

Optimización de un sistema de RT-qPCR para la evaluación de la expresión génica en ovarios de ratonas

Tesina de Grado - Licenciatura en Bioquímica

Bach. Lucía Borra Santarcieri

Tutor: Dr. Gabriel Anesetti Nauar

Co-tutora: Dra. Silvana Pereyra Lepre

Laboratorio de Biología de la Reproducción, UA Histología y Embriología

Laboratorio de Epidemiología genética, UA Genética

Facultad de Medicina, Udelar, Montevideo

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
Principios de la PCR.....	4
PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR).....	5
Sistemas de detección de fluorescencia.....	6
Obtención de ARN a partir de tejido.....	7
Síntesis de ADNc.....	9
Diseño de Cebadores.....	10
Expresión de marcadores de supervivencia y muerte celular en ovarios de ratonas.....	14
OBJETIVOS.....	18
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
Obtención de muestras biológicas.....	19
Extracción de ARN.....	19
Tratamiento con ADNasa.....	20
Caracterización del ARN aislado.....	21
Evaluación de la integridad del ARN.....	21
Evaluación de la concentración y pureza del ARN.....	21
Síntesis de ADNc.....	22
Evaluación de los pares de cebadores.....	22
PCR gradiente en tiempo final.....	24
PCR cuantitativa.....	25
Condiciones de reacción.....	25
Determinación de la eficiencia.....	26
Cuantificación en un muestreo extendido.....	26
Análisis de los niveles de expresión.....	26
Modificación de las condiciones de ciclado.....	27
Selección de nuevos cebadores.....	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
Determinación de la integridad, concentración y pureza de ARN.....	28
Evaluación de los pares de cebadores.....	29
Eficiencia de cebadores.....	34
Estudio de la expresión de los genes mediante RT-qPCR.....	38
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	48
ANEXO.....	51
AGRADECIMIENTOS.....	55

RESUMEN

El presente estudio se enfocó en la optimización de un sistema de RT-qPCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa y cuantificación en tiempo real) para evaluar la expresión génica en ovarios de ratonas adultas jóvenes. La RT-qPCR es una técnica clave en biología molecular debido a su alta sensibilidad y especificidad para cuantificar niveles de ARN mensajero (ARNm). Sin embargo, la precisión de los resultados obtenidos mediante esta técnica depende de varios factores, como la calidad del ARN extraído, las condiciones de la reacción y la eficiencia de los cebadores.

Este trabajo tuvo como objetivo identificar y optimizar dichos factores para garantizar resultados confiables y reproducibles. Se evaluaron pares de cebadores específicos para genes implicados en la supervivencia y muerte celular, como *BAX*, *BCL2* y *CASP3*, a ser probados en muestras de ovario de animales expuestos a diferentes tratamientos. La evaluación incluyó análisis *in silico* y experimentales, considerando criterios como la longitud de los cebadores y del producto de amplificación, el contenido de GC, la ausencia de estructuras secundarias y la localización de los cebadores en el gen. La mayoría de los cebadores evaluados cumplió con los criterios esperados. Se optimizó el protocolo de extracción de ARN a partir de tejido ovárico y se evaluó tanto la calidad como la cantidad del ARN obtenido, logrando un material de alta calidad, adecuado para su uso en RT-qPCR. Asimismo, se evaluaron distintas temperaturas de desnaturalización y concentraciones de cebadores, determinando las condiciones óptimas para este sistema. Para verificar la eficiencia de los cebadores, se realizaron curvas estándar, obteniéndose eficiencias de amplificación aceptables.

Los resultados preliminares de la cuantificación de la expresión génica en el ovario indicaron que los cebadores diseñados para los genes seleccionados eran funcionales. Sin embargo, las eficiencias inicialmente obtenidas no pudieron ser reproducidas en otros individuos, y debido a un muestreo limitado y a que algunos cebadores no funcionaron como se esperaba, no fue posible realizar evaluaciones concluyentes sobre los efectos del tratamiento. Esto llevó a la necesidad de diseñar cebadores nuevos, que serán probados en una siguiente etapa.

Palabras Claves: expresión génica, RT-qPCR, ARN, cebadores, optimización, ovario

INTRODUCCIÓN

La expresión génica comprende una serie de procesos que comienzan con la activación del gen y continúan con la transcripción del ADN (ácido desoxirribo nucleico) en ARN mensajero (ARNm), seguida de la traducción de éste en una cadena de aminoácidos, culminando con el plegamiento y modificación postraduccional de la cadena de aminoácidos para formar una proteína madura y funcional. Este flujo de información, desde el ADN al ARN y finalmente a proteínas constituye lo que se denomina el dogma central de la biología molecular (Cobb 2017, Crick 1970).

Los métodos para abordar la expresión génica, abarcan desde el análisis de productos finales como son proteínas producidas (ELISA, western blot o técnicas inmunohistoquímicas) o técnicas que permiten la detección de ARN como la hibridación *in situ*, *microarrays*, *northern blot*, secuenciación de ARN (*RNA seq*) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando ADN copia (ADNc) obtenido a partir de ARN mensajero (Parmigiani et al. 2003).

Principios de la PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica desarrollada en 1983 por Kary Mullis, que consiste en una reacción enzimática *in vitro* que copia y amplifica de forma exponencial una secuencia específica de ADN por medio de ciclos repetidos de duplicación. La PCR involucra la acción de una enzima termoestable denominada ADN polimerasa y la enzima ampliamente utilizada es la *Taq* polimerasa, que deriva de una bacteria del tipo termófila (*Thermus aquaticus*) capaz de soportar temperaturas elevadas y es la encargada de dirigir la síntesis de ADN en dirección 5'-3' (TamaydeDios et al. 2013, Arya et al. 2005).

Además de la ya mencionada ADN polimerasa, los otros componentes principales de la reacción *in vitro* son: el ADN, una molécula constituida por una doble hebra de polímeros de nucleótidos, cada uno formado por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (purina o pirimidina) complementaria a la base de la otra hebra. Para que la enzima ADN polimerasa ejerza su función son necesarios los desoxirribonucleótidos (dNTPs) que funcionan como sustrato de la enzima para la construcción de nuevas cadenas de ADN. Por otro lado, son requeridos oligonucleótidos sintéticos conocidos como cebadores para amplificar secuencias de ADN específicas, uno

debe ser complementario con la secuencia del extremo 5' de una de las cadenas del ADN (directo) y el otro con el extremo 3' de la otra cadena (reverso).

Cada ciclo de reacción se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y elongación. La primera etapa consta de la separación de la doble hebra de ADN por calentamiento a 95°C, permitiendo el inicio de la etapa de hibridación. Esta segunda etapa consiste en un descenso de temperatura para que los cebadores logren unirse a la hebra de ADN simple que se desea amplificar. La temperatura óptima usada en este paso es específica del fragmento a amplificar y oscila entre los 55 y 65°C. En la última etapa, al elevarse la temperatura (72°C) la Taq polimerasa junto con los desoxirribonucleótidos extienden los dos cebadores produciendo nuevas cadenas de ADN. Las hebras sintetizadas en un ciclo sirven de molde para el ciclo siguiente por lo que el número de copias del ADN diana se duplica en cada ciclo (Loftis et al. 2012).

