 Perfiles de expresión de los RNA no codificantes**

Los perfiles de expresión se realizaron usando los microarrays GeneChip®miRNA 4.0 Array Affymetrix (Santa Clara, CA, USA). El microarray reúne 15.644 secuencias de microRNA maduros procedentes de la base miRBASE (v15) codificados a partir de 131 organismos, abarcando además 2.334 snoRNAs y scaRNAs y 2.202 conjuntos de sondas exclusivas de secuencias de pre-miRNA.

Se partió de 200ng de RNA total de cada muestra experimental, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los RNA no codificantes presentes en la muestra fueron marcados con el Kit FlasTag™Biotin HSR RNA Labeling Kit de Genisphere. A la muestra se le añadió los RNA Spike Control Oligos, estos oligos contienen los controles del microarray. Seguidamente se procedió a realizar la mezcla de reacción, ésta contenía el tampón de reacción junto con 25nM MnCl<sub>2</sub>, el ATP y la enzima PAP (poliadenilato polimerasa) para generar el extremo donde, seguidamente, se procede al marcaje. La mezcla de reacción junto con la muestra se incubó a 37°C durante 15 min. El marcaje se

realizó añadiendo 5X FlahTag Biotin HSR Ligation Mix y la T4 DNA Ligasa, que une las moléculas de marcaje a los extremos sintetizados en la reacción anterior. Se incubó durante 30 minutos a 25°C y finalmente se paró la reacción añadiendo la solución HSR Stop Solution. Este proceso se realizó en el termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystem). A continuación se realizó el cóctel de hibridación para cada una de las muestras, el cual contenía los controles de hibridación y de alineamiento respectivos. Cada cóctel de hibridación fue introducido en su respectivo microarray e hibridado en el horno de hibridación específico Hybridization Oven 640 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) durante 18 h a 48°C. tras este periodo, los microarrays pasaron por un tren de lavados y marcaje con ficoeritrina-estreptoavidina en la estación de lavados GeneChip®Fluidics Station 450 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA).

El protocolo específico, en la estación de lavados, indicado para los GeneChip®miRNA 4.0 Array fue el FS450\_0003. Posteriormente, los microarrays fueron escaneados con el GeneChip®Scanner 3000 7G (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), obteniéndose las imágenes de cada muestra. Las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante el software GeneChip®Command Console (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) y junto con el software miRNA QC Tool v.1.1.10 ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)) se procedió a realizar la sumarización, normalización y controles de calidad de cada una de ellas.

## **2.5 Análisis de los datos de microarrays**

Los datos (CEL files) fueron analizados y estadísticamente filtrados usando el software Partek Genomic Suite 6.6 (Partek Inc., St Louis, MO). Los resultados fueron normalizados con el algoritmo RMA. Tras realizar una ANOVA de una variable con todas las muestras, fueron identificados RNAs no codificantes estadísticamente significativos entre diferentes grupos. Los genes se filtraron aplicando la combinación de un p-valor  $\leq 0.05$  y según el cambio de expresión (fold change) de  $< |\pm 2|$ .

Los datos importados fueron analizados mediante un Análisis de Componentes Principales (PCA) para determinar las fuentes significativas de la variabilidad de los datos. La distancia entre parejas de puntos esta relativizado con la similitud entre dos muestras en el espacio dimensional (en este caso, cada variable correspondía a un espacio dimensional). Las muestras que están cerca en el conjunto, son similares en un



gran número de variables. Al contrario, muestras que están lejos del conjunto son diferentes en un gran número de variables.

Finalmente, los miRNA que eran estadísticamente significativos fueron representados en base a su Fold change en un heatmap donde se recogen los miRNA con una significación de  $p \leq 0.05$  y un cambio de fold change superior a 2.

## **2.6 Determinación del ciclo celular**

Para determinar el porcentaje de células que se encuentran en las distintas fases del ciclo celular, empleamos el kit PI/RNASE (Inmunostep, Salamanca (Spain)). Dicho kit contiene yoduro de propidio (PI), que es el colorante más utilizado para el análisis del DNA y ciclo celular para la citometría de flujo. El PI se une al DNA mediante la intercalación en las macromoléculas de doble cadena.

Para el empleo de este kit se siguieron los pasos que indicaba el protocolo adjunto en el anexo III.

## **2.7 Determinación de la apoptosis**

Para determinar el porcentaje de células apoptóticas por citometría de flujo se utilizó el kit *ANEXINA V FITC* (Inmunostep, Salamanca (Spain)). Una de las indicaciones más tempranas de la apoptosis es la translocación de la membrana fosfolípido fosfatidilserina (PS) de la parte interna a la lámina externa de la membrana plasmática. Cuando se exponen al ambiente extracelular, los sitios de unión de PS están disponibles para la Anexina V, por la que tienen gran afinidad. La Anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de 35-36 kDa que puede conjugarse con un fluorocromo y emplearse para identificar por medio de citometría de flujo las células en apoptosis. Para el empleo de este kit se siguieron los pasos que indicaba el protocolo adjunto en el anexo IV.

## **2.8 Determinación de la expresión génica**

### **2.8.1 Aislamiento de RNA**

Para la extracción de RNA total de los tejidos se utiliza como reactivo TRIzol® Reagent (Sigma-Aldrich), siguiendo las indicaciones del protocolo (anexo V) establecido por el

fabricante, que es una modificación del método de extracción en un solo paso de Chomczynski y Sacchi <sup>24</sup>. Este método se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para la lisis de las células y la separación de la muestra en dos fases (acuosa y orgánica). De este modo podremos separar las proteínas y el DNA, del RNA.

### **2.8.2 Retrotranscripción-Amplificación del RNA (RT-PCR) en tiempo real**

En la actualidad, existen varios métodos de determinación de la expresión del RNA mensajero, como el *Northern Blotting*, la hibridación *in situ*, los ensayos basados en la protección frente a las RNasas, *arrays* de DNA copia (cDNA) y retrotranscripción-amplificación (RT-PCR) del mRNA.

Nosotros empleamos la RT-PCR para determinar la expresión del mRNA, que consta básicamente de dos pasos, síntesis de cDNA (retrotranscripción RT) y amplificación cuantitativa del RNA (PCR) a tiempo real, los cuales aparecen explicados en el anexo VI.

### **2.9 Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se ha usado el programa IBM SPSS statistics 21. Se ha tomado un intervalo de confianza al 95% ( $p=0.05$ ) para aceptar que hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los grupos.

Se ha usado la prueba T para comparar 2 medias y el test estadístico ANOVA en el caso de que se comparen más de 2 medias con un factor de variación.

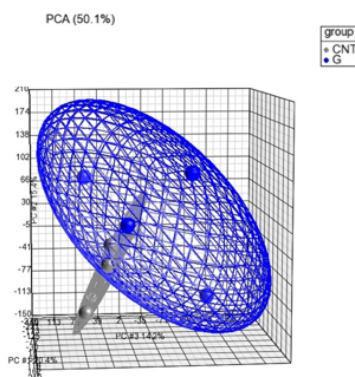
La simbología empleada en el presente TFM es el siguiente: \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ .

## IV. RESULTADOS

### 1. Análisis del perfil de expresión de los miRNA

#### a. Análisis de los Componentes Principales (PCA) de los miRNAs

El análisis de los componentes principales de todos los RNAs no codificantes obtenidos a través del GeneChip® miRNA 4.0 Array nos mostró que el grupo de VEs procedentes de células mononucleares tratadas con genisteína presentaba un patrón de expresión diferente al compararlo con el grupo control. Esto se observa en la Figura 4 donde la elipse azul que engloba al grupo de genisteína se encuentra en una direccionalidad distinta que la figura representada en gris, correspondiente al grupo control. Lo cual indica un patrón diferente de las células tratadas con VEs liberadas por células mononucleares tratadas con genisteína respecto del control.



*Figura 4: PCA de los RNA no codificantes de VEs liberadas por células mononucleares tratadas con genisteína y DMSO. Las elipses representan en gris, el grupo control y en azul, genisteína.*

#### b. Heatmap

A partir del análisis del filtrado, usando un p valor 0.5 y fold change 1.8, de todos los RNA no codificantes obtenidos a través del GeneChip® miRNA 4.0 Array adquirimos otro resultado: los miRNA presentes en las VEs liberadas por células mononucleares tratadas con genisteína (Figura 5). El heatmap nos mostró que las VEs contenían en su interior 17 miRNAs infraexpresados y 1 sobreexpresado (rojo).

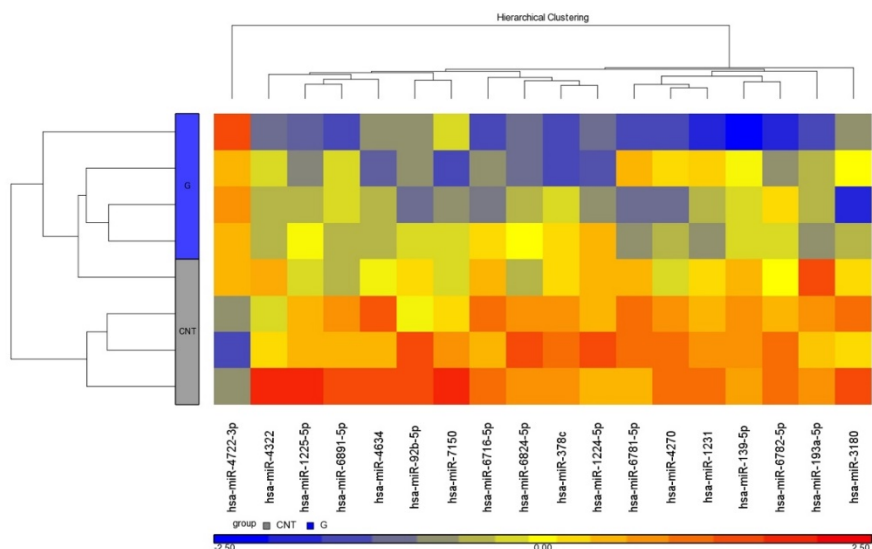


Figura 5: Heatmap de la expresión de microARN de microvesículas aisladas de PBMC tratadas con genisteína. Análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado de dos grupos transcriptómicos. Las barras rojas y azules indican genes que muestran un aumento y una disminución de la expresión, respectivamente, en función de los valores de intensidad de fluorescencia relativa promedio.

A partir de todos los miRNA obtenidos a través del GeneChip® miRNA 4.0 Array procedimos a realizar un análisis estadístico mediante el ANOVA de todas las variables. El filtrado se realizó mediante la combinación de un fold change de  $|2|$  y p- valor  $\leq 0.05$ . Se compararon los miRNA presentes en las VEs liberadas por células mononucleares tratadas con genisteína con los del grupo control. Así, identificamos 18 miRNA no codificantes que cambiaban significativamente cuando comparábamos el grupo genisteína con el grupo control. De ellos, solo uno se encontraba sobreexpresado y el resto, infraexpresados, los cuales están representados en el heatmap (Figura 5). De este modo, los miRNA que se encontraron con una expresión diferencial específicamente en el grupo genisteína comparados con el grupo control se han representado en la *Tabla 2*, junto con los genes diana de dichos miRNA usando la aplicación web de Target Scan y TarBase v7.0 proporcionado por diana lab tools webpage (<http://www.microrna.gr/miRPathv3>).

Transcript ID (Array Design)	p-valor (Gen vs. Cnt)	Fold- Change (Gen vs. Cnt)	Genes diana
<b>hsa-miR-193a-5p</b>	0,02	-2,56	KLRD1, IFNGR2, NCR1, ERBB2, IDO1, PDE1C, NT5C1B, CREB3L3, GABBR2, GANAB, DHCR24, COL1A1
<b>hsa-miR-4634</b>	0,010	-2,90	FUT6, DHCR24
<b>hsa-miR-6781-5p</b>	0,015	-2,24	ACSL5, FASN, CPT1C, ACADVL, GNG13, CACNA1G, ADCY5, RASD1, GNG7, CACNA1H
<b>hsa-miR-6716-5p</b>	0,015	-2,89	CYP11B1, SLC8A1
<b>hsa-miR-92b-5p</b>	0,018	-2,08	NKX2-2, ONECUT1, FOXA2, WNT4, ID1, FZD1, WNT9A, ACOX1, HLA-B, EXTL3, TPK1, ST3GAL3, CSNK2A1, EHD4, PML, ARFGAP1, ARFGAP2, EPN3, RAB11B, GABRA3, TAF6, HCFC1, PER2
<b>hsa-miR-1224-5p</b>	0,018	-2,03	BCAT1, HGSNAT, AP1S2, TPP1, AKT1, MYC, PFKL, FGFR1, SLC1A5, EXT1
<b>hsa-miR-378c</b>	0,020	-2,05	TERC, GNAS, GNG5, KCNJ5, GNAI1, MAPK1, BMI1, DICER1, CRKL, BCL2, GLS, CDK6, E2F3, BMF, PTEN, MAM2, BCL2L11, MOCS3, URM1
<b>hsa-miR-4722-3p</b>	<b>0,022</b>	<b>2,04</b>	<b>FUT1, B3GNT2, GGT5, GGT6 MOCS1, DHFR, YAP1, YWHAE, NF2, CCND2, CDH1, CTNNB1, POLR2C, TXNRD2, NT5C2, CLDN19, PVR, CD276, ACP1, CSNK2A1, GALNT6, B3GNT2, ACE, WNT7B, CAMPK2D, NFKB1, RAF1, RPS6KA5, PLCG1, JUN, TRAF6, HRAS, RPS6KA3, AKT3, PIK3CA, ATF4, TGFA, CDKN1B, IGFR1, CTNNB1, HSP90B1, MMP2, GNAI2, CTNND1, TAB3, PLCG1, TRAF6, TRIM25, XIAP</b>
<b>hsa-miR-3180</b>	0,026	-2,03	NEU4, SMAD3, TGFB1, ACVR2B, AMH
<b>hsa-miR-4270</b>	0,030	-2,47	GSTM5
<b>hsa-miR-4322</b>	0,035	-2,31	WBSCR17, GALNT5, SRR, AMT, SDS, GLYCTK, KIR2DL4, PRF1, SYK, GZMB, KIR2DL3, SOS1, KIR3DL2, GZMB, KIR3DL2
<b>hsa-miR-1231</b>	0,037	-3,18	UGT2A1, KYNU, CCBL2, LIF, IL6ST, COL1A2, ACO1, GNAI2
<b>hsa-miR-6824-5p</b>	0,037	-2,07	BMPR1B, FFZD3, SMAD4, NANOG, MAP2K1, FZD9, PPP3CC, FZD3, SKP1, NFATC4, SMAD4, CALM1, ESR2, CREB3L1, BRAF, TYR, CREB3L1
<b>hsa-miR-1225-5p</b>	0,040	-3,35	MGST1, GALNT11, HLA-DOA, FAS, IFNG, CFLAR, OAS1, IL33, GNAI3
<b>hsa-miR-6782-5p</b>	0,045	-2,11	TJP1, TUBB4A, MAPK3, GJA1, MAPK1, ADCY4, SMAD3, ACVR2A, GCNT3, GALNT14, PPP1R12B
<b>hsa-miR-139-5p</b>	0,049	-2,20	ACADM, GOT2, MUT, PDE3A, GABBR2, YAP1, YWHAE, NF2, CCND2, CTNNB1, WNT7B, CAMK2D, NFKB1, TRAF6, HRAS, ATF4, NMP2, GNAI2, CTNND1, CDH1, TRIM25, XIAP
<b>hsa-miR-7150</b>	0,050	-2,09	PLCB3, TG, ALDH7A1
<b>hsa-miR-6891-5p</b>	0,050	-2,11	ATP1B2, GPX6, PLCB3, TG, LAMA5, COL6A2, SDC3, CD40LG, CADM1, CDH1, PYCR2, NOS1

Tabla 2: miRNA que cambian significativamente al comparar los grupos. Se incluyen el p-valor de cada uno de ellos (Gen se refiere a las VEs liberadas por células mononucleares tratadas con

genisteína y, Cnt, tratadas con DMSO), el fold-change, así como los genes diana de dichos miRNA según las bases de datos, Targetscan y Tarbase. Los nombres de cada uno de los genes presentes en la tabla se encuentran en el anexo VII.

## 2. Ciclo celular

Tras ver que varios de los genes diana de los miRNA significativos tenían genes diana implicados tanto en los procesos de proliferación como diferenciación celular, nos planteamos estudiar si las vesículas podrían inducir variaciones en las diferentes fases del ciclo celular (fases G2/M, S y G1) de las células tumorales HCT116. Una vez pasadas las 48h de tratamiento con VEs se determinó mediante citometría de flujo, la fase del ciclo celular en la que se encontraban cada una de las células de nuestro cultivo (Figura 6). Y se observó que el número de eventos (células) en fase S o G1 (Figuras 7a y b) no muestran modificaciones de los grupos tratados con VEs procedentes de células mononucleares tratadas con genisteína con respecto del grupo control. Sin embargo se observan diferencias significativas entre dichos grupos en fase G2/M. Esta fase es en la que se encuentran las células en un estadio de proliferación. Lo cual indica que está siendo menor el índice de división de las células tumorales tratadas con VES procedente de células mononucleares tratadas con genisteína, tal y como muestra la figura 7c.

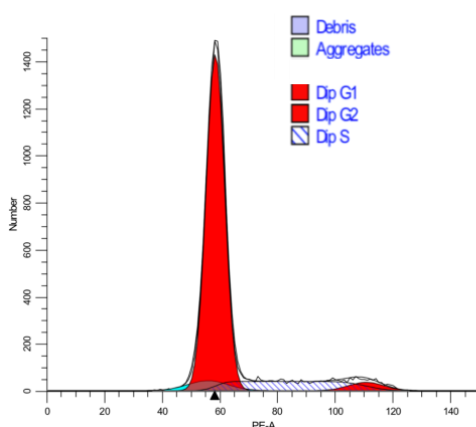
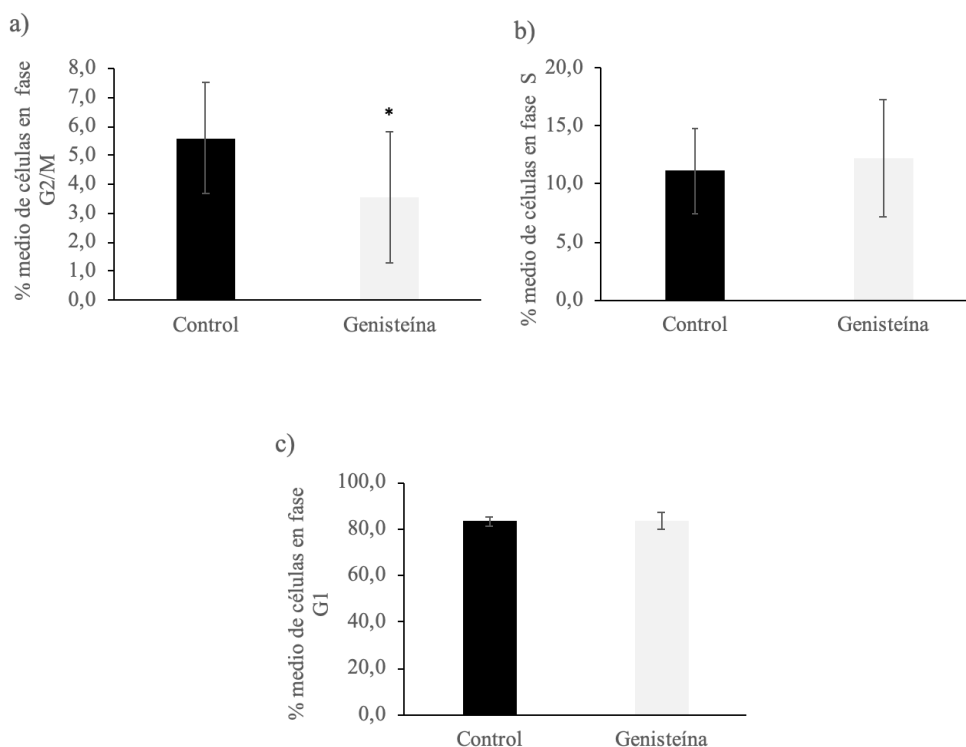


Figura 6: Análisis de ciclo celular por citometría de flujo. El primer pico en color rojo y de mayor tamaño, corresponde al de la fase G1 del ciclo; el segundo, también en rojo y de menor tamaño, a la G2/M y, por último la zona rayada representa la fase S. En el gráfico también aparecen representados los debris (gris) y agregados (amarillos).



*Figura 7: Ciclo celular. Determinación por citometría de flujo de las variaciones sufridas en las distintas etapas del ciclo celular a partir del tratamiento de células tumorales con VEs procedentes de células mononucleares tratadas con genisteína. La figura 6a representa el porcentaje medio de células en fase G2/M del ciclo celular; 6b el de células en fase S y 6c el de células en fase G1. Los valores de los resultados se expresan como media  $\pm$  desviación estándar, n=4. La significación estadística se expresa como \* $p < 0.05$  vs control.*

### 3. Apoptosis

Por otra parte, estudiamos las variaciones inducidas por VEs procedentes de células mononucleares tratadas con genisteína, a nivel de muerte celular. El motivo es que algunos estudios indican que la luteolina, un compuesto de la misma familia que la genisteína (flavonoides), es capaz de inducir la apoptosis en células tumorales.<sup>25</sup>

De esta manera estudiamos las células que se encuentran en un estado apoptótico de los grupos tratados con VEs control y genisteína. Los resultados de citometría nos ofrecen

el número de células necróticas, sanas y apoptóticas (figura 8). En nuestro estudio no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (figura 9).

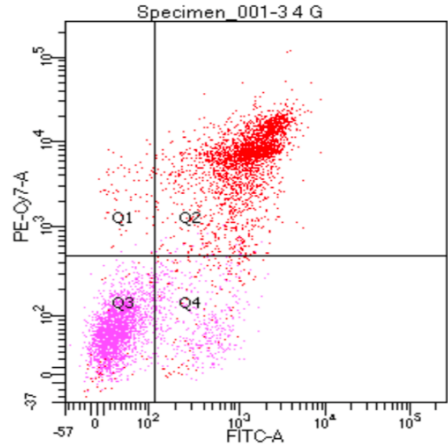


Figura 8: Análisis de la apoptosis celular mediante citometría de flujo. Se representan los eventos captados por el citómetro separándolos en 4 cuadrantes de manera que: Q1 engloba células necróticas, Q2 muertas, Q3 sanas y Q4 apoptóticas.

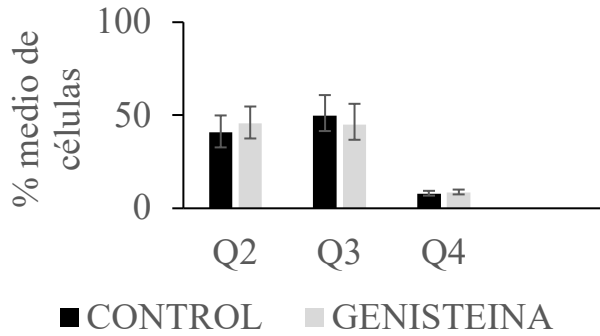


Figura 9: Apoptosis. Determinación por citometría de flujo de la media de células necróticas, sanas y apoptóticas de los grupos control (negro) y genisteína (gris). Donde Q1 representa la media de células necróticas, Q2 muertas, Q3 sanas y Q4 apoptóticas. Los valores de los resultados se expresan como media  $\pm$  desviación estándar,  $n=4$ . La significación estadística se expresa como  $*p<0.05$  vs control.



#### 4. Estudio de la expresión génica

Debido a que en las bases de datos estudiadas (target scan), dos de los genes diana del miRNA (miRNA-4722-3p) que se encontraba sobreexpresado en las VEs de las células mononucleares tratadas con genisteína, eran CDH1, que desempeña *un papel importante en la supresión de tumores*, y CCND2 que *regula el ciclo celular en la fase G1/S*, analizamos su expresión. Como se muestra en las Figuras 10 y 11, no se produjeron cambios en la expresión del mRNA de CDH1 ni CCND2 en las células HTC116 tras el tratamiento con VEs.

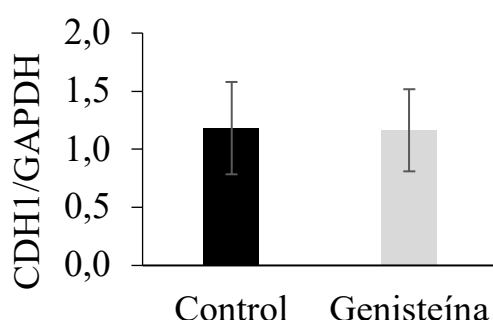


Figura 10: Niveles de mRNA de CDH1 en células HCT116 tratadas con VEs liberadas por células mononucleares tratadas con genisteína. Los valores de los resultados se expresan como media  $\pm$  desviación estándar,  $n=4$ . La significación estadística se expresa como  $*p<0.05$  vs control.

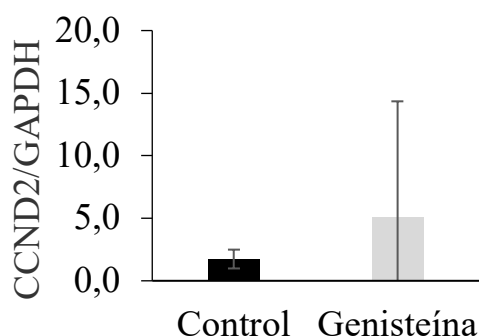


Figura 11: Niveles de mRNA de CCND2 en células HCT116 tratadas con VEs liberadas por células mononucleares tratadas con genisteína. Los valores de los resultados se expresan como media  $\pm$  desviación estándar,  $n=4$ . La significación estadística se expresa como  $*p<0.05$  vs control.

## V. DISCUSIÓN

Las vesículas extracelulares suponen un tema de investigación novedoso y muy prometedor. De hecho, se sabe que son un medio de comunicación celular, no solo a nivel autocrino y paracrino, sino también a nivel sistémico (endocrino). Además, al proceder de células mononucleares, las cuales liberan un gran número de VEs, esto nos conduce a tener una fuente importante de miRNA circulantes encapsulados en VEs. Por lo tanto, las VEs contienen información genética, y la transferencia de dicha información puede inducir entre otros, cambios epigenéticos en las células diana<sup>26</sup>. En base a esto, decidimos ver el efecto que podría derivarse del tratamiento con VEs procedentes de células mononucleares tratadas con genisteína sobre el ciclo celular y apoptosis.

### 1. Determinación de miRNA

En la actualidad, tras el aumento de interés por los miRNA, existe un gran número de estudios dedicados a investigar las posibles funciones de cada uno de ellos. Es importante destacar que hasta ahora se han medido miRNA circulantes, no inmersos en el interior de VEs como es nuestro caso. Ahora bien, en cuanto a sus funciones descritas, son múltiples y diferentes. De los miRNA de nuestro estudio se conoce que hsa-miR-193a-5p estaba significativamente regulado al alza en pacientes en terapia para tratar la leucemia mieloide crónica<sup>27</sup>. Además se ha demostrado que su regulación al alza podría disminuir la expresión de IL-12 (citoquina proinflamatoria)<sup>28, 29</sup>. Hsa-miR-92b-5p está regulado a la baja en los fibroblastos de pacientes con paladar hendido no sindrómico<sup>30</sup> y está sobreexpresado en muchos tumores<sup>31</sup>; hsa-miR-4270 y hsa-miR-1225-5p se encuentran en pacientes con cáncer de mama en estadios I, II y III<sup>6, 8</sup>. Por otra parte, hsa-miR-378c reduce su expresión en pacientes con cáncer de colon en estadio II<sup>32</sup>, mientras que hsa-miR-139-5p es un miRNA clave relacionado con el carcinoma hepatocelular, asociado con el pronóstico de los pacientes con este tipo de cáncer<sup>33</sup>. De hecho, podría actuar como un indicador de pronóstico favorable para los pacientes. El nivel de expresión de hsa-miR-1231 en los exosomas plasmáticos de pacientes con cáncer de páncreas fue significativamente más bajo que en los controles sanos y es mayor su expresión en pacientes con estadio I-II que III<sup>34</sup>.