Existen diferentes variantes de PCR, según su diseño y objetivo: PCR anidada, PCR multiplex, qPCR y la RT-qPCR (Bartlett y Stirling 2003). En este trabajo, se utilizó RT-qPCR para evaluar la expresión de marcadores de supervivencia y muerte celular en ovarios de ratonas (*Mus musculus*) comparado con la expresión de un gen de referencia.

PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR)

La PCR en tiempo real se distingue de la PCR convencional por su capacidad de monitorear la reacción en tiempo real, es decir, mientras la reacción está ocurriendo, en lugar de hacerlo una vez completada. La cuantificación por qPCR puede ser absoluta o relativa. La cuantificación absoluta permite determinar la cantidad de ADN en una muestra problema. Este proceso implica la realización de una curva estándar con muestras de concentración conocida para determinar la cantidad en números de copias o la concentración de la secuencia objetivo, siendo útil para la cuantificación de patógenos como virus y bacterias. Por otro lado, la cuantificación relativa se utiliza para determinar cuántas veces aumenta o disminuye la expresión de un gen entre dos condiciones (Arya et al. 2005). Esta técnica mide los niveles de ARNm del gen objetivo en comparación con un gen de referencia. La normalización inicial se realiza respecto al gen de referencia, lo cual permite ajustar las variaciones en la cantidad y calidad del material de partida, así como las diferencias en la preparación del ARN y la síntesis de ADN copia. El desafío principal de la cuantificación relativa es elegir un gen de referencia apropiado, cuyos niveles de expresión permanezcan constantes bajo las condiciones experimentales. Posteriormente, se realiza

una segunda normalización en relación a la condición control, lo que facilita la comparación precisa de la expresión génica entre las diferentes condiciones experimentales (Martínez-Giner et al. 2013).

Cuando el objetivo es evaluar la expresión génica, se requiere la conversión de ARN a ADNc, un paso que se logra mediante una transcripción reversa (RT). Así, la RT-qPCR combina estos dos procesos que se pueden realizar en uno o dos pasos: la transcripción reversa del ARN a ADNc con la posterior amplificación y cuantificación de este ADNc mediante qPCR. Esta integración permite no solo la detección sino también la cuantificación precisa y sensible de los niveles de expresión génica a partir de muestras de ARN (Basu 2015).

Sistemas de detección de fluorescencia

La monitorización de la reacción en tiempo real implica el uso de fluorocromos para detectar los productos de amplificación. Los sistemas de detección de fluorescencia más comunes incluyen las sondas TaqMan y el colorante SYBR Green (Figura 2).

El sistema TaqMan utiliza una sonda que permanece inactiva hasta que se encuentra con la secuencia objetivo. Durante la amplificación, la enzima Taq polimerasa corta la sonda, lo que genera una señal fluorescente cuya intensidad está directamente relacionada con la cantidad de producto de PCR generado. Este sistema permite la detección específica de secuencias de interés y el uso simultáneo de diferentes fluoróforos, eliminando la necesidad de procesamiento post-PCR. Sin embargo, su principal desventaja es que requiere la síntesis de sondas específicas para cada secuencia (Valasek y Repa 2005).

El SYBR Green, sistema de detección utilizado en la presente tesis debido a la fácil optimización y bajo costo, es un agente fluorescente que se une al ADN de doble cadena, pero no al de simple cadena. La unión del fluoróforo ocurre en el surco menor del ADN y no se intercala. La señal generada es proporcional a la cantidad de producto generado. Las ventajas del uso del SYBR Green incluyen su aplicación en cualquier gen y la detección de la formación de dímeros. Sin embargo, las desventajas incluyen su inespecificidad y la necesidad de verificar el producto de amplificación mediante una curva de disociación para evaluar los dímeros de cebadores. Dichas curvas se realizan aplicando un gradiente de temperaturas ascendente, donde los fragmentos de ADN se disocian a una determinada

temperatura de desnaturalización con consecuente caída en los valores de fluorescencia (Kubista et al. 2006).

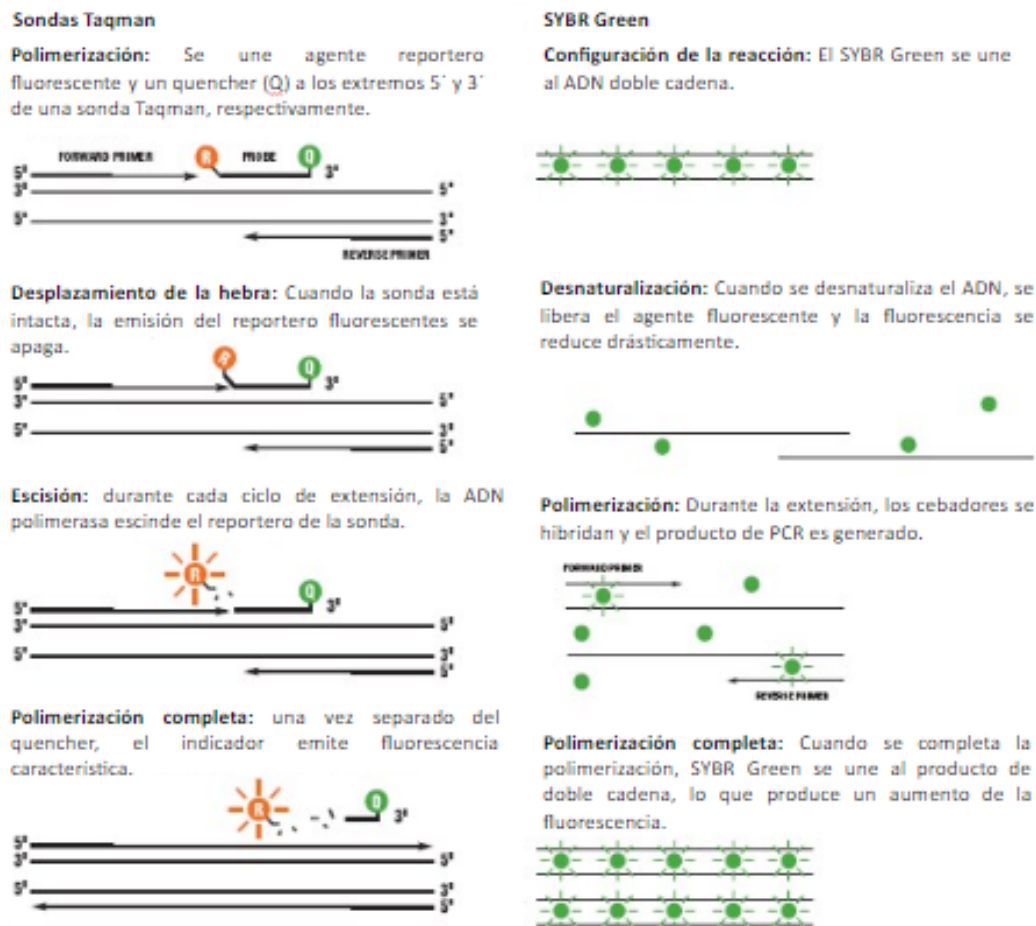


Figura 2. Mecanismos de acción de los sistemas de detección de fluorescencia para la cuantificación de los productos amplificados. A la izquierda, se esquematizan las etapas de acción de la sonda Taqman®; a la derecha, las del agente fluorescente Sybr Green® (Modificada de [Thermo Fisher Scientific](#)).

Obtención de ARN a partir de tejido

La obtención de muestras es un primer paso que puede introducir variabilidad en el análisis de la expresión génica, ya que los perfiles de expresión de los ARNm pueden alterarse durante los procesos de recolección y procesamiento. La extracción eficiente de ácidos nucleicos está influenciada por varios factores claves, como una homogeneización adecuada, el tipo de muestra en análisis, su estado fisiológico y la cantidad de material procesado. Estos factores pueden afectar tanto el rendimiento como la calidad del ácido nucleico obtenido (Bustin et al. 2009). Por ejemplo, en tejidos humanos, se observó que

aquellos tejidos con grandes cantidades de material fibroso o grasa (piel, cuello uterino, próstata) tienen los rendimientos más bajos (Walker et al. 2016).

La extracción de ARN total implica obtener un ARN libre de proteínas, ADN genómico, inhibidores y nucleasas. Se ha demostrado que un mejor rendimiento de ARN se obtiene de tejido que ha sido correctamente disgregado previamente a la correspondiente congelación a -80°C (Fleige y Pfaffl 2006). La eliminación de ribonucleasas (ARNasas), también constituye un factor fundamental en la extracción de ARN ya que las mismas son enzimas altamente resistentes cuya actividad catalítica es capaz de degradar el ARN. La contaminación por ARNasas puede provenir tanto del propio tejido que se está estudiando como de fuentes externas, como reactivos, el material de laboratorio utilizado, guantes, entre otros. Además, en células eucariotas, la concentración de ARNasas varía según el tipo de tejido y el contenido de ARNm (Green y Sambrook 2019).

Se ha demostrado que diferentes técnicas de disrupción y tampones de homogeneización impactan significativamente en la pureza y algunos marcadores de calidad del ARN (Nouvel et al. 2021). En general, la extracción de ARN a partir de células es más sencilla que a partir de tejido, ya que se omite un paso crítico durante el proceso de extracción: la homogeneización. Este paso adicional introduce variabilidad y potenciales fuentes de error, lo que puede afectar tanto la cantidad como la calidad del ARN obtenido, y consecuentemente, la precisión de los análisis posteriores como la RT-qPCR. Por lo tanto, es crucial optimizar los métodos de disrupción y homogeneización para obtener resultados consistentes y fiables en estudios de expresión génica.

Entre los métodos más comunes en la extracción de ARN, se destacan los que utilizan fenol para eliminar mediante una separación de fases, proteínas y componentes no hidrosolubles de la solución acuosa que contiene los ácidos nucleicos. La adición de fenol y respectiva centrifugación genera la separación de dos fases: la fase orgánica, localizada en la parte inferior, la cual contiene lípidos, proteínas y fragmentos subcelulares y la fase acuosa que al ser menos densa se localiza en la parte superior y que contiene principalmente ácidos nucleicos. En dicha separación, el uso de cloroformo aumenta la eficiencia de la extracción gracias a su capacidad para disolver proteínas y lípidos evitando contaminaciones en fase acuosa. El método de solubilización y extracción TRIzol, utilizado en esta tesis, desproteíniza el ARN y es fundamental en casos donde el tejido presenta una alta concentración de ARNasas endógenas (Rio et al. 2010).

La cuantificación de ARN es importante para que al momento de comparar la expresión de las diferentes muestras, estas hayan partido de aproximadamente la misma cantidad. En este sentido, existe una variedad de métodos de cuantificación entre los que se destaca el uso de tecnologías basadas en espectrofotometría (Nanodrop®) y fluorimetría (Qubit®). La espectrofotometría permite determinar la concentración y pureza de ácidos nucleicos presentes en la mezcla en cuestión y se realiza mediante la absorción de principalmente las bases nitrogenadas a una longitud de onda de 260 nm. En la fluorimetría, se cuantifica la emisión de un fluoróforo que actúa como agente intercalante, uniéndose de forma específica al ácido nucleico sin interferencia de otras moléculas. Este método resulta ser mucho más sensible que las medidas de absorbancia, además de específico porque no es alterado por absorbancia de contaminantes, lo que permite una cuantificación más exacta (Díaz-Alonso et al. 2013).

La cuantificación y análisis de la pureza no son suficientes para determinar la calidad de una extracción de ARN. La electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio u otro intercalante de ácidos nucleicos, permite evaluar la integridad y calidad de extracción mediante la visualización de un patrón de bandas correspondientes a ARN ribosomal (ARNr) 28S y 18S que indican el grado de degradación del ARN.

Síntesis de ADNc

El paso de transcripción reversa, es crucial debido a que la enzima Taq polimerasa sólo puede sintetizar ADN a partir de un molde de ADN y no de ARN (Varmus 1987). La enzima transcriptasa reversa, es una ADN polimerasa dependiente de ARN que es codificada por algunos retrovirus durante el proceso de replicación viral. Existen tres estrategias por las cuales la síntesis del ADNc se puede desarrollar (ver Figura 1): oligo(dT), cebadores aleatorios y los cebadores específicos. Los oligo(dT) se unen a la cola poli-A presente en el extremo 3' de los ARNm eucariotas por lo que va favorece la síntesis de este tipo de ARN, mientras que los cebadores aleatorios consisten en varios cebadores cortos (6-11 nucleótidos) que pueden hibridar en cualquier parte del ARN. Por otro lado, los cebadores específicos se utilizan para amplificar regiones particulares del ARN por lo que la síntesis se limita a un gen de interés (Loftis et al. 2012).

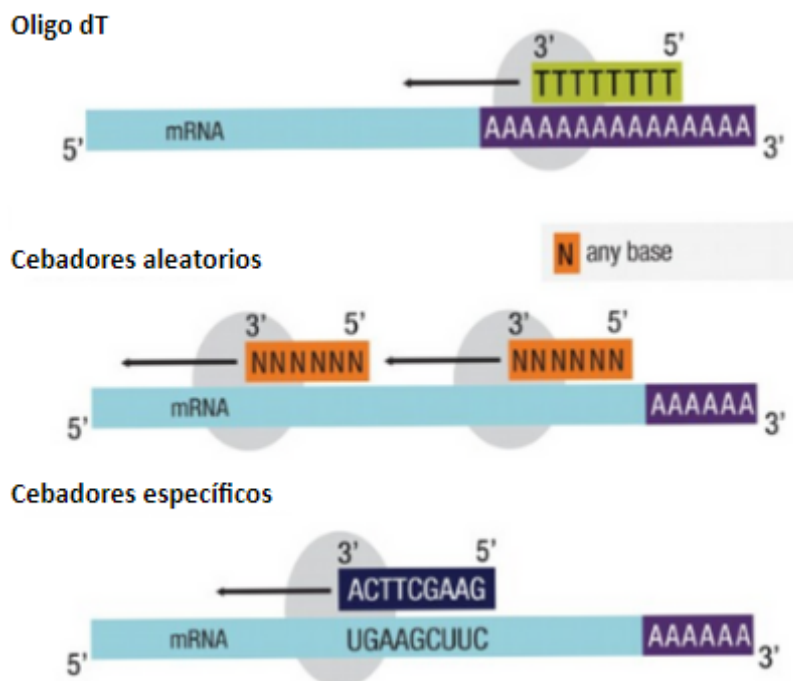


Figura 1. Diferentes estrategias de síntesis de ADNc, donde N representa a cualquier base y G, C, T y A son respectivamente guanina, citosina, timina, adenina (Modificada de [Thermo Fisher Scientific](#)).