En cuanto a hsa-miR-6782-5p, es el único que en nuestro estudio se sobreexpresaba y es un biomarcador circulante candidato para la actividad metastásica del cáncer de próstata<sup>35</sup>. Por otra parte, encontramos que algunos miRNA como es el caso de hsa-miR-4634, entre otros, no ejercen funciones relacionadas con el cáncer. En este caso concreto, hay estudios que sugieren que está relacionado con células dendríticas infectadas con virus<sup>36</sup>. Sin embargo, debido a la gran cantidad de miRNA existentes, aún se desconoce la función de muchos de ellos entre los que se encuentran varios de nuestros miRNA infraexpresados y el sobreexpresado: hsa-miR-6781-5p, hsa-miR-6716-5p, hsa-miR-1224-5p, hsa-miR-4722-3p, hsa-miR-3180, hsa-miR-4322, hsa-miR-6824-5p, hsa-miR-7150, hsa-miR-6891-5p. Es por ello por lo que se necesita seguir investigando y avanzando en este gran campo con el fin de adquirir nuevos conocimientos que nos lleven hacia nuevas expectativas futuras.

## **2. Ciclo celular**

Alrededor del 30% de los cánceres se asocian con factores dietéticos, por lo que existen importantes evidencias acerca del papel de la nutrición en el control o estimulación de los tumores. Lo que es más, se ha demostrado que la combinación de un tratamiento químico con una dieta rica en fitoconstituyentes incrementa la eficacia de las terapias, disminuye la resistencia a los fármacos por parte de las células tumorales y, a su vez, la toxicidad sistémica de los fármacos.

En la fase de inicio del cáncer la prevención o reversión puede lograrse mediante el empleo de sustancias antioxidantes<sup>37,38</sup> y antiinflamatorias. Los polifenoles presentan ambas características, pudiendo intervenir además, en la inmunidad del huésped y generando cambios en las vías de señalización celular. Por ello, se consideran agentes quimiopreventivos eficaces.<sup>38</sup>

Existen numerosos estudios epidemiológicos en modelos animales (ratones) que sugieren propiedades anticancerosas de los polifenoles: el consumo de té verde redujo la incidencia de cáncer de mama<sup>39</sup> e inhibió la formación de tumores pulmonares<sup>40</sup>; el de tomate también generó una disminución del cáncer de próstata<sup>6</sup> y, además, los polifenoles de manera aislada (resveratrol, catequina, quercetina...) ejercen efectos protectores<sup>42</sup>. Por otra parte, en estudios con líneas celulares, han observado que la

genisteína inhibe de manera significativa la proliferación e invasión de varias líneas debido a que detienen la fase G2/M del ciclo celular<sup>22</sup>.

Uno de los principales objetivos de nuestro trabajo era estudiar el papel antiproliferativo de un polifenol de manera aislada, la genisteína. Nuestros resultados concuerdan con la bibliografía, ya que muestran una disminución de la proliferación de las células tumorales, (se reducen las células en fase G2/M) tratadas con VEs liberadas por células mononucleares tratadas con genisteína respecto al control. Además, las diferencias entre el grupo control y genisteína, fueron significativas.

Sin embargo, en nuestro caso, en contraposición a como muestran otros estudios donde los polifenoles inducen la detección de otras fases (S)<sup>43, 44</sup>, no vimos diferencias significativas.

### **3. Apoptosis**

Cuando nos enfrentamos a un cáncer, es fundamental conocer en qué estado se encuentra ya que, a diferencia de cuando se halla en fase de inicio como se comentaba en el apartado anterior, para conseguir inhibir la fase proliferativa, se requiere inducir apoptosis en las células tumorales.<sup>38</sup> En este caso, los polifenoles también cobran importancia<sup>45</sup>, ya que existen estudios que tras tratar células de cáncer de vesícula biliar con distinta concentración de estas sustancias procedentes del té verde, desencadenaron apoptosis en dichas células tumorales<sup>46, 44</sup>. Otro ejemplo, esta vez con genisteína, el polifenol empleado en nuestro estudio, es una investigación donde sugieren que dicho compuesto induce apoptosis en células de cáncer cervical<sup>47</sup>.

En nuestro caso, a diferencia de la bibliografía, los resultados que hemos obtenido no muestran diferencias significativas entre las células tumorales tratadas con VEs liberadas por células mononucleares tratadas con genisteína y las tratadas con DMSO.

### **4. Estudio de la expresión génica**

Varios estudios sugieren que la inactivación de la expresión del gen CDH1 aumenta la invasión y la capacidad de producir metástasis en numerosos tumores humanos. Por ello, sería muy positivo conseguir una sobreexpresión del gen, pues ejercería un papel antiproliferativo del tumor<sup>48</sup>.

Nuestros resultados, sin embargo, no muestran un cambio significativo de expresión del gen tras el tratamiento de las células HCT116 con VEs liberadas por células mononucleares tratadas con genisteína. La razón por la que creemos que sucede esto es por el hecho de que CDH1 es un supresor tumoral y las células con las que hemos trabajado son cancerígenas (HCT116). Por este motivo, sus valores de CDH1 han de ser bajos, lo que causa que para que exista un cambio, como el que se hipotetizó al inicio del estudio, se necesite activar totalmente el gen, ya que sus valores de partida son muy bajos.

Por otra parte, resultados de investigaciones parecen indicar que la expresión a la alza de la ciclina D2 (CCND2) causa el desarrollo y progresión del cáncer de pulmón. Debido a ello, lograr una infraexpresión de dicho gen permitiría reducir el crecimiento del tumor. Los resultados que hemos obtenido mediante PCR no presentan diferencias significativas en la expresión de CCND2 tras el tratamiento de las células HCT116 con VEs liberadas por células mononucleares tratadas con genisteína<sup>3</sup>. Como trabajamos con células de cáncer de colon, deben presentar el gen CCND2 sobreexpresado, generando así un paso de las células en fase G1/S a G2/M más rápido y produciendo una tasa de división mayor. Por tanto, para que podamos ver algún cambio significativo en la expresión debería de conseguirse un efecto muy potente del tratamiento y que CCND2 quede inhibido o altamente infraexpresado.

En resumen, nuestros resultados sugieren que el tratamiento con VEs disminuye significativamente el número de células presentes en la fase G2/M del ciclo celular, es decir, en división. Sin embargo, no ejerce grandes efectos sobre la apoptosis celular. Por lo tanto, el uso de VEs podría llevarse a cabo para desarrollar estrategias de intervención con el fin de prevenir o revertir el desarrollo y proliferación tumoral.

## VI. CONCLUSIONES

Este estudio y el conjunto de los resultados obtenidos permiten desarrollar las conclusiones que se enumeran a continuación:

- 1) Las vesículas extracelulares liberadas por las células mononucleares tratadas con genisteína contienen 18 miRNA significativos, 17 infraexpresados y 1 sobreexpresado con respecto al control.
- 2) Se han localizado genes diana de los miRNA, presentes en las VEs, que están implicados en la regulación del ciclo celular.
- 3) El tratamiento *in vitro* con vesículas extracelulares liberadas por células mononucleares tratadas con genisteína inducen una disminución significativa de la fase G2/M en las células tumorales.
- 4) El tratamiento *in vitro* con vesículas extracelulares de células mononucleares tratadas con genisteína no genera cambios significativos en la apoptosis de las células tumorales.

La conclusión general de este trabajo es que el tratamiento con vesículas extracelulares podría ser una estrategia antitumoral basada en la disminución de la proliferación de células tumorales.

## **VII. LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

- La limitación más importante del estudio es el número de sujetos que participan en él, ya que nuestra “n” es de 4, por lo tanto el bajo tamaño muestral puede influir en la obtención de resultados significativos.
- Otra limitación es que para el presente trabajo se han empleado tanto monocitos como linfocitos y podría ser que las VEs que derivan de cada tipo celular sean ligeramente diferentes y por tanto su efecto a nivel celular. Sin embargo, hemos considerado el conjunto de células mononucleares ya que ambas son transportadas por nuestro sistema linfático.
- Los estudios se han llevado a cabo con una sola línea tumoral y se deberían utilizar diferentes líneas celulares para ver si el trabajo es reproducible en estas.
- Por último, damos por hecho que las VEs entran en las células, ya que es lo que está descrito en la bibliografía y vemos un efecto en la célula receptora, pero dicho estudio no se ha realizado.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Quiñones, M., & Aleixandre, M. M. A. (2012). Los polifenoles , compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular COMPOUNDS WITH BENEFICIAL EFFECTS, 27(1), 76–89. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>
2. Niedzwiecki, A., Roomi, M. W., Kalinovsky, T., & Rath, M. (2016). Anticancer efficacy of polyphenols and their combinations. *Nutrients*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/nu8090552>
3. Gambini, J., Inglés, M., Olaso, G., Lopez-Grueso, R., Bonet-Costa, V., Gimeno-Mallench, L., ... Borrás, C. (2015). Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans . *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2015/837042>
4. Heijnen, H. F., Schiel, A. E., Fijnheer, R., Geuze, H. J., & Sixma, J. J. (1999). Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood*, 94(11), 3791–3799. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10572093>
5. Meng, Y., Zhang, Y., Ma, Z., Zhou, H., Ni, J., Liao, H., & Tang, Q. (2019). Genistein attenuates pathological cardiac hypertrophy in vivo and in vitro. *Herz*, 44(3), 247–256. <https://doi.org/10.1007/s00059-017-4635-5>
6. Jere, K. C., Hungerford, D., Bar-zeev, N., Kanjerwa, O., Houpt, E. R., Operario, D. J., ... Building, R. R. (2000). Long noncoding RNA JPX correlates with poor prognosis and tumor progression in non-small cell lung cancer by interacting with miR-145-5p and CCND2. Oxford University Press, 1–33. <https://doi.org/10.1093/jas/sky123/4962501>
7. Schreihöfer, D. A., & Oppong-Gyebi, A. (2019). Genistein: mechanisms of action for a pleiotropic neuroprotective agent in stroke. *Nutritional Neuroscience*, 22(6), 375–391. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1391933>



8. Hamam, R., Ali, A. M., Alsaleh, K. A., Kassem, M., Alfayez, M., Aldahmash, A., & Alajez, N. M. (2016). microRNA expression profiling on individual breast cancer patients identifies novel panel of circulating microRNA for early detection. *Scientific Reports*, 6(May), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep25997>
9. Ye, S., Wang, T.-T., Cai, B., Wang, Y., Li, J., Zhan, J.-X., & Shen, G.-M. (2017). Genistein protects hippocampal neurons against injury by regulating calcium/calmodulin dependent protein kinase IV protein levels in Alzheimer's disease model rats. *Neural Regeneration Research*, 12(9), 1479–1484. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.215260>
10. Ono, M., Ejima, K., Higuchi, T., Takeshima, M., Wakimoto, R., & Nakano, S. (2017). Equol Enhances Apoptosis-inducing Activity of Genistein by Increasing Bax/Bcl-xL Expression Ratio in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Nutrition and Cancer*, 69(8), 1300–1307. <https://doi.org/10.1080/01635581.2017.1367945>
11. Thyagarajan, A., & Sahu, R. P. (2018). Potential Contributions of Antioxidants to Cancer Therapy: Immunomodulation and Radiosensitization. *Integrative Cancer Therapies*, 17(2), 210–216. <https://doi.org/10.1177/1534735416681639>
12. Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology*, 200(4), 373–383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
13. Sáenz-Cuesta, M. (2015). Aplicación clínica de las vesículas extracelulares en la esclerosis múltiple, 2015(cc), 1–178.
14. Weilner, S., Schraml, E., Redl, H., Grillari-Voglauer, R., & Grillari, J. (2013). Secretion of microvesicular miRNAs in cellular and organismal aging. *Experimental Gerontology*, 48(7), 626–633. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2012.11.017>
15. Commons, C., Commons, C., & Commons, C. (n.d.). Identificación y caracterización funcional de microRNAs en cáncer de mama Tesis Doctoral Andrea Feliciano Aguirre.