Diseño de Cebadores

La eficiencia de los cebadores en la RT-qPCR está estrechamente vinculada con su diseño y selección, ya que ambos aspectos son fundamentales para garantizar una cuantificación relativa precisa de la expresión génica. La selección de oligonucleótidos altamente estables y específicos es crucial para el éxito del sistema, pues un diseño inadecuado no solo puede afectar la eficiencia de la amplificación, sino también dar lugar a la formación de dímeros y productos no específicos que compiten con el producto deseado, comprometiendo los resultados. Estos problemas, además de impactar la eficiencia, pueden generar artefactos que distorsionen las diferencias reales entre las muestras. Por este motivo, es esencial validar la especificidad de los cebadores mediante técnicas *in silico*, utilizando herramientas bioinformáticas que aseguren la amplificación exclusiva de la secuencia objetivo (Rodríguez et al. 2015). Una eficiencia dentro del rango aceptado (90-110%), junto con un diseño y validación rigurosos, garantiza que las diferencias observadas en los niveles de expresión reflejen cambios biológicos reales entre las condiciones experimentales evaluadas.

Los criterios a seguir para el correcto diseño de cebadores para qPCR son (Basu 2015):

1. Longitud del producto de amplificación (amplicón):

Los productos de amplificación deben tener idealmente entre 50 y 150 pb, ya que presentan una menor posibilidad de formar estructuras secundarias.

2. Longitud del cebador:

La longitud de los cebadores debe estar entre 15 y 30 nucleótidos. Tamaños de cebadores fuera de este rango pueden disminuir la especificidad de unión a la región de interés.

3. Temperatura de desnaturalización:

La temperatura de desnaturalización (T_m) se define como la temperatura a la cual la mitad de las cadenas de ADN están desnaturalizadas. En una PCR, las concentraciones de los cebadores son superiores a las del molde de ADN, por lo que la T_m se define como la temperatura a la cual un cebador está hibridado a la mitad de las cadenas del molde. La T_m depende del largo y contenido GC de los cebadores. El rango utilizado es de 55 a 60 °C, y la diferencia de T_m entre el par de cebadores debe ser menor a 5 °C para lograr un buen alineamiento de ambos con el ADN molde (Bartlett y Stirling 2003).

4. Contenido de guaninas y citosinas (GC):

El porcentaje de GC en los cebadores debe ser entre 30 y 65%, considerando que un alto contenido de GC puede afectar la desnaturalización durante la reacción, provocando una disminución de la eficiencia de amplificación.

5. Estructuras secundarias:

Las estructuras secundarias, como las horquillas y los dímeros, tienen un impacto negativo en la capacidad de los cebadores para unirse y extenderse en el ADN molde. Una horquilla se forma cuando una secuencia de nucleótidos dentro del propio cebador es complementaria a otra secuencia dentro de la misma molécula. Los dímeros se forman cuando dos cebadores se hibridan entre sí, ya sean de la misma secuencia (homodímeros) o de diferentes secuencias (heterodímeros).

El diseño de cebadores debe minimizar la formación de estas estructuras (Bartlett y Stirling 2003). Un parámetro útil para analizar la posible formación de estructuras secundarias es la energía libre de Gibbs (ΔG), que proporciona información sobre la estabilidad termodinámica de dichas estructuras. Valores negativos de ΔG indican que la formación de la estructura secundaria es termodinámicamente favorable, por lo que cuanto más negativo sea el valor, más estable será la estructura secundaria y menor será la eficiencia de la reacción. Valores positivos indican que la formación de estructuras secundarias es desfavorable y, por lo tanto, disminuye la probabilidad de que dicha estructura se forme. Idealmente, se seleccionan cebadores con valores de ΔG mayores a -9 kcal/mol, ya que valores más negativos requerirán de alta energía para romper dichas estructuras.

Además de los criterios mencionados para el diseño de cebadores, es fundamental implementar una adecuada estrategia de localización de cebadores en la secuencia génica. Una estrategia eficaz es posicionar los cebadores, o al menos uno de ellos, abarcando una unión exón-exón. Esto significa que una mitad del cebador se hibrida con el extremo 3' de un exón y la otra mitad con el extremo 5' del exón adyacente (Fig. 3D). Esta disposición permite la amplificación y detección exclusivamente de secuencias de ARNm empalmadas, evitando así la amplificación de ADN genómico contaminante. Otra estrategia, es diseñar los cebadores de manera que flanqueen una región que contenga al menos un intrón (Fig. 3B). De esta forma, se evita la coamplificación de ADN genómico, ya que la amplificación de una secuencia tan grande de ADN sería nula y, aunque existiera tal producto, su tamaño es distinguible del ADNc (sin intrones) tras la visualización en electroforesis.

Es de destacar que dado que cualquier método de extracción de ARN tiene riesgo de acarrear una contaminación con ADN genómico, eliminar dicho ADN resulta crucial, especialmente cuando no se dispone de cebadores diseñados cumpliendo el criterio de alineamiento en regiones exon-exon o para disminuir la probabilidad de amplificación no específica. Para ello, se puede tratar la muestra con la enzima ADNasa, que degrada ADN, asegurando así una mayor especificidad en la amplificación del ARN mensajero deseado (Eshleman y Smith 2001).

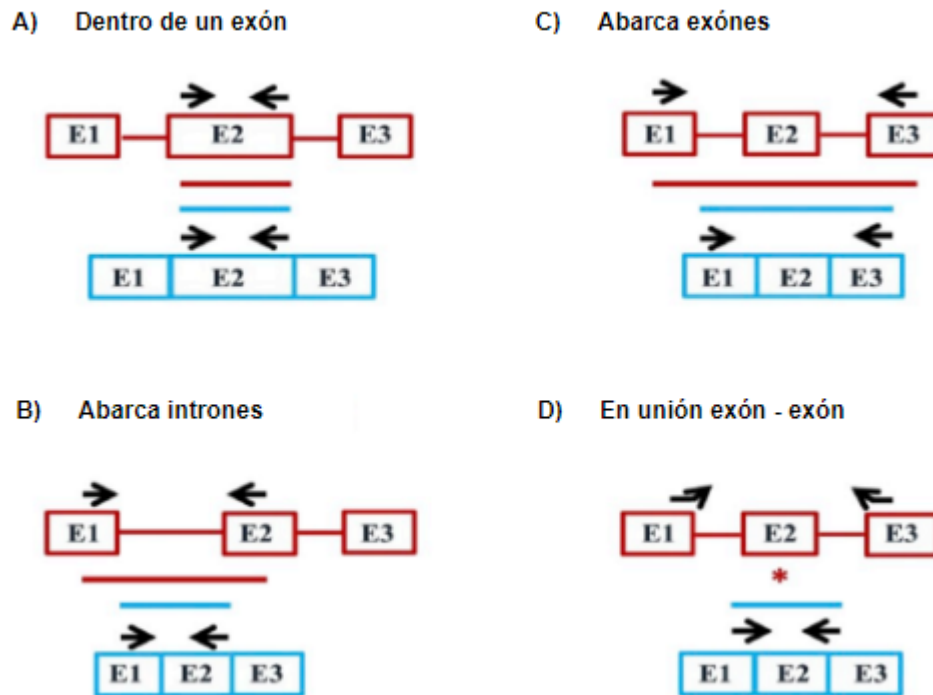


Figura 3. Estrategias de diseño de cebadores y sus probables productos de amplificación. En rojo se representa el ADN genómico y en azul el ADN copia. Las cajas son exones y los intrones se representan con líneas. Los cebadores se observan como flechas negras, y los amplicones de ADN genómico (ADNg) y ADN copia (ADNc) se representan con barras rojas o azules, respectivamente. **a)** Cebadores dentro de un exón generan un producto de amplificación para ambos tipos de ADN. **b)** Cebadores que abarcan intrones resultan en productos de amplificación diferenciables por su tamaño. **c)** Cebadores que abarcan dos exones. **d)** Cebadores en la unión exón-exón que permiten amplificación del ADNc pero no del ADNg (Modificada de (Padhi et al. 2020)).

Los criterios mencionados responden a la necesidad de unificar los criterios de evaluación de la expresión génica mediante RT-qPCR, dado el elevado incremento de trabajos científicos con inconsistencias que inducen a interpretaciones erróneas de los resultados, llevó a la creación de una guía que sirviese como referencia. Esta guía, conocida como MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments), proporciona la información mínima necesaria para la publicación de trabajos que utilizan esta técnica (Bustin et al. 2009). No obstante, estos criterios no siempre son tenidos en cuenta (Padhi et al. 2020).

Expresión de marcadores de supervivencia y muerte celular en ovarios de ratonas

La presente tesis se enmarca dentro del proyecto I+D - CSIC “Efectos de un modulador de la actividad mitocondrial en la protección del ovario y la fertilidad frente a la exposición a agentes quimioterápicos”, donde uno de los objetivos específicos, y que constituye el objeto de estudio de esta tesis, es optimizar la técnica de RT-qPCR para evaluar los posibles cambios inducidos por la exposición al modulador mitocondrial dicloroacetato (DCA) en marcadores génicos relacionados con la supervivencia y la muerte celular en ovarios de animales expuestos a un agente quimioterápico. Este trabajo es particularmente relevante considerando los efectos negativos documentados de los quimioterápicos sobre la fertilidad femenina, que pueden causar daño gonadotóxico significativo, pérdida de la población folicular ovárica, establecimiento de insuficiencia ovárica prematura y, en última instancia, infertilidad (Spears et al. 2019, Winship et al. 2019, Martins y Mesquita-Guimarães 2016). La hipótesis del proyecto es que el DCA, al estimular el metabolismo oxidativo, mejoraría la posibilidad de supervivencia de los folículos ováricos frente al posible daño gonadal inducido por un agente quimioterápico como la vincristina. Para llevar a cabo este estudio, los animales fueron distribuidos en dos grupos: uno que recibió DCA en el agua de bebida y otro que sólo recibió agua. A su vez, estos grupos se subdividieron al azar en dos subgrupos, en los cuales cada animal recibió vincristina o el vehículo correspondiente (Tabla 1). Con ambos criterios se definieron 4 grupos denominados HH, HD, VH y VD, según lo indicado en la Tabla 1.

Se pretendió estudiar la expresión de genes de interés en el tejido ovárico de ratonas adultas jóvenes durante su etapa reproductiva. Las ratonas son un buen modelo para estudios de la función ovárica, por varias razones. Por un lado, presentan un ciclo reproductivo bien caracterizado y similar en muchos aspectos al de los humanos. Además, la utilización de ratonas permite controlar de manera precisa variables experimentales y condiciones ambientales, lo cual es crucial para obtener resultados consistentes y reproducibles.

Tabla 1. Grupos experimentales de ratonas empleados en este trabajo: agua de bebida - vehículo (HH), DCA - vehículo (HD), agua de bebida - vincristina (VH) y DCA - vincristina (VD).

	Sin modulador mitocondrial	Con modulador mitocondrial
Con vehículo	Agua de bebida – vehículo (HH)	DCA – vehículo (HD)
Con vincristina	Agua de bebida– vincristina (VH)	DCA – vincristina (VD)

Los ovarios de las ratonas, son pequeños órganos ovales localizados cerca del polo caudal del riñón y contenidos en una bolsa ovárica que los separa de la cavidad abdominal (Figura 4). Esta bolsa está rodeada de tejido adiposo, cuya extensión llega a ser mayor que el ovario en sí (Treuting et al. 2017). Las principales funciones del ovario incluyen el desarrollo, maduración y liberación de ovocitos aptos para la fecundación (ovogénesis), así como la síntesis y secreción de hormonas esteroides (esteroidogénesis), esenciales para el desarrollo folicular, la ciclicidad, el comportamiento, el desarrollo de características sexuales secundarias femeninas y diversas funciones metabólicas (Hu et al. 2020).

Las características del tejido ovárico presentan un desafío en la extracción de ARN, ya que requieren una disgregación adecuada para garantizar la liberación eficiente de los ácidos nucleicos. Dado que el ovario contiene abundante tejido conectivo, es fundamental aplicar técnicas de disgregación efectivas para romper estas estructuras y liberar el ARN intacto de las células. Esto asegura la representatividad y la integridad de la muestra, factores críticos para obtener resultados precisos en los análisis de expresión génica. El ovario presenta desafíos similares en la extracción de ARN a aquellos órganos con abundante material fibroso. Se clasifica dentro de los órganos que presentan un rango de rendimiento en la extracción de ARN moderado, oscilando aproximadamente entre 2 y 0,05 µg por mg de tejido ([Thermo Fisher Scientific](#)). Estos valores pueden variar dependiendo del estado fisiológico del tejido y del organismo en cuestión, ya que los tejidos análogos en diferentes organismos pueden producir diferentes rendimientos de ARN (Nouvel et al. 2021). En el caso del ovario de ratona, se ha observado además que en diferentes fases del ciclo estral pueden mostrar variaciones en la cantidad de ARN extraído, lo que refleja cambios en la actividad transcripcional (Morris et al. 2022).