16. Catherine Sánchez, N. (2015). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(4), 553–562. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(13\)70659-x](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(13)70659-x)
17. Redondo-Blanco, S. (2014). Modulación de la apoptosis en líneas celulares de cáncer de colon mediante compuestos bioactivos ., 44.
18. De Sá Junior, P. L., Câmara, D. A. D., Porcacchia, A. S., Fonseca, P. M. M., Jorge, S. D., Araldi, R. P., & Ferreira, A. K. (2017). The Roles of ROS in Cancer Heterogeneity and Therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2467940>
19. Hong, E.-H., Heo, E.-Y., Song, J.-H., Kwon, B.-E., Lee, J.-Y., Park, Y., ... Ko, H.-J. (2017). *Trans*-scirpusin A showed antitumor effects via autophagy activation and apoptosis induction of colorectal cancer cells. *Oncotarget*, 8(25), 41401–41411. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17388>
20. Yao, J., Wei, C., Wang, J. Y., Zhang, R., Li, Y. X., & Wang, L. S. (2015). Effect of resveratrol on Treg/Th17 signaling and ulcerative colitis treatment in mice. *World Journal of Gastroenterology*, 21(21), 6572–6581. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i21.6572>
21. Mileo, A. M., Nisticò, P., & Miccadei, S. (2019). Polyphenols: Immunomodulatory and Therapeutic Implication in Colorectal Cancer. *Frontiers in Immunology*, 10(April), 729. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00729>
22. Zhang, C., Lv, B., Yi, C., Cui, X., Sui, S., Li, X., ... Liu, Z. (2019). Genistein inhibits human papillary thyroid cancer cell detachment, invasion and metastasis. *Journal of Cancer*, 10(3), 737–748. <https://doi.org/10.7150/jca.28111>
23. Haqqani, A. S., Delaney, C. E., Tremblay, T.-L., Sodja, C., Sandhu, J. K., & Stanimirovic, D. B. (2013). Method for isolation and molecular characterization of extracellular microvesicles released from brain endothelial cells. *Fluids and Barriers of the CNS*, 10(1), 4. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-10-4>
24. Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156–159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)

25. Couture, R., Mora, N., Bittar, S. Al, Najih, M., Touaibia, M., & Martin, L. J. (2019). Luteolin modulates gene expression related to steroidogenesis , apoptosis , and stress response in rat LC540 tumor Leydig cells. *Cell Biol Toxicol*.
26. Quesenberry, P. J., Aliotta, J., Deregibus, M. C., & Camussi, G. (2015). Role of extracellular RNA-carrying vesicles in cell differentiation and reprogramming. *Stem Cell Research and Therapy*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0150-x>
27. Prinsloo, A., Pool, R., & Van Niekerk, C. (2017). Preliminary data on microRNA expression profiles in a group of South African patients diagnosed with chronic myeloid leukaemia. *Molecular and Clinical Oncology*, 7(3), 386–390. <https://doi.org/10.3892/mco.2017.1319>
28. Moushi, A., Michailidou, K., Soteriou, M., Cariolou, M., & Bashiardes, E. (2018). MicroRNAs as possible biomarkers for screening of aortic aneurysms: a systematic review and validation study. *Biomarkers*, 23(3), 253–264. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2018.1423704>
29. Riaz, N., Wolden, S. L., Gelblum, D. Y., & Eric, J. (2016). Evidence for Epigenetic Regulation of Pro-inflammatory Cytokines, Interleukin-12 and Interferon Gamma, in Peripheral Blood Mononuclear Cells from PTSD patients. *J Neuroimmune Pharmacol*, 118(24), 6072–6078. <https://doi.org/10.1002/cncr.27633.Percutaneous>
30. Schoen, C., Glennon, J. C., Abghari, S., Bloemen, M., Aschrafi, A., Carels, C. E. L., & Von den Hoff, J. W. (2018). Differential microRNA expression in cultured palatal fibroblasts from infants with cleft palate and controls. *European Journal of Orthodontics*, 40(1), 90–96. <https://doi.org/10.1093/ejo/cjx034>
31. Grange, C., Brossa, A., & Bussolati, B. (2019). Extracellular Vesicles and Carried miRNAs in the Progression of Renal Cell Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 1832. <https://doi.org/10.3390/ijms20081832>
32. Gungormez, C., Gumushan Aktas, H., Dilsiz, N., & Borazan, E. (2019). Novel miRNAs as potential biomarkers in stage II colon cancer: microarray analysis.

- Molecular Biology Reports*, (0123456789). <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04868-7>
33. Wang, X., Gao, J., Zhou, B., Xie, J., Zhou, G., & Chen, Y. (2019). Identification of prognostic markers for hepatocellular carcinoma based on miRNA expression profiles. *Life Sciences*, 232(June). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116596>
  34. Chen, S. L., Ma, M., Yan, L., Xiong, S. H., Liu, Z., Li, S., ... Zuo, C. H. (2019). [Clinical significance of exosomal miR-1231 in pancreatic cancer]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi [Chinese Journal of Oncology]*, 41(1), 46–49. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2019.01.008>
  35. Fomicheva, K. A., Osip'yants, A. I., Knyazev, E. N., Samatov, T. R., & Shkurnikov, M. Y. (2017). Detection of potential metastatic prostate cancer circulating biomarkers by comparison of miRNA profiles in DU145 cells and culture medium. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 162(6), 792–796. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3715-0>
  36. Baños-Lara, M. D. R., Zabaleta, J., Garai, J., Baddoo, M., & Guerrero-Plata, A. (2018). Comparative analysis of miRNA profile in human dendritic cells infected with respiratory syncytial virus and human metapneumovirus. *BMC Research Notes*, 11(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3541-0>
  37. Purnamasari, R., Winarni, D., Permanasari, A. A., Agustina, E., Hayaza, S., & Darmanto, W. (2019). Anticancer Activity of Methanol Extract of Ficus carica Leaves and Fruits Against Proliferation, Apoptosis, and Necrosis in Huh7it Cells . *Cancer Informatics*, 18, 117693511984257. <https://doi.org/10.1177/1176935119842576>
  38. Sharma, A., Kaur, M., Katnoria, J. K., & Nagpal, A. K. (2017). Polyphenols in Food: Cancer Prevention and Apoptosis Induction. *Current Medicinal Chemistry*, 25(36), 4740–4757. <https://doi.org/10.2174/0929867324666171006144208>
  39. Weisburger, J. H., Rivenson, A., Garr, K., & Aliaga, C. (1997). Tea, or tea and milk, inhibit mammary gland and colon carcinogenesis in rats. *Cancer Letters*, 114(1–2), 323–327. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(97\)04693-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(97)04693-4)

40. JM, L., Z-Y, W., G-Y, Y., W, D., & CS, Y. (1998). Inhibition of spontaneous formation of lung tumors and rhabdomyosarcomas in A/J mice by black and green tea. *Carcinogenesis*, 19(3), 501
41. Clinton, S. K., Boileau, T. M.-W., & Erdman, J. W. (2004). RESPONSE: Re: Prostate Carcinogenesis in N-methyl-N-nitrosourea (NMU)-Testosterone-Treated Rats Fed Tomato Powder, Lycopene, or Energy-Restricted Diets. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 96(7), 554–555. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh090>
42. Kampa, M., Alexaki, V.-I., Notas, G., Nifli, A.-P., Nistikaki, A., Hatzoglou, A., ... Castanas, E. (2004). Imported from <https://www.cancertreatmentsresearch.com/cancer-treatments/>. *Breast Cancer Research*, 6(2), R63. <https://doi.org/10.1186/bcr752>
43. Halder, B., Das Gupta, S., & Gomes, A. (2012). Black tea polyphenols induce human leukemic cell cycle arrest by inhibiting Akt signaling: Possible involvement of Hsp90, Wnt / $\beta$ -catenin signaling and FOXO1. *FEBS Journal*, 279(16), 2876–2891. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08668.x>
44. Wang, J., Pan, Y., Hu, J., Ma, Q., Xu, Y., Zhang, Y., ... Liu, Y. (2018). Tea polyphenols induce S phase arrest and apoptosis in gallbladder cancer cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 51(4), 1–8. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20176891>
45. Curti, V., Di Lorenzo, A., Dacrema, M., Xiao, J., Nabavi, S. M., & Daglia, M. (2017). In vitro polyphenol effects on apoptosis: An update of literature data. *Seminars in Cancer Biology*, 46, 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.08.005>
46. Gupta, K., Thakur, V. S., Bhaskaran, N., Nawab, A., Babcook, M. A., Jackson, M. W., & Gupta, S. (2012). Green Tea Polyphenols Induce p53-Dependent and p53-Independent Apoptosis in Prostate Cancer Cells through Two Distinct Mechanisms. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052572>
47. Yang, Y. M., Yang, Y., Dai, W. W., Li, X. M., Ma, J. Q., & Tang, L. P. (2016). Genistein-induced apoptosis is mediated by Endoplasmic reticulum stress in

cervical cancer cells. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 20(15), 3292–3296.

48. Liu, B., & Sun, X. (2019). miR-25 promotes invasion of human non-small cell lung cancer via CDH1. *Bioengineered*, 0(0), 21655979.2019.1632668. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1632668>

## IX. ANEXOS

### Anexo I



**D. José María Montiel Company**, Profesor Contratado Doctor Interino del departamento de Estomatología, y Secretario del Comité Ético de Investigación en Humanos de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València,

#### CERTIFICA:

Que el Comité Ético de Investigación en Humanos, en la reunión celebrada el día 4 de diciembre de 2017, una vez estudiado el proyecto de investigación titulado: *"Efecto de la nutrición sobre el Sistema inmunológico"*, número de procedimiento H1511260556759, cuyo responsable es D. Juan Gambini Buchón, ha acordado informar favorablemente el mismo dado que se respetan los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y cumple los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Valencia, a catorce de diciembre de dos mil diecisiete.



A handwritten signature in blue ink, likely belonging to D. Juan Gambini Buchón, the responsible person mentioned in the text.

Anexo II



Total Exosome Isolation (from cell culture media)

Publication No. MAN0006949

Rev. Date: 28 June 2012

Catalog Number: 4478359

Store at 2°C to 8°C

Product Description

Exosomes are small vesicles (30–120 nm) containing RNA and protein that are secreted by various types of cells in culture, and found in abundance in body fluids including blood, saliva, urine, and breast milk. Exosomes are thought to function as intercellular messengers, delivering their cargo of effector or signaling macromolecules between specific cells, however, their formation, the makeup of the cargo, and biological pathways in which they are involved remain incompletely understood.

The biological study of exosome function and trafficking requires the isolation of intact exosomes, but the current methods used are tedious, non-specific, and difficult. The Total Exosome Isolation (from cell culture media) reagent provides a simple and reliable method of concentrating intact exosomes from cell culture media samples. By tying up water molecules, the Total Exosome Isolation (from cell culture media) reagent forces less-soluble components (i.e. exosomes) out of solution, allowing them to be collected after brief, low-speed centrifugation.

Product Contents

Total Exosome Isolation (from cell culture media) reagent contains reagents sufficient for processing 100 mL of cell culture media.

Components	Amount	Storage
Total Exosome Isolation (from cell culture media)	50 mL	2°C to 8°C

General Guidelines

- To ensure that isolated exosomes originate from your cells of interest, culture the cells with exosome depleted fetal bovine serum (FBS), because normal FBS contains extremely high levels of exosomes that will contaminate the cell derived exosomes.  
If you cannot obtain exosome depleted FBS, certain cell lines can be grown for up to 12 hours in media without FBS.
- If you are isolating intact exosomes from serum, use the Total Exosome Isolation (from serum) reagent.
- After exosomes are isolated, total RNA and protein can be purified using the Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit.
- To isolate exosomal proteins for immunoprecipitation, use Exosome Immunoprecipitation (Protein A) or Exosome Immunoprecipitation (Protein G).

Prepare Sample

- Harvest cell culture media.
- Centrifuge the cell media at 2000 × g for 30 minutes to remove cells and debris.
- Transfer the supernatant containing the cell-free culture media to a new tube without disturbing the pellet.

Isolate Exosomes

- Transfer the required volume of cell-free culture media to a new tube and add 0.5 volumes of the Total Exosome Isolation (from cell culture media) reagent.

Culture Media	Reagent
1 mL	500 µL
10 mL	5 mL

- Mix the culture media/reagent mixture well by vortexing, or pipetting up and down until there is a homogenous solution.
- Incubate samples at 2°C to 8°C overnight.
- After incubation, centrifuge the samples at 10,000 × g for 1 hour at 2°C to 8°C.
- Aspirate and discard the supernatant. Exosomes are contained in the pellet at the bottom of the tube (not visible in most cases).
- Resuspend the pellet in a convenient volume of 1X PBS or similar buffer.

Starting Cell Culture Media Volume	Resuspension Volume
1 mL	25–100 µL
10 mL	100 µL–1 mL

- Once the pellet is resuspended, the exosomes are ready for downstream analysis or further purification through affinity methods.  
Keep isolated exosomes at 2°C to 8°C for up to 1 week, or at ≤20°C for long-term storage.

Product Use: For research use only. Not for human or animal therapeutic or diagnostic use.



### Related Products

Product	Cat. No.
Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit	4478545
Total Exosome Isolation (from serum)	4478360
Exosome Immunoprecipitation (Protein A)	10610D
Exosome Immunoprecipitation (Protein G )	10612D

### Limited Use Label License: Research Use Only

The purchase of this product conveys to the purchaser the limited, non-transferable right to use the purchased amount of the product only to perform internal research for the sole benefit of the purchaser. No right to resell this product or any of its components is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for internal research purposes only and is not for use in commercial applications of any kind, including, without limitation, quality control and commercial services such as reporting the results of purchaser's activities for a fee or other form of consideration. For information on obtaining additional rights, please contact [outlicensing@lifetech.com](mailto:outlicensing@lifetech.com) or Out Licensing, Life Technologies, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008.

### Limited Product Warranty

Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) warrant their products as set forth in the Life Technologies' General Terms and Conditions of Sale found on Life Technologies' website at [www.lifetechnologies.com/termsandconditions](http://www.lifetechnologies.com/termsandconditions). If you have any questions, please contact Life Technologies at [www.lifetechnologies.com/support](http://www.lifetechnologies.com/support).

LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION AND/OR ITS AFFILIATE(S) DISCLAIM ALL WARRANTIES WITH RESPECT TO THIS DOCUMENT, EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THOSE OF MERCHANTABILITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, OR NON-INFRINGEMENT. TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, IN NO EVENT SHALL LIFE TECHNOLOGIES AND/OR ITS AFFILIATE(S) BE LIABLE, WHETHER IN CONTRACT, TORT, WARRANTY, OR UNDER ANY STATUTE OR ON ANY OTHER BASIS FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THE USE THEREOF.

©2012 Life Technologies Corporation. All rights reserved. The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies Corporation or their respective owners.