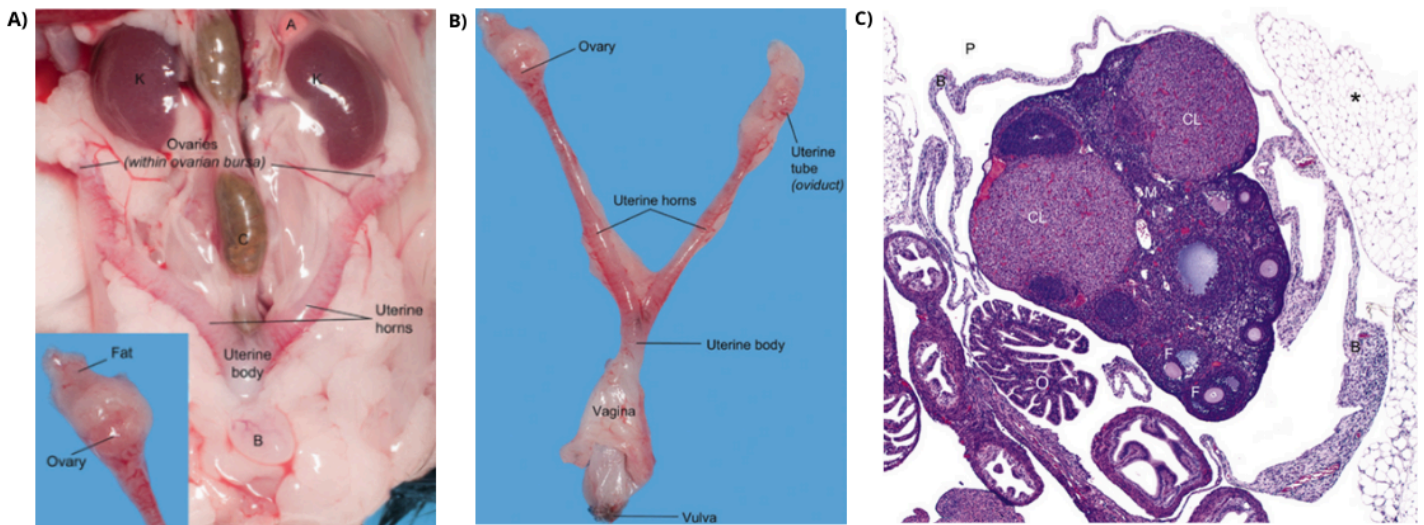


Figura 4. A) Sistema genital femenino *in situ*. Macroscópicamente se identifican los ovarios ubicados cerca del polo caudal de cada riñón, un útero bicornue y la vagina. Los riñones se indican con la letra K, las glándulas suprarrenales (A), la vejiga (B) y el colon (C). **B)** Aparato reproductor de la ratona *ex vivo* donde se observan ambos ovarios, oviductos, útero, bóveda vaginal y la abertura vaginal externa a nivel de la vulva. **C)** Corte histológico de un ovario adulto, situado dentro de la bolsa ovárica (B) y rodeado de tejido adiposo (*), presentan dos áreas poco definidas: una médula central (M) muy vascularizada y una corteza exterior más compacta, que contiene los folículos en desarrollo (F) y los cuerpos lúteos (CL). Se indican también el oviducto (O) y la cavidad peritoneal (P) (Tomado de (Treuting et al. 2017)).

Con el objetivo de establecer un sistema de evaluación de la expresión génica mediante cuantificación relativa por PCR en tiempo real, esta tesis se propone desarrollar un sistema para el estudio de genes de interés en el ovario. El propósito es evaluar los niveles de expresión de estos genes en un contexto gonadotóxico y en respuesta a un modulador mitocondrial. La estrategia de trabajo incluye la obtención de ARN de alta calidad a partir de muestras de ovarios de ratonas y la evaluación de cebadores seleccionados de la literatura para garantizar su eficiencia en la amplificación de los genes de interés. Esto busca lograr una cuantificación precisa y confiable de la expresión génica.

Los genes evaluados fueron los que codifican para las proteínas: **BAX** (*Bcl-2-associated X protein*), una proteína proapoptótica que favorece la liberación de factores apoptóticos desde las mitocondrias hacia el citoplasma, **BCL2** (*B-cell lymphoma 2*), una proteína antiapoptótica que protege a las células de la muerte celular programada al mantener la integridad de la membrana mitocondrial externa y prevenir la liberación de factores apoptóticos y **Caspasa-3**, una enzima crucial en la ejecución de las últimas fases

de la apoptosis (Li et al. 2020, Meresman 2011). Estos genes son relevantes para investigar el efecto gonadotóxico de las drogas quimioterápicas sobre el ovario, ya que dicho efecto puede alterar el desarrollo de los folículos ováricos, provocar la sobreexpresión de moléculas señalizadoras que inducen patrones de muerte celular, modificar la función endocrina del ovario o alterar el estroma y la vascularización gonadal (Winship et al. 2019). Todas estas alteraciones pueden impactar negativamente en la fertilidad femenina. Aproximadamente el 30% de las niñas y jóvenes que son expuestas a tratamientos radio y quimioterápicos presentan problemas asociados con el daño gonadotóxico y la pérdida de la fertilidad, por lo que es relevante la evaluación de la expresión génica en etapas reproductivas (Joffe et al. 2022). Este efecto gonadotóxico también está descrito en ratonas y otras especies de mamíferos, por lo que este modelo constituye una buena aproximación experimental (Sonigo et al. 2019).

OBJETIVOS

Objetivo general

Optimizar un sistema para el análisis preciso, confiable y eficiente de la expresión génica en ovarios de ratonas adultas jóvenes mediante la técnica de RT-qPCR.

Objetivos específicos

1. Obtener ARN de alta calidad e integridad a partir de tejido ovárico de ratonas adultas jóvenes, para su posterior análisis mediante RT-qPCR.
2. Evaluar la eficiencia y especificidad de los cebadores para el análisis de la expresión génica en este sistema.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras biológicas

Se utilizaron muestras de ovarios de ratonas de la cepa C57BL/6, de 10 semanas de edad, obtenidas de la Unidad de Reactivos para Biomodelos de Experimentación (URBE) de la Facultad de Medicina. Los animales formaban parte del proyecto "Efectos de un modulador de la actividad mitocondrial en la protección del ovario y la fertilidad frente a la exposición a agentes quimioterápicos" (Responsables: G. Anesetti y R. Chávez). El manejo y tratamiento de los animales fue aprobado por la CHEA (Protocolo 070151-000016-22) y los investigadores responsables se encuentran acreditados por la CNEA. Una vez finalizado el tratamiento, los animales fueron anestesiados profundamente con ketamina-xilacina (100 mg/kg y 5 mg/kg, respectivamente) y sacrificados para obtener las muestras necesarias. Los ovarios fueron extirpados y disecados rápidamente, separando cuidadosamente la grasa y el oviducto. El tejido ovárico se procesó mediante ruptura mecánica, utilizando bisturí, vórtex y pipetas automáticas con puntas de pipetas p1000 y p200 para su disgregación sobre hielo. En la optimización del protocolo, este paso de disgregación se probó realizar tanto antes como después de congelar las muestras. Las muestras se conservaron en 200 μ L de TRIzol® (Qiagen) a -80°C para su posterior utilización. El TRIzol es una mezcla de tiocianato de guanidinio y fenol en una disolución monofásica, el primero es un potente agente caotrópico que desnaturaliza proteínas e inhibe ARNasas, protegiendo el RNA de la degradación y el segundo funciona como un desnaturalizante que rompe las estructuras proteicas y disuelve los componentes celulares (Rio et al. 2010). Se utilizaron un total de cuatro animales (n=4) para los ensayos de evaluación de los cebadores, con un animal por cada condición experimental. Para un primer análisis cuantitativo de la expresión génica, se emplearon las mismas muestras. Posteriormente, el número de animales se amplió a un total de ocho (n=8).