For support visit [www.lifetechnologies.com/support](http://www.lifetechnologies.com/support) or email [techsupport@lifetech.com](mailto:techsupport@lifetech.com)

[www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com)



## Anexo III



Address: Avda. Universidad de Coimbra, s/n  
Cancer Research Center (C.I.C.)  
Campus Miguel de Unamuno  
37007 Salamanca (Spain)  
Tel. / Fax: (+34) 923 294 827  
E-mail: info@immunostep.com  
www.immunostep.com

### PI/RNASE Solution

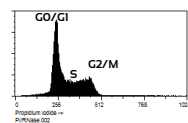
Reference	Size
PI/RNASE	200 test

#### PRODUCT DESCRIPTION

Propidium iodide (PI) is the most commonly used dye for DNA and cell cycle analysis by flow cytometry. The PI binds to DNA by intercalating into the double stranded macromolecule. PI also binds to RNA, and is necessary to remove the RNA with a nucleases treatment (RNase) for optimal DNA resolution.

The quantification of the content DNA permits us to know the distribution of a cell population along the different phases of the cell cycle. In the analyses of a cell population by flow cytometry using dyes for DNA, the quantity of linked dye is proportional to the quantity of DNA.<sup>(1)</sup>

The analyses of cell cycle by flow cytometry are represented in fluorescence intensity histograms for it probes specific of DNA. The cells of mammalian are characterized for having three populations or definite regions, cells in G2 and M phases of the cell cycle that have double DNA content of those in G0 and G1 phases, and a region correspond to cells in phase S.



The excitation of PI at 488 nm facilitates its use on all cytometers with argon ion lasers (most common flow cytometers).

**Recommended usage:** Immunostep's PI/RNase, is intended for analyses of cell cycle by flow cytometry.

**Presentation:** liquid

**Storage Instruction:** store PI/RNase between 2°C and 8°C. Do not use after expiration date stamped on vial.

**Reagent provided:** 200 test (500µl/test) of PI/RNase in 100 ml of PBS with 0,09% NaN<sub>3</sub> (sodium azide), pH 7.2.

**Recommendation and warnings:** This product contains sodium azide. In acid conditions, it is transformed into hydrazoic acid, a highly toxic compound. Azide compounds must be diluted in running water before being discarded. These conditions are recommended so as to avoid deposits in plumbing, where explosive conditions could develop. Before acquiring samples, adjust the discriminator (threshold) to minimize debris.

#### Staining cells protocol with PI/RNASE Solution. Flow Cytometry

1. Harvest the cells corresponding to  $2 \times 10^5$  to  $1 \times 10^6$ . Centrifuge the cells for 5 minutes at 300 xg, and remove the supernatant. Resuspend the pellet in the residual liquid.
2. Fix cell, add 200 µl of 70% ethanol by pipeting in the cell suspension slowly while vortexing.
3. Leave the cells in ethanol at 4°C for 30 min.
4. Wash cells once in 2 ml PBS + 2% BSA. Centrifuge the cells for 5 minutes at 300 xg, and remove the supernatant. Resuspend the pellet in the residual liquid.
5. Add 0.5 ml of propidium iodide solution (PI/RNase) to cell pellet and mix well. Incubate 15 minutes at room temperature before to analysis.
6. After incubation period, analyze by flow cytometry. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the product is suspected, contact our Technical Services. ([tech@immunostep.com](mailto:tech@immunostep.com))

Store samples at 4°C and protect from the light until analysed by flow cytometry.  
Cells may be stored in 70% ethanol at -20 °C for several weeks prior to staining and flow cytometric analysis.

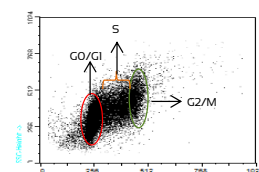


Figure 1. Jurkat cells (T-cell leukemia, human). DNA content analysis histogram (Top panel). Cell cycle analysis (Bottom panel).

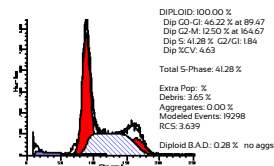


Figure 2. Jurkat cells (T-cell leukemia, human). Cells were analyzed using Modfit DNA analysis software.

Revision N° 3

Emission date: 10/03/2017

HT-PIRNASE-3



**Address:** Avda. Universidad de Coimbra, s/n  
Cancer Research Center (C.I.C.)  
Campus Miguel de Unamuno  
37007 Salamanca (Spain)  
**Tel. / Fax:** (+34) 923 294 827  
**E-mail:** info@immunostep.com  
www.immunostep.com

Please, refer to <http://immunostep.com/content/31-support> for technical information.

#### WARRANTY

Warranted only to conform to the quantity and contents stated on the label or in the product labelling at the time of delivery to the customer. Immunostep disclaims hereby other warranties. Immunostep's sole liability is limited to either the replacement of the products or refund of the purchase price.

#### REFERENCES

1. Crowley LC, Chojnowski G, Waterhouse NJ. Measuring the DNA Content of Cells in Apoptosis and at Different Cell-Cycle Stages by Propidium Iodide Staining and Flow Cytometry. Cold Spring Harb Protoc Oct 03;2016(10):pdb prot087247.

#### MANUFACTURED BY



**Immunostep S.L.**  
Avda. Universidad de Coimbra, s/n  
Cancer Research Center (CIC)  
Campus Miguel de Unamuno  
37007 Salamanca (Spain)  
Tel. (+34) 923 294 827  
www.immunostep.com

# ANNEXIN V FITC

## Apoptosis detection kit

Fluorochrome	Reference	Test
FITC	ANXVKF-100T	100 test



### INTRODUCTION.

Apoptosis is a regulated process of cell death that occurs during embryonic development as well as maintenance of tissue homeostasis. Inappropriately regulated apoptosis is implicated in different disease states, such as neurodegeneration disease and cancer. The apoptosis program is characterized by morphologic features, including loss of plasma membrane asymmetry and attachment, condensation of the cytoplasm and nucleus, and compaction and fragmentation of the nuclear chromatin. In normal viable cells, phospholipids are asymmetrically distributed between inner and outer leaflets of the plasma membrane with phosphatidylcholine and sphingomyelin exposed on the external leaflet of the lipid bilayer, and phosphatidylserine predominantly observed on the inner surface facing the cytosol.

Exposure of PS on the external surface of the cell membrane has been reported in apoptotic cells, this occurs in the early phases of apoptotic cell death during which the cell membrane remains intact. In leukocyte apoptosis, PS on the outer surface of the cell marks the cell for recognition and phagocytosis by macrophages. The human vascular anticoagulant, annexin V, is a 35-36 kDa  $Ca^{2+}$  dependent phospholipids binding protein that has a high affinity for PS, and shows minimal binding to phosphatidylcholine and sphingomyelin. Changes in PS asymmetry, which is analyzed by measuring annexin V binding to the cell membrane, were detected before morphological changes associated with apoptosis have occurred and before membrane integrity has been lost. Annexin V labelled with FITC (green fluorescence) can identify and quantitate apoptotic cells on a single-cell basis by flow cytometry. Staining cells simultaneously with Annexin V -FITC and the non-vital dye propidium iodide (red fluorescence) allows (bivariate analysis) the discrimination of intact cells (Annexin V-FITC negative, PI negative), early apoptotic (Annexin V-FITC positive, PI negative) and late apoptotic or necrotic cells (Annexin V-FITC positive, PI positive).

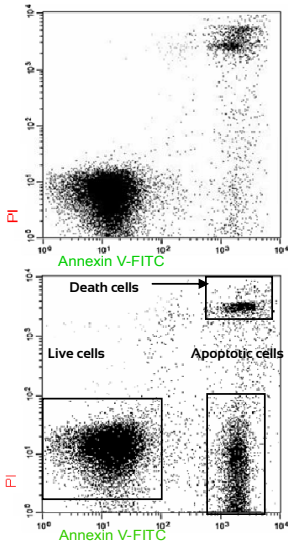
### MATERIALS

Annexin V-FITC, 100 tests, recommended for use in flow cytometry. The conjugate is provided in liquid form in buffer containing Antibody Stabilizer, PBS, PH 7.4.

Propidium Iodide Staining Solution. 100 test in PBS (pH 7.4)

Annexin V Binding Buffer, 10 X, 50 ml. 0.1M HEPES/NaOH (pH 7.4) 1.4 M NaCl, 25 mM  $CaCl_2$ .

Reference	Excitation laser line (nm)	Max. Excitation peak (nm)	Max. Emission peak (nm)	Recommended Band Pass Filter (nm)
ANXVF-	488 Blue Laser	495	519	530/30
PI	488,532,561 Blue Laser	351	617	585/42



**Figure 1.** Jurkat cells (T-cell leukemia, human) treated with 6 µM camptothecin for four hours (bottom panel) or untreated (top panel).

### 1. RECOMMENDATIONS AND WARNINGS

- The reagents contain sodium azide. In acid conditions, it is transformed into hydrazoic acid, a highly toxic compound. Azide compounds must be diluted in running water before being discarded. These conditions are recommended so as to avoid deposits in plumbing, where explosive conditions could develop. The safety data sheet (SDS) is available online at [www.immunostep.com](http://www.immunostep.com)
- Avoid microbial contamination of the reagent.
- Protect from light. Use dim light during handling, incubation with cells and prior to analysis.
- Never mouth pipette.
- In the case of contact with skin, wash in plenty of water.
- The samples should be handled in the same way as those capable of transmitting infection. Appropriate handling procedures should be guaranteed.
- Do not use after the expiry date indicated on the vial.
- Deviations from the recommended procedure could invalidate the analysis results.
- FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE.
- For professional use only.
- Before acquiring the samples, it is necessary to make sure that the flow cytometer is calibrated and compensated.

## STORAGE

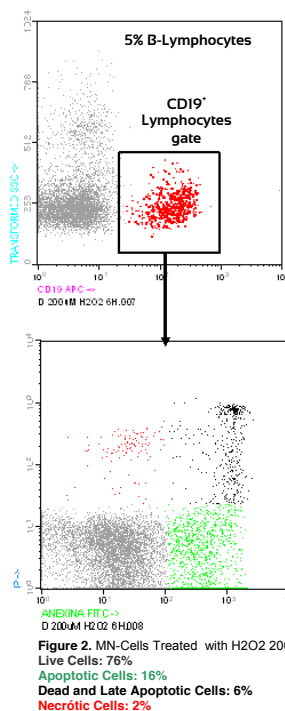
Store in the dark at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the product is suspected, contact our Technical Services. [tech@immunostep.com](mailto:tech@immunostep.com)  
DO NOT FREEZE. Protect the fluorescent conjugates from the light.

## STAINING CELLS PROTOCOL WITH ANNEXINA-FITC FLOW CYTOMETRY

1. Prepare Annexin V Binding Buffer: 10 mM HEPES/NaOH (pH 7.4) 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>.
2. Induce apoptosis in cells using the desired method. A negative control should be prepared by untreated cells, that is used to define the basal level of apoptotic and necrotic or dead cells.
3. Harvest the cells after the apoptosis induction and wash in temperate phosphate-buffered saline (PBS).
4. Wash cells twice with temperate PBS and resuspend cells in 1 X Annexin-binding buffer at a concentration 1 x 10<sup>6</sup> cells/ml.
5. Add 5 µl of the Annexin V-FITC and 5 µl of PI, to each 100 µl of cell suspension (up 1x10<sup>5</sup> cells).
6. Incubate the cells at room temperature for 15 minutes in the dark.
7. After incubation period, add 400 µl of 1X Annexin-binding buffer. Analyze by flow cytometry within one hour.

## EXAMPLE PROTOCOL FOR ANNEXIN V EXPRESSION IN APOPTOTIC PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

1. MN-Cells (Mononuclear cells) have been separated by Ficoll, from peripheral blood.
2. Apoptosis induction in leukocytes incubating 6 hours with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200µM.
3. 1 million cells have been harvested after the apoptosis induction. The supernatant was removed by centrifugation.
4. Added 100µL of PBS and 20µL of the CD19 APC(Ref. CD19APCA3-B1 - IMMUNOSTEP) and incubated 15 min.
5. The cells was washed once with temperate PBS and the cells was resuspend in 1 X Annexin-binding buffer 0,5 ml.
6. Added 5 µl of the Annexin V-FITC and 5 µl of PI, to each 100 µl of cell suspension (up 1x10<sup>5</sup> cells).
7. The cells was incubated for 15 minutes at room temperature, and have been analyzed by flow cytometry



## CONTROLS TO SET UP FLOW CYTOMETER COMPENSATION AND QUADRANTS.

1. Unstained cells.
2. Cells stained with Annexin V- FITC alone (no PI).
3. Cells stained with PI alone (no Annexin V- FITC).

## PERFORMANCE TEST

Evaluation of the functioning with different inducing drugs of the apoptosis and in different cellular types:

### A. Assay n°1

**Cellular type:** HL-60 (Human promyelocytic leukemia cells).

### Drugs:

- Citarabina (AraC)
- Camptotecina.
- Etoposido (VP-19)
- Metotrex



TRIzol® Reagent

Catalog Numbers	Quantity	Store at 2°C to 25°C
15596-026	100 mL	
15596-018	200 mL	

Description

TRIzol® Reagent is a ready-to-use reagent, designed to isolate high quality total RNA (as well as DNA and proteins) from cell and tissue samples of human, animal, plant, yeast, or bacterial origin, within one hour. TRIzol® Reagent is a monophasic solution of phenol, guanidine isothiocyanate, and other proprietary components which facilitate the isolation of a variety of RNA species of large or small molecular size. TRIzol® Reagent maintains the integrity of the RNA due to highly effective inhibition of RNase activity while disrupting cells and dissolving cell components during sample homogenization. TRIzol® Reagent allows for simultaneous processing of a large number of samples, and is an improvement to the single-step RNA isolation method developed by Chomczynski and Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987).

TRIzol® Reagent allows the user to perform sequential precipitation of RNA, DNA, and proteins from a single sample (Chomczynski, 1993). After homogenizing the sample with TRIzol® Reagent, chloroform is added, and the homogenate is allowed to separate into a clear upper aqueous layer (containing RNA), an interphase, and a red lower organic layer (containing the DNA and proteins). RNA is precipitated from the aqueous layer with isopropanol. DNA is precipitated from the interphase/organic layer with ethanol. Protein is precipitated from the phenol-ethanol supernatant by isopropanol precipitation. The precipitated RNA, DNA, or protein is washed to remove impurities, and then resuspended for use in downstream applications.

- Isolated RNA can be used in RT-PCR, Northern Blot analysis, Dot Blot hybridization, poly(A)+ selection, *in vitro* translation, RNase protection assay, and molecular cloning.
- Isolated DNA can be used in PCR, Restriction Enzyme digestion, and Southern Blots.
- Isolated protein can be used for Western Blots, recovery of some enzymatic activity, and some immunoprecipitation.

Caution

TRIzol® Reagent contains phenol (toxic and corrosive) and guanidine isothiocyanate (an irritant), and may be a health hazard if not handled properly. Always work with TRIzol® Reagent in a fume hood, and always wear a lab coat, gloves and safety glasses. Contact your Environmental Health and Safety (EH&S) department for proper work and disposal guidelines. Avoid direct contact with TRIzol® Reagent, because **contact to skin, eyes, or respiratory tract may cause chemical burns** to the exposed area. **If contact to skin or eyes occurs, immediately** wash the exposed area with copious amounts of water for 15 minutes and seek medical attention if necessary. If you inhale vapors, move to fresh air and seek medical attention if necessary. For more information, refer to the TRIzol® Reagent SDS (Safety Data Sheet), available from our web site at [www.lifetechnologies.com/support](http://www.lifetechnologies.com/support).

Contents and Storage

TRIzol® Reagent is supplied in 100 mL (Cat. no. 15596-026) or 200 mL (Cat. no. 15596-018) volumes, and shipped at room temperature. Upon receipt, store TRIzol® Reagent at room temperature. TRIzol® Reagent is stable for 12 months when properly stored.

Intended Use

For research use only. Not intended for human or animal diagnostic or therapeutic uses.

Materials Needed

The following additional materials are needed, but not supplied for the isolation of RNA, DNA or proteins.

RNA Isolation	DNA Isolation	Protein Isolation
<ul style="list-style-type: none"><li>• Chloroform</li><li>• Isopropyl alcohol</li><li>• 75% ethanol (in DEPC-treated water)</li><li>• RNase-free water or 0.5% SDS</li><li>• Centrifuge and rotor capable of reaching up to 12,000 × g</li><li>• Polypropylene microcentrifuge tubes</li><li>• Water bath or heat block (55–60°C)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Chloroform</li><li>• 100% ethanol</li><li>• 75% ethanol</li><li>• 0.1 M sodium citrate in 10% ethanol</li><li>• 8 mM NaOH</li><li>• Centrifuge and rotor capable of reaching up to 12,000 × g</li><li>• Polypropylene microcentrifuge tubes</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Chloroform</li><li>• Isopropyl alcohol</li><li>• 100% ethanol</li><li>• 0.3 M Guanidine hydrochloride in 95% ethanol</li><li>• 1% SDS</li><li>• Centrifuge and rotor capable of reaching up to 12,000 × g</li><li>• Polypropylene microcentrifuge tubes</li></ul>

## Preparing Samples

### Homogenizing samples

- Determine your sample type, and perform homogenization at room temperature according to the table below. The sample volume should not exceed 10% of the volume of TRIzol® Reagent used for homogenization. Be sure to use the indicated amount of TRIzol® Reagent, because an insufficient volume can result in DNA contamination of isolated RNA.

Sample Type	Action
Tissues	<ol style="list-style-type: none"> <li>Add 1 mL TRIzol® Reagent per 50–100 mg of tissue sample.</li> <li>Homogenize sample using a glass-Teflon® or power homogenizer. <b>Note:</b> Process or freeze tissue samples <i>immediately</i> upon collection.</li> </ol>
Adherent Cells (Monolayer)	<ol style="list-style-type: none"> <li>Remove growth media from culture dish.</li> <li>Add 1 mL TRIzol® Reagent directly to the cells in the culture dish per 10 cm² of culture dish surface area. <b>Note:</b> Add 1 mL TRIzol® Reagent for a 35 mm dish, 3 mL for a 60 mm dish, and 8 mL for a 100 mm dish.</li> <li>Lyse the cells directly in the culture dish by pipetting the cells up and down several times.</li> </ol>
Suspension Cells	<ol style="list-style-type: none"> <li>Harvest cells by centrifugation and remove media.</li> <li>Add 0.75 mL of TRIzol® Reagent per 0.25 mL of sample (5–10 × 10⁵ cells from animal, plant or yeast origin, or 1 × 10⁷ cells of bacterial origin). <b>Note:</b> Do not wash cells before addition of TRIzol® Reagent to avoid increased chance of mRNA degradation.</li> <li>Lyse cells in sample by pipetting up and down several times. Disruption of some yeast and bacterial cells may require the use of a homogenizer.</li> </ol>

- (Optional) When preparing samples with high content of fat, proteins, polysaccharides, or extracellular material (e.g., muscle, fat tissue, or tuberous plant material), an additional isolation step may be required to remove insoluble material from the samples.

**Note:** Do not perform this additional isolation step if you are performing subsequent DNA isolation on your sample.

Sample Type	Notes
Tissue or cells with high content of fat, protein, polysaccharide, or extracellular material	<ol style="list-style-type: none"> <li>Following homogenization, centrifuge your sample at 12,000 × g for 10 minutes at 4°C. <b>Note:</b> The resulting pellet contains ECM, polysaccharides, and high molecular weight DNA, while the supernatant contains the RNA. In high fat content samples, a layer of fat collects above the supernatant.</li> <li>Remove and discard the fatty layer.</li> <li>Transfer the cleared supernatant to a new tube.</li> </ol>

- Proceed to **Phase separation**, or store the homogenized sample. Homogenized samples can be stored at room temperature for several hours, or at –60 to –70°C for at least one month.

### Phase separation

- Incubate the homogenized sample (see **Homogenizing samples**) for 5 minutes at room temperature to permit complete dissociation of the nucleoprotein complex.
- Add 0.2 mL of chloroform per 1 mL of TRIzol® Reagent used for homogenization. Cap the tube securely.
- Shake tube vigorously by hand for 15 seconds.
- Incubate for 2–3 minutes at room temperature.
- Centrifuge the sample at 12,000 × g for 15 minutes at 4°C.  
**Note:** The mixture separates into a lower red phenol-chloroform phase, an interphase, and a colorless upper aqueous phase. *RNA remains exclusively in the aqueous phase.* The upper aqueous phase is ~50% of the total volume.
- Remove the aqueous phase of the sample by angling the tube at 45° and pipetting the solution out. Avoid drawing any of the interphase or organic layer into the pipette when removing the aqueous phase.
- Place the aqueous phase into a **new** tube and proceed to the **RNA Isolation Procedure**.
- Save the interphase and organic phenol-chloroform phase if isolation of DNA or protein is desired. See **DNA Isolation Procedure** and **Protein Isolation Procedure** for details. The organic phase can be stored at 4°C overnight.

### RNA Isolation Procedure

Always use the appropriate precautions to avoid RNase contamination when preparing and handling RNA.

#### RNA precipitation

- (Optional) When precipitating RNA from small sample quantities (<10⁵ cells or <10 mg tissue), add 5–10 µg of RNase-free glycogen as a carrier to the aqueous phase.  
**Note:** Glycogen is co-precipitated with the RNA, but does not inhibit first-strand synthesis at concentrations ≤4 mg/mL, and does not inhibit PCR.
- Add 0.5 mL of 100% isopropanol to the aqueous phase, per 1 mL of TRIzol® Reagent used for homogenization.
- Incubate at room temperature for 10 minutes.
- Centrifuge at 12,000 × g for 10 minutes at 4°C.  
**Note:** The RNA is often invisible prior to centrifugation, and forms a gel-like pellet on the side and bottom of the tube.
- Proceed to **RNA wash**.

#### RNA wash

- Remove the supernatant from the tube, leaving only the RNA pellet.
- Wash the pellet, with 1 mL of 75% ethanol per 1 mL of TRIzol® Reagent used in the initial homogenization.  
**Note:** The RNA can be stored in 75% ethanol at least 1 year at –20°C, or at least 1 week at 4°C.
- Vortex the sample briefly, then centrifuge the tube at 7500 × g for 5 minutes at 4°C. Discard the wash.
- Vacuum or air dry the RNA pellet for 5–10 minutes. Do not dry the pellet by vacuum centrifuge.  
**Note:** Do not allow the RNA to dry completely, because the pellet can lose solubility. Partially dissolved RNA samples have an A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> ratio <1.6.
- Proceed to **RNA resuspension**.

### RNA resuspension

1. Resuspend the RNA pellet in RNase-free water or 0.5% SDS solution (20–50  $\mu$ L) by passing the solution up and down several times through a pipette tip.  
**Note:** Do not dissolve the RNA in 0.5% SDS if it is to be used in subsequent enzymatic reactions.
2. Incubate in a water bath or heat block set at 55–60°C for 10–15 minutes.
3. Proceed to downstream application, or store at –70°C.

### DNA Isolation Procedure

DNA is isolated from the interphase and phenol-chloroform layer saved from the **Phase separation** step.

#### DNA precipitation

1. Remove any remaining aqueous phase overlying the interphase. This is critical for the quality of the isolated DNA.
2. Add 0.3 mL of 100% ethanol per of 1 mL TRIzol® Reagent used for the initial homogenization.
3. Cap the tube and invert the sample several times to mix.
4. Incubate samples for 2–3 minutes at room temperature.
5. Centrifuge the tube at 2000  $\times$  g for 5 minutes at 4°C to pellet the DNA.
6. Remove the phenol-ethanol supernatant and save it in a new tube if protein isolation is desired. The supernatant can be stored at –70°C for several months.
7. Proceed with the **DNA wash** step using the DNA pellet.

#### DNA wash

1. Wash the DNA pellet with 1 mL of sodium citrate/ ethanol solution (0.1 M sodium citrate in 10% ethanol, pH 8.5) per 1 mL of TRIzol® Reagent used for the initial homogenization.
2. Incubate for 30 minutes at room temperature. Mix occasionally by gentle inversion.  
**Note:** The DNA can be stored in sodium citrate/ethanol solution at least 2 hours.
3. Centrifuge at 2000  $\times$  g for 5 minutes at 4°C. Remove and discard supernatant.
4. Repeat wash (steps 1–3), once.  
**Note:** Repeat wash twice for large DNA pellets (>200  $\mu$ g).
5. Add 1.5–2 mL 75% ethanol per 1 mL of TRIzol® Reagent used for the initial homogenization.  
**Note:** DNA samples may be stored in 75% ethanol at 4°C for several months.
6. Incubate for 10–20 minutes at room temperature. Mix the tube occasionally by gentle inversion.
7. Centrifuge at 2000  $\times$  g for 5 minutes at 4°C. Remove and discard supernatant.
8. Air or vacuum dry the DNA pellet for 5–10 minutes. Do not allow the pellet to dry out. Do not dry the pellet by vacuum centrifuge.
9. Proceed to the **DNA resuspension** step.

### DNA resuspension

Resuspend the DNA in 8mM NaOH at a concentration of 0.2–0.3  $\mu$ g/ $\mu$ L.

1. Add 0.3–0.6 mL of 8mM NaOH per 50–70 mg of tissue, or per  $1 \times 10^7$  cells.  
**Note:** Resuspending the DNA is a mild base is highly recommended because isolated DNA does not resuspend well in water or Tris buffer.
2. Remove any insoluble material by centrifuging the sample at 12,000  $\times$  g for 10 minutes at 4°C.
3. Transfer the supernatant containing the DNA to a **new** tube. Adjust pH as needed with HEPES and proceed to downstream application of choice. The DNA can be stored overnight at 4°C, but for long-term storage adjust to pH 7–8 with HEPES, and add 1 mM EDTA. Store at 4°C or –20°C.

### Determining Yield of RNA and DNA

Use absorbance of RNA and DNA at 260 nm and 280 nm to determine concentration.

Sample	Procedure
RNA	1. Dilute sample in RNase-free water, and measure absorbance at 260 nm and 280 nm. 2. Use the formula $A_{260} \times \text{dilution} \times 40 = \mu\text{g RNA/mL}$ to determine concentration.
DNA	1. Dilute sample in water or buffer (pH >7.5), and measure absorbance at 260 nm and 280 nm. 2. Use the formula $A_{260} \times \text{dilution} \times 50 = \mu\text{g DNA/mL}$ to determine concentration.

### Expected yields

The table below presents typical yields of RNA ( $A_{260}/280$  of >1.8) and DNA ( $A_{260}/280$  of 1.6–1.8) from various starting materials.

Starting Material	Quantity	RNA	DNA
Epithelial Cells	$1 \times 10^6$ cells	8–15 $\mu$ g	—
New Tobacco Leaf	—	73 $\mu$ g	—
Fibroblasts	$1 \times 10^6$ cells	5–7 $\mu$ g	5–7 $\mu$ g
Cultured cells, mammal	$1 \times 10^6$	—	5–7 $\mu$ g
Skeletal muscles and brain	1 mg	1–1.5 $\mu$ g	2–3 $\mu$ g
Placenta	1 mg	1–4 $\mu$ g	2–3 $\mu$ g
Liver	1 mg	6–10 $\mu$ g	3–4 $\mu$ g
Kidney	—	3–4 $\mu$ g	3–4 $\mu$ g

### Protein Isolation Procedure

Proteins are isolated from the phenol-ethanol supernatant layer left over after the **DNA precipitation** step. Isolate the protein using either **Protein precipitation** OR **Protein dialysis**.

#### Protein precipitation

1. Add 1.5 mL of isopropanol to the phenol-ethanol supernatant per of 1 mL TRIzol® Reagent used for the initial homogenization.
2. Incubate samples for 10 minutes at room temperature.
3. Centrifuge at 12,000  $\times$  g for 10 minutes at 4°C to pellet the protein. Remove and discard the supernatant.
4. Proceed to the **Protein wash** step with the remaining protein pellet.