Extracción de ARN

Para la extracción de ARN, se agregaron 200 μ L de cloroformo por cada 1000 μ L de muestra con TRIzol® y se mezcló vigorosamente con un vórtex, luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos. El cloroformo facilita la separación de fases. Después de centrifugar durante 15 minutos a 12000 g (4°C), se obtuvieron tres fases distintas: la fase acuosa, que contiene el ARN debido a la solubilidad proporcionada por la

carga negativa de los fosfatos presentes en los ácidos nucleicos; la interfase, que contiene el ADN; y la fase orgánica, que contiene proteínas y lípidos, gracias a la interacción de las regiones hidrofóbicas de estos con el fenol (ver Figura 5). Se preservó la fase acuosa para recuperar el ARN extraído descartando las demás.

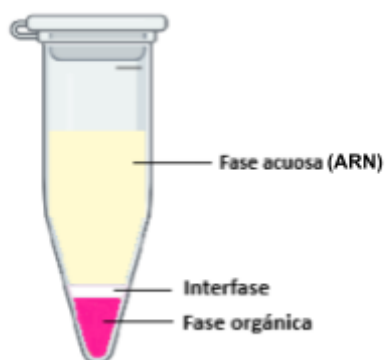


Figura 5. Separación de fases después de la extracción con fenol-cloroformo. En la fase acuosa, representada en amarillo, se encuentra el ARN. En la interfase se acumula el ADN como una floculación blanca, mientras que en la fase inferior se disuelven las proteínas y los lípidos.

Luego se incorporó un volumen igual de isopropanol a la fase acuosa junto con 1 μ l de acrilamida lineal al 1% (Invitrogen™) para lograr la coprecipitación del ácido nucleico y asegurar la correcta formación del precipitado. La muestra fue homogeneizada manualmente y luego preservada a -80°C durante toda la noche. Tras este paso se procedió a centrifugar a 12000 g (4°C) durante 1 hora lo que permite la precipitación del ARN. Se descartó el sobrenadante y se conservó el pellet, el cual fue lavado con 200 μ l de etanol al 80%, para eliminar sales y pequeñas moléculas orgánicas que podrían aún estar presentes en la muestra, seguido de un último paso de 5 minutos de centrifugación a las mismas condiciones. Finalmente, se volvió a descartar el sobrenadante y se dejó secar el pellet de ARN para la posterior resuspensión en 50 μ l de agua libre de ARNasas y 1 μ l de inhibidor de ARNasas (*Applied Biosystems*™) para proteger al ARN de la degradación.

Tratamiento con ADNasa

Se partió de 20 μ l de la suspensión obtenida del ARN aislado y se añadió ADNasa Turbo DNA-Free Kit (Invitrogen™) siguiendo las indicaciones del fabricante. La enzima ADNasa cataliza la ruptura de los enlaces fosfodiéster en el ADN, eliminando así el posible ADN genómico contaminante. La muestra se incubó a 37°C durante 30 minutos y, posteriormente, se adicionaron 5 μ l del agente inactivador de la enzima, dejándola incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos con agitaciones ocasionales. Esta inactivación es necesaria para detener la actividad de la ADNasa y evitar que continúe degradando cualquier ADN presente, lo cual podría interferir con análisis posteriores. Por último, se centrifugó a 10000 g durante 3 minutos para precipitar el agente inactivador y conservar el sobrenadante.

Caracterización del ARN aislado

Evaluación de la integridad del ARN

La calidad e integridad del ARN aislado se evaluó a partir de una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% pre teñido con Bromuro de Etidio al 1% (Invitrogen™). Este agente intercalante de ácidos nucleicos es considerado como un potente mutagénico, nocivo por ingestión, tóxico por inhalación e irritante para los ojos, la piel y las vías respiratorias por lo que debe ser utilizado con precaución. La preparación del gel de agarosa 1,5 %, se realizó diluyendo 1,5 g de agarosa en 100 ml de buffer TAE 1x (40 mM Tris, 20 mM Ácido acético, 1 mM EDTA) y adicionando 3 µl del agente intercalante.

Se sembraron 5 µl de muestra en el gel junto con 1 µl de buffer de carga para facilitar su depósito en el pocillo. La electroforesis se llevó a cabo utilizando buffer de corrida TAE 1x, aplicando un voltaje de 100 voltios durante 20 minutos. La integridad del ARN se verificó utilizando un transiluminador UV, observando la presencia de bandas correspondientes al ARN ribosomal (18S y 28S) y la ausencia de ADN genómico en las muestras. Se busca la presencia de estas bandas ya que el ARN ribosomal es el tipo de ARN más abundante, mientras que el ARNm representa aproximadamente el 1% del ARN total. En general, el ARN se considera de buena calidad cuando la relación de bandas 28S:18S es aproximadamente 2 o superior (Schroeder et al. 2006).

Evaluación de la concentración y pureza del ARN

La concentración del ARN extraído se obtuvo mediante el uso del fluorímetro Qubit™ *Fluorometer* y empleando el Kit de Ensayo Qubit™ RNA IQ (Invitrogen™). El fluorímetro emplea algoritmos especializados de ajuste que se utilizan para desarrollar una curva de calibración utilizando muestras estándar con una concentración conocida, a partir de la cual se interpolan las lecturas de las muestras de concentración desconocida y se setea el volumen de la muestra (3µl) para el cálculo de la concentración de ARN en unidades de ng/µl.

La determinación de pureza de las muestras de ARN se realizó utilizando el espectrofotómetro UV visible Nanodrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific). Para la medición de las muestras, se empleó 1 µL de agua como solución de referencia o blanco. La medición de absorbancia de las muestras requirió 1 µL de cada muestra. La intensidad de

luz medida tanto en la muestra como en el blanco es necesaria para calcular la absorbancia (Abs) a una longitud de onda específica, la cual se correlaciona con la concentración de la muestra. La determinación de la pureza de la muestra se realizó mediante la comparación de los valores de absorbancia a 260 nm (máximo de absorción de ácidos nucleicos) y 280 nm (máximo de absorción de proteínas). Se considera que una muestra de ARN tiene buena pureza cuando la relación Abs 260/280 es $\geq 2,0$ y la relación Abs 260/230 es $\geq 1,8$. Valores inferiores a la relación Abs 260/280 pueden sugerir contaminación por proteínas u otros compuestos que afectan la calidad del ARN. Por otro lado, valores inferiores a la relación Abs 260/230 pueden indicar la presencia de compuestos orgánicos (como EDTA, TRIzol, derivados de guanidina) o sales (Díaz-Alonso et al. 2013). Los datos se presentan como medias $\pm$ error estándar.

Síntesis de ADNc

El ARN aislado se sometió a transcripción reversa con la enzima transcriptasa reversa (MLV-RT), 200 U/ μ l (Thermo Fisher Scientific), encargada de catalizar el pasaje de información de ARN a ADNc para utilizar como molde en las reacciones de PCR. La enzima utilizada hace uso de la molécula de ARN como molde para generar una copia de ADN primera hebra y complementaria.

Previamente, se ajustaron con agua los volúmenes de las muestras de ARN para obtener una concentración inicial de 100 ng/ μ l en todas ellas. Luego, se tomó 1 μ l de ARN para la reacción y se adicionaron 2 μ l de ditioneitol (DTT) 100 mM, que mantiene la actividad de la enzima; 4 μ l de 5X *First Strand Buffer*; 1 μ l de dNTPs 10 μ M; 1 μ l de oligo dT; y 1 μ l de MLV-RT. La mezcla se incubó a 37°C durante 50 minutos y a 70°C por 15 minutos para inactivar la enzima. El ADNc obtenido fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

Evaluación de los pares de cebadores

Los genes en estudio en esta tesis fueron *GAPDH* (rata y ratón), *BAX*, *BCL2* y *CASP3*. Los cebadores seleccionados para evaluar la expresión de estos genes se observan en la Tabla 1. La evaluación se realizó mediante el uso de herramientas bioinformáticas, siguiendo los criterios detallados en la Tabla 2 para verificar su adecuación y posibilidad de empleo en ensayos de RT-qPCR. Las herramientas utilizadas fueron (Padhi et al. 2020) :

- **Primer-BLAST** (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>): integra el diseño de cebadores con una búsqueda BLAST para validar la especificidad de los cebadores y confirmar que se unan únicamente a la secuencia deseada. También predice el tamaño del amplicón, muestra la alineación de los cebadores con sus secuencias objetivo (incluyendo desajustes) y detecta posibles amplificaciones inespecíficas.
- **Oligo Analyzer de IDT DNA** (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>): ofrece un análisis detallado de las características de los cebadores, como la temperatura de desnaturalización y la formación de dímeros, para asegurar que sean adecuados para la PCR.
- **UCSC Genome Browser** (<https://genome.ucsc.edu/>): proporciona una interfaz visual para la exploración y el análisis del genoma, permitiendo la visualización de genes, variantes genéticas y otras características del ADN en un entorno interactivo.
- **UCSC In Silico PCR** (<https://genome.ucsc.edu/>): realiza una simulación del proceso de PCR para evaluar teóricamente la amplificación de los cebadores en el genoma, facilitando la identificación de posibles amplificaciones no específicas o productos no esperados.

Tabla 1. Secuencias nucleotídicas de los pares de cebadores correspondientes a los genes *GAPDH* (*rata*), y *GAPDH*, *BAX*, *BCL2*, *CASP3* (ratón) con sus respectivas referencias bibliográficas.

Gen	Accession Number	Cebador (5' - 3')	Referencias
<i>GAPDH</i> (rata)	NM_017008	D: CACTGAGCATCTCCCTCACAA	(Marton et al. 2023)
		R: TGGTATTCGAGAGAAGGGAGG	
<i>GAPDH</i> (ratón)	NM_001411843.1	D: GTGGAGTCATACTGGAACATGTAG	(Soltani et al. 2019)
		R: AATGGTGAAGGTCGGTGTG	
<i>BAX</i>	NM_007527.4	D: TGAAGACAGGGGCCTTTTGTG	(Liu et al. 2020)
		R: AATTCGCCGGAGACACTCG	
<i>BCL2</i>	NM_177410.3	D: GTCGCTACCGTCGTGACTTC	(Liu et al. 2020)
		R: CAGACATGCACCTACCCAGC	
<i>CASP3</i>	NM_001284409.1	D: ATGGAGAACAACAAAACCTCAGT	(Liu et al. 2020)
		R: TTGCTCCCATGTATGGTCTTTAC	

Tabla 2. Criterios técnicos de aceptación, validados en esta tesis para el diseño de cebadores empleados en la técnica de RT-qPCR (adaptado de Bustin et al. (2009); Rodríguez et al. (2015)).

Criterio técnico del cebador	Rango aceptado
Contenido de guanina y citosina (GC)	30 - 65%
Temperatura de desnaturalización (T_m)	58 - 65 °C
Diferencias de T_m entre el par de cebadores	< 5 °C
Longitud del oligonucleótido	15 - 30 nucleótidos
Longitud del producto de amplificación	50 - 150 pb
Formación de homodímeros, heterodímeros y horquillas	$\Delta G > -9$ kcal/mol
Localización de los cebadores en la secuencia génica	Abarca intrones

PCR gradiente en tiempo final

Se llevó a cabo PCR a tiempo final para evaluar el correcto funcionamiento de los cebadores. La muestra seleccionada para llevar a cabo esta reacción fue la correspondiente a un animal tratado con la condición control (grupo HH). Se preparó una mezcla que incluyó cebadores directo y reverso, *PowerTrack™ SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)*, el cual contiene todos los elementos necesarios para realizar la reacción de amplificación y agua. La reacción se llevó a cabo en un termociclador y para cada temperatura que se evaluó, se prepararon dos tubos: uno que contenía 9 µl del mezcla mencionado y 1 µl de ADNc, y un control negativo que contenía igual volumen de mezcla y 1µl de agua. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos que incluyen 40 segundos a 95°C, 45 segundos a la temperatura adecuada para cada producto de amplificación, y 30 segundos de elongación a 72°C, finalizando con un paso de elongación adicional de 30 segundos a 72°C.

Con el objetivo de determinar la temperatura óptima para cada par de cebadores, se realizó un gradiente térmico utilizando las temperaturas de desnaturalización calculadas a

partir del paquete de programas BLAST del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Este gradiente incluyó tres temperaturas: una correspondiente a la temperatura de desnaturalización indicada y dos adicionales, una ligeramente superior y otra inferior. Además, se evaluó la concentración óptima para cada par de cebadores, probando diferentes concentraciones (0,4µM; 2,5µM; 5µM; 10µM).

Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 2% para estimar los tamaños aproximados de los productos obtenidos para cada par de cebadores. La observación de las bandas se realizó mediante un transiluminador UV y de esta forma, se eligió la temperatura y concentración óptima para realizar la PCR a tiempo real.

PCR cuantitativa

Condiciones de reacción

La cuantificación de la expresión génica se realizó mediante PCR en tiempo real. Los ensayos se llevaron a cabo en un volúmen final de 10 µl, que contenía 1 µl de ADNc obtenido por transcripción reversa, 0,5 µl de la mezcla de cebadores (directo y reverso), 3,5 µl de H₂O, y 5 µl de *PowerTrack™ SYBR Green Master Mix*. Las reacciones se realizaron en un termociclador Corbett Research RG-6000 y se empleó la concentración 2,5 µM para cada par de cebadores. El programa de amplificación incluyó una desnaturalización inicial de 10 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a la temperatura correspondiente a la temperatura de hibridación para cada par, y una elongación de 30 segundos a 72°C. Después del ciclo final de la qPCR, se llevó a cabo una curva de disociación para evaluar