### Protein wash

1. Prepare a wash solution consisting of 0.3 M guanidine hydrochloride in 95% ethanol.
2. Wash the protein pellet with 2 mL of the wash solution per 1 mL of TRIzol<sup>®</sup> Reagent used for the initial homogenization.
3. Incubate for 20 minutes at room temperature.  
**Note:** Protein samples may be stored in 0.3 M guanidine hydrochloride-95% ethanol for at least one month at 4°C or for at least one year at -20°C.
4. Centrifuge at 7500 × g for 5 minutes at 4°C. Remove and discard the wash solution.
5. Repeat steps 2–4, two more times.
6. Add 2 mL of 100% ethanol to protein pellet after the third wash and vortex.
7. Incubate for 20 minutes at room temperature.
8. Centrifuge at 7500 × g for 5 minutes at 4°C. Remove and discard ethanol wash.
9. Air dry the protein pellet for 5–10 minutes. Do not allow the pellet to dry out.
10. Proceed to the **Protein resuspension** step.

### Protein resuspension

1. Add 1% SDS to the protein pellet (200 µL) and pipet up and down until the protein is resuspended.  
**Note:** To completely dissolve the protein pellet, you may need to incubate the sample at 50°C in a water bath or heat block.
2. Centrifuge at 10,000 × g for 10 minutes at 4°C to sediment any insoluble material.
3. Transfer the supernatant containing the protein to a new tube and proceed to downstream application of choice, or store the sample at -20°C.

### Protein resuspension, continued

Poor solubility of the pellet in SDS can occur, because the solubility of specific classes of proteins differs with different solvents. If the protein pellet is insoluble in SDS, the following alternative solvents (Hummon et. al., 2007) may be required to solubilize the pellet:

- 1% SDS and 62.5 mM sarkosyl at pH 8.0–8.8
- 9.5 M urea and 2% CHAPS, pH 9.1
- 250mM glycerol, 10mM TEA, and 4% CHAPS
- 2% diethylamine
- 10M Urea

### Protein dialysis

1. Load the phenol-ethanol supernatant into the dialysis membrane.  
**Note:** The phenol-ethanol solution can dissolve some types of dialysis membranes (e.g., cellulose ester). Test dialysis tubing with the membrane to assess compatibility before starting.
2. Dialyze the sample against 3 changes of 0.1% SDS at 4°C. Make the first change of solution after 16 hours, the second change 4 hours later (at 20 hours), and the final change 2 hours later (at 22 hours).  
**Note:** 0.1% SDS is required to resolubilize the proteins from the pellet; a lower concentration of SDS is insufficient. If desired, the SDS can be diluted after solubilization.
3. Centrifuge the dialysate at 10,000 × g for 10 minutes at 4°C. Proteins are located in the clear supernatant.
4. Transfer supernatant to a new tube and proceed to downstream application, or store the sample at -20°C.
5. (Optional) Solubilize the pellet by adding 100 µL of 1% SDS and 100 µL of 8 M urea.

### Determining Yield of Protein

Measure protein concentration by Bradford assay (SDS concentration must be <0.1%).

## Troubleshooting

Problem	Cause	Solution
Low yield of RNA, Low yield of DNA, or Low yield of protein	<ul style="list-style-type: none"><li>• Incomplete homogenization or lysis of samples</li><li>• Final RNA, DNA or protein pellet was incompletely redissolved</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Decrease the amount of starting material. Mince tissues into smaller pieces and make sure it is completely immersed in TRIzol<sup>®</sup> Reagent for optimal lysis.</li><li>• Increase the solubilization rate by pipetting the sample repeatedly, and heat the sample to 50–60°C.</li></ul>
RNA is degraded, DNA is degraded, or Protein is degraded.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Samples were not immediately processed or frozen after collection.</li><li>• Isolated RNA, DNA, or protein preparations were stored at the incorrect temperature.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Sample must be processed or frozen immediately after collection.</li><li>• Store RNA samples at -60 to -70°C. Store DNA and protein samples at -20°C.</li></ul>
RNA contamination or DNA contamination	<ul style="list-style-type: none"><li>• Interphase/organic phase pipetted up with aqueous phase.</li><li>• Incomplete removal of aqueous phase</li><li>• DNA pellet insufficiently washed with 0.1 M sodium citrate in 10% ethanol</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Do not attempt to draw off the entire aqueous layer after phase separation.</li><li>• Remove remnants of the aqueous phase prior to DNA precipitation.</li><li>• Make sure pellet is washed with 0.1 M sodium citrate in 10% ethanol.</li></ul>
Low $A_{260}/_{280}$ for RNA	<ul style="list-style-type: none"><li>• Sample was homogenized in an insufficient volume of TRIzol<sup>®</sup> Reagent</li><li>• Incomplete removal of organic phase</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Add the appropriate amount of TRIzol<sup>®</sup> Reagent for your sample type (see <b>Homogenizing samples</b>).</li><li>• Do not attempt to draw off the entire aqueous layer after phase separation.</li></ul>
Low $A_{260}/_{280}$ for DNA	Phenol was not sufficiently removed from the DNA preparation	Wash the DNA pellet one additional time in 0.1 M sodium citrate in 10% ethanol.

### References:

Chomczynski, P. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 15, 532-537  
Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159  
Hummon, A. B., Lim S. R., DiFilippantonio, M. J., Ried, T. (2007) Isolation and solubilization of proteins after TRIzol<sup>®</sup> extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *BioTechniques* 42, 467-472.

**Limited Use Label License No. 358: Research Use Only:** The purchase of this product conveys to the purchaser the limited, non-transferable right to use the purchased amount of the product only to perform internal research for the sole benefit of the purchaser. No right to resell this product or any of its components is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for internal research purposes only and is not for use in commercial services of any kind, including, without limitation, reporting the results of purchaser's activities for a fee or other form of consideration. For information on obtaining additional rights, please contact [oulicensing@lifetech.com](mailto:oulicensing@lifetech.com) or Out Licensing, Life Technologies, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008.  
©2010 Life Technologies Corporation. All rights reserved. The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies Corporation or their respective owners.  
TRIzol<sup>®</sup> is a registered trademark of Molecular Research Center, Inc.

**Anexo VI**

**Síntesis de cDNA: Retrotranscripción (RT)**

- Fundamento**

La retrotranscripción consiste en la obtención de cDNA a partir de mRNA, es decir, es el proceso inverso de la transcripción. Para ello se emplean unas DNA polimerasas llamadas transcriptasas inversas o retrotranscriptasas.

En este trabajo, dicho procedimiento se llevó a cabo utilizando el kit de Appiled Biosystems *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* y las condiciones recomendadas por el fabricante.

El kit contiene: Tampón (específico del enzima, le permite ser activa y llevar a cabo su función); dNTPs (solución de desoxinucleotidos trifosfato necesarios para la síntesis de cDNA); Cebadores al azar (puntos de anclaje que servirán a la retrotranscriptasa para iniciar la síntesis); Enzima MsRT (reconoce el RNA molde y tiene la actividad DNA polimerasa); Inhibidor de RNasas; y Agua libre de RNasas.

- Procedimiento**

1. Preparar 2X RT *Master Mix* (sobre hielo) como se indica en la tabla 3 :

<b>10X Buffer (10X)</b>	2 µL
<b>25X dNTPs Mix (100 mM)</b>	0.8 µL
<b>10X Cebadores</b>	2 µL
<b><i>MultiScibe Reverse transcriptase</i></b>	1 µL
<b>Inhibidor de RNasas</b>	1 µL
<b>Agua libre RNasa</b>	3.2 µL
<b>Volumen final por reacción</b>	10 µL

*Tabla 3: Componentes de la mix de retrotranscripción.*

2. Mezclar suavemente y dejar sobre hielo.

3. Preparar la reacción de la retrotranscripción:

- Pipetear 9  $\mu$ L de 2X RT *Master Mix* en cada pocillo que vayamos a usar de la placa de 96 pocillos.

- Añadir 1  $\mu$ L de RNA de nuestras muestras.

4. Centrifugar la placa para eliminar las posibles burbujas de aire que puedan quedar en los pocillos.

5. Llevar al termociclador, el perfil de temperaturas será:

25°C 10 min; 37°C 120 min; 85°C 5 min; 4°C  $\infty$

### **Amplificación cuantitativa del RNA (PCR) a tiempo real**

Una vez sintetizado el cDNA (mediante la RT), lo amplificamos por medio de la PCR a tiempo real (llamada también PCR cuantitativa). Este método permite amplificar de forma selectiva secuencias específicas de DNA.

El método se basa en la síntesis de una hebra complementaria de DNA, utilizando una cadena simple como molde. La PCR utiliza dos fragmentos cortos de DNA (oligonucleótidos) como cebadores de la síntesis. Estos cebadores o *primers* se unen específicamente a secuencias que flanquean la región a amplificar, uno en cada una de las cadenas del DNA.

Los requerimientos de la reacción son: deoxinucleótidos (dNTPs) que proporcionan tanto la energía como las unidades de la síntesis, una polimerasa de DNA, cebadores, el DNA molde y un tampón que contenga magnesio.

El proceso se desarrolla en tres pasos que se repiten sucesivas veces, según el gen a amplificar:

- Desnaturalización: separación de las cadenas complementarias del DNA.

- Unión o *annealing*: unión de los cebadores específicos a sus secuencias complementarias. La temperatura de unión es característica de cada pareja de cebadores.

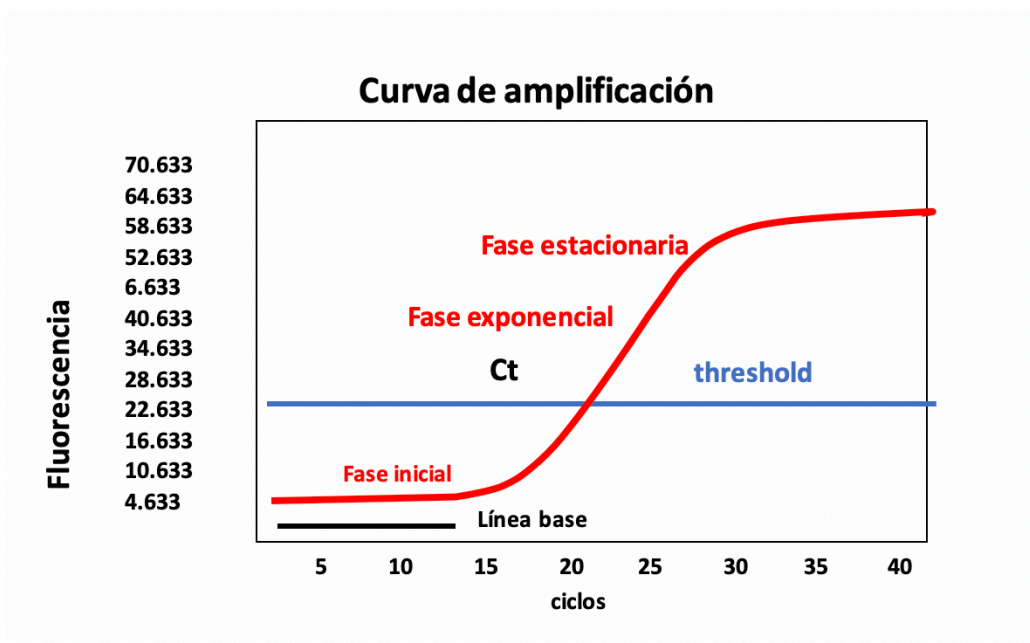
- Extensión: síntesis de la hebra complementaria a partir del respectivo cebador.

La repetición de este ciclo un determinado número de veces produce un aumento exponencial de la cantidad de la región diana del DNA, que viene dado por la expresión  $2^n$  (siendo n el número de ciclos) hasta que se llega a un punto en que disminuye la eficiencia de la enzima, y la reacción deja de ser exponencial.

- **Fundamento**

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) es una variante de la PCR estándar, que permite ver y analizar a tiempo real la amplificación del DNA molde. La sustancia fluorescente utilizada en nuestros experimentos es *SYBR Green I*, el cual se une al DNA y emite fluorescencia si las dos hebras complementarias de DNA están unidas.

En el caso de la PCR cuantitativa, el parámetro de medida de la expresión de un determinado gen no es la fluorescencia, sino el ciclo en el que la amplificación comienza a ser exponencial. Este ciclo se denomina ciclo umbral (“*threshold cycle*”, *Ct*), pues es a partir del cual la amplificación empieza a ser realmente apreciable. De este modo, los valores de ciclo umbral decrecerán linealmente conforme aumenta la cantidad de cDNA de partida, puesto que cuanto más copias de mRNA de partida del gen estudiado haya, más cDNA se obtendrá en la retrotranscripción, y antes comenzará la amplificación a ser exponencial, tal y como se ve en la figura 12.



*Figura 12: Cinética de amplificación de PCR a tiempo real (Ct).*

Así pues, realizando una curva estándar de cantidades de mRNA conocidas, este método permite la cuantificación relativa de la expresión de un gen en función de la expresión

de un gen de expresión constitutivo, es decir, que no varía según diferentes condiciones. La cuantificación absoluta supone el conocimiento del número exacto de copias de mRNA de partida empleado para la realización de la curva estándar.

### Cebadores empleados

Los cebadores que se utilizaron para la determinación de los niveles de expresión de los distintos genes fueron pedidos a ThermoFisher Scientific a partir de las secuencias génicas obtenidas en el “Genbank” de PubMed. Para cada uno de los genes a estudiar se seleccionaron los primers que muestra la tabla 4:

Gen	CEBADORES SENTIDO	CEBADORES ANTISENTIDO
<b>CDH1</b>	GGCCAGGAAATCACATCCTA	GGCAGTGTCTCTCCAAATCC
<b>IGFR1</b>	TTAAAATGGCCAGAACCTGAG	ATTATAACCAAGCCTCCCAC
<b>GAPDH</b>	TGCTGAGTATGTCTGGAGT	AGATGATGACCCGTTTGGCT

*Tabla 4: Secuencia de los cebadores utilizados en las PCR.*

- Procedimiento**

La PCR a tiempo real se realiza con el sistema de detección QuantStudio® 5 *Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems). Y usando el kit *Maxima SYBER Green/ROX qPCR Master Mix (2X)*.

La reacción se realiza según el protocolo proporcionado por el citado kit. Cada una de las muestras analizadas se ensaya por triplicado. En cada una de las placas se añade el control endógeno de cada una de las muestras por triplicado y los controles negativos: sin cDNA, sin RNA y sin la enzima Transcriptasa.

Ajustamos los volúmenes de la reacción inicialmente como se muestra en la tabla 5.

Maxima SYBER Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	5 µL
Cebador sentido	0.3 µM

Cebador antisentido	0.3 $\mu$ M
DNA molde 1 $\mu$ L	250 ng
Agua libre de RNasas	c.s.p 10 $\mu$ L

*Tabla 5: qPCR componentes de la mezcla.*

Usamos el diseño general de la placa, en el *software QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.2* Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Y programamos el termociclador con perfil térmico característico de los cebadores usados.

- **Cálculos**

Los sistemas de PCR a tiempo real detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y el *software* de análisis representa dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos.

El ciclo umbral (*threshold cycle*) ( $C_t$ ) se convierte a una cantidad relativa a través del uso de una recta estándar construida de muestras agrupadas. La fórmula logarítmica utilizada para transformar los valores de  $C_t$  tanto para los genes estudiados y el control endógeno es:

$$Expo = \frac{(C_t \text{ muestra} - \text{Intercepto})}{Pendiente}$$

Por cada muestra, la cantidad del mRNA del gen diana se normaliza con el contenido de mRNA de GAPDH (control endógeno). Para que las eficiencias sean similares, las pendientes de ambas rectas deben ser similares, puesto que la eficiencia de la reacción de amplificación viene dada por la siguiente ecuación:

$$Eficiencia = \left[ 10^{\left( -\frac{1}{pendiente} \right)} \right] - 1$$

Para una pendiente de -3.322 obtenemos una eficiencia del 100%, lo cual significa que el aumento de un ciclo de amplificación durante la fase exponencial de la reacción supone exactamente la duplicación del material amplificado. Una reacción de amplificación debe tener una eficiencia lo más cercana al 100% para estar optimizada.

## **Anexo VII**

KLRD1: Lectina de killer cell como receptor D1

PLCB3: Fosfolipasa C beta 3

ATP1B2: ATPasa Na + / K + transportadora. Subunidad beta 2

GPX6: Glutación peroxidasa 6

TG: Tiroglobulina

LAMA5: Laminina subunidad alfa 5

COL6A2: Colágeno tipo VI cadena alfa 2

SDC3: Sindecan 3

CD40LG: Ligando CD40

CADM1: Molécula de adhesión celular 1

CDH1: Cadherina 1

PYCR2: Pirrolina-5-carboxilato reductasa 2

NOS1: Óxido nítrico sintasa 1

ALDH7A1: Aldehído deshidrogenasa 7. Miembro de la familia A1.

ACADM: Cadena media de acil-CoA deshidrogenasa

GOT2: Transaminase glutámico-oxaloacética 2

MUT: Metilmalonil-CoA mutasa

PDE3A: Fosfodiesterasa 3A

GABBR2: Subunidad 2 del receptor de ácido gamma-aminobutírico tipo B

YAP1: Proteína asociada a Yes 1

YWHAE: Tirosina 3-monooxigenasa / triptófano 5-monooxigenasa proteína de activación epsilon

NF2: Neurofibromina 2

CCND2: Ciclina D2

CTNNB1: Catenina beta 1

CAMK2D: Proteína quinasa II dependiente de calcio/calmodulina delta

NFKB1: Factor nuclear kappa B subunidad 1

TRAF6: Receptor TNF asociado al factor 6

HRAS: HR como protooncogén, GTPasa

ATF4: Activador del factor de transcripción 4

MMP2: Metalopeptidasa de matriz 2  
 GNAI2: Subunidad alfa i2 de la proteína G  
 CTNND1: Catenina delta 1  
 TRIM25: Tripartite motif containing 25  
 XIAP: Inhibidor de la apoptosis ligado al X  
 TJP: Proteína de unión estrecha  
 TUBB4A: Tubulina beta 4A clase IVa  
 MAPK3: Proteína quinasa 3 activada por mitógenos  
 GJA1: Proteína alfa 1 de unión gap  
 MAPK1: Proteína quinasa 1 activada por mitógenos  
 ADCY4: Adenilato ciclasa 4  
 SMAD3: Miembro de la familia SMAD 3  
 ACVR2A: Receptor de activina A tipo 2A  
 GCNT3: Glucosaminil (N-acetil) transferasa 3, tipo mucina  
 GALNT14: Polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 14  
 PPP1R12B: Proteína fosfatasa 1. Subunidad reguladora 12B  
 MGST1: Glutación microsomal S-transferasa 1  
 GALNT1: Polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 1  
 HLA-DOA: Complejo de histocompatibilidad mayor, clase II, DO alfa  
 FAS: Receptor de muerte de la superficie celular Fas  
 IFNG: Interferón gamma  
 CFLAR: CASP8 y FADD como regulador de la apoptosis  
 OAS1: 2'-5'-oligoadenilato sintetasa 1  
 IL33: Interleukina 33  
 GNA13: Subunidad alfa 13 de la proteína G  
 BMPR1B: Receptor de proteína morfogenética ósea tipo 1B  
 FZD3: Receptor de clase frizzled 3  
 SMAD4: Miembro de la familia SMAD 4  
 NANOG: Nanog homeobox  
 FZD9: Receptor de clase frizzled 9  
 PPP3CC: Proteína fosfatasa 3 subunidad catalítica gamma



SKP: Quinasa fase S asociada a la proteína 1

NFATC4: Factor nuclear 4 de células T activadas

CALM: Calmodulina

ESR2: Receptor de estrógenos 2

CREB3L1: proteína 3 de unión a AMPc 1

BRAF: Protooncogén B-Raf, serina / treonina quinasa

TYR: Tirosinasa

UGT2A1: Locus del complejo A1 de la familia glucuronosiltransferasa UDP de 2 miembros

KYNU: Quinureninasa

CCBL2: kinurenina aminotransferasa 3

LIF: LIF interleuquina 6

IL6ST: Transductor de señal de interleucina 6

ACO1: Aconitasa 1

WBSCR17: Polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 17

GALNTS: Galactosamina (N-acetil) -6-sulfatasa

SRR: Serina racemase

AMT: Aminometiltransferasa

SDS: Serina deshidratasa

GLYCTK: Glicerato quinasa

KIR2DL4: Inmunoglobulina de killer cell como receptor, dos dominios de Ig y cola citoplásmica larga 4

PRF1: Performina 1

SYK: Tirosina quinasa asociada al bazo

GZMB: Granzima B

KIR2DL3: Inmunoglobulina de killer cell como receptor, dos dominios de Ig y cola citoplásmica larga 3

SOS1: SOS Ras / Rac factor de intercambio de nucleótidos de guanina 1

KIR3DL2: Inmunoglobulina de killer cell como receptor, dos dominios de Ig y cola citoplásmica larga 2

GSTM5: Glutación S-transferasa mu 5

NEU4: Neuraminidasa 4  
 SMAD3: Miembro de la familia SMAD 3  
 TGFB1: Factor de crecimiento transformante beta 1  
 ACVR2B: Receptor de activina A tipo 2B  
 AMH: Hormona antimulleriana  
 FUT1: Fucosiltransferasa 1  
 B3GNT2: UDP-GlcNAc: betaGal beta-1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa 2  
 GGT5: Gamma-glutamyltransferasa 5  
 GGT6: Gamma-glutamyltransferasa 6  
 MOCS1: Cofactor de molibdeno síntesis 1  
 DHFR: Dihidrofolato reductasa  
 YWHAE: Tirosina 3-monooxigenasa / triptófano 5-monooxigenasa proteína de activación epsilon  
 NF2: Neurofibromina 2  
 CCND2: Ciclina D2  
 CTNNB1: Catenina beta 1  
 POLR2C: ARN polimerasa II subunidad C  
 TXNRD2: Tiorredoxina reductase 2  
 NT5C2: 5'-nucleotidasa, citosólica II  
 CLDN19: Claudina 19  
 PVR: Molécula de adhesión celular PVR  
 CD276: Molécula CD276  
 ACP1: Fosfatasa ácida 1  
 CSNK2A1: Caseína quinasa 2 alfa 1  
 GALNT6: Polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa  
 B3GNT2: UDP-GlcNAc: betaGal beta-1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa 2  
 ACE: Angiotensina I enzima convertidora  
 WNT7B: Miembro de la familia Wnt 7B  
 RAF1: Protooncogén Raf-1, serina / treonina quinasa  
 RPS6KA5: Proteína ribosomal S6 quinasa A5  
 PLCG1: Fosfolipasa C gamma 1

JUN: Subunidad del factor de transcripción AP-1. Protooncogén JUN

HRAS: HR como protooncogén, GTPasa

RPS6KA3: Proteína ribosomal S6 quinasa A3

AKT3: AKT serina / treonina quinasa 3

PIK3CA: Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinasa subunidad catalítica alfa

ATF4: Activador del factor de transcripción 4

TGFA: Factor de crecimiento transformante alfa

CDKN1B: Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1B

IGFR1: Factor de crecimiento tipo insulina receptor-1

CTNNB1: Catenina beta 1

HSP90B1: Proteína de choque térmico 90 miembro de la familia beta 1

TAB3: TGF-beta activada quinasa 1

TERC: Componente de RNAd de la telomerasa

GNAS: Locus complejo GNAS

GNG5: Proteína G subunidad gamma 5

KCNJ5: Canal de potasio controlado por voltaje. Subfamilia J miembro 5

GNAI1: Proteína G subunidad alfa i1

BMI1: Protooncogén BM1. Dedo anular de polycomb

DICER1: Dicer 1, ribonucleasa III

CRKL: Proteína adaptadora. CRK como protooncogén

BCL2: Regulador de la apoptosis BCL2

GLS: Glutaminasa

CDK6: Ciclina dependiente quinasa 6

E2F3: Factor de transcripción E2F 3

BMF: Factor modificador de Bcl2

PTEN: Fosfatasa y tensina homóloga

MAM2: Transactivador de transcripción regulado CREB 1

BCL2L11: BCL2 como 11

MOCS3: Cofactor de molibdeno síntesis 3

URM1: modificador URM1 relacionado con la ubiquitina

IFNGR2: Interferon gamma receptor 2

BCAT1: Aminoácido de cadena ramificada transaminasa 1

HGSNAT: Heparan-alfa-glucosaminida N-acetiltransferasa

AP1S2: Adaptador relacionado con proteínas complejo 1 subunidad sigma 2

TPP1: Tripeptidil peptidasa 1

AKT1: AKT serina / treonina quinasa 1

MYC: Protooncogén MYC, factor de transcripción bHLH

PFKL: Fosfofructoquinasa, tipo de hígado

FGFR1: Receptor de factor de crecimiento de fibroblastos 1

SLC1A5: Portador de soluto familia 1 miembro 5

EXT1: Exostosina glicosiltransferasa 1

NCR1: Receptor desencadenante de la citotoxicidad natural 1

ERBB2: Receptor erb-b2 tirosina quinasa 2

NKX2-2: NK2 Homeobox 2

ONECUT1: Un dominio cortado, miembro de la familia 1

FOXA2: Caja de horquilla A2

WNT4: Familia de sitio de integración MMTV, miembro 4

ID1: Inhibitor of DNA binding 1, HLH protein

FZD1: Receptor de clase frizzled 1

WNT9A: Familia de sitio de integración MMTV, miembro 9A

ACOX1: Acil-CoA oxidasa 1

HLA-B: MHC clase I, secuencia relacionada con el polipéptido A

EXTL3: Exostosina como la glicosiltransferasa 3

TPK1: Subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de cAMP TPK1

ST3GAL3: ST3 beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 3

EHD4: Dominio EH que contiene 4

PML: Leucemia promielocítica

ARFGAP1: Factor de ribosilación ADP. Proteína activadora de GTPasa 1

ARFGAP2: Factor de ribosilación ADP. Proteína activadora de GTPasa 2

EPN3: Epsin 3

RAB11B: Miembro de la familia oncogene RAS

GABRA3: Receptor de ácido gamma-aminobutírico (GABA) A, subunidad alfa 3

HCFC1: Factor de la célula huésped C1  
PER2: Regulador circadiano período 2  
IDO1: Indoleamina 2,3-dioxigenasa 1  
PDE1C: Fosfodiesterasa 1C  
NT5C1B: 5'-nucleotidasa, citosólica IB  
CREB3L3: Proteína 3 de unión A AMPc  
GANAB: Subunidad alfa de glucosidasa II  
DHCR24: 24-dehydrocholesterol reductasa  
COL1A1: Colágeno tipo I alfa D 1 cadena  
FUT6: Fucosiltransferasa 6  
CYP11B1: Citocromo P450 miembro 1 de la subfamilia B de la familia 11  
SLC8A1: Portador de soluto familia 8 miembro A1  
ACSL5: Acil-CoA sintetasa de cadena larga miembro 5  
FASN: Ácido graso sintasa  
CPT1C: Carnitina palmitoiltransferasa 1C  
ACADVL: Acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga  
GNG13: Subunidad de proteína G gamma 13  
CACNA1G: Subunidad de canal dependiente de voltaje de calcio alfa1 G  
ADCY5: Adenilato ciclasa 5  
RASD1: Dexametasona relacionada con ras inducida 1  
GNG7: Proteína G subunidad gamma 7  
CACNA1H: Subunidad del canal dependiente de voltaje de calcio alfa 1 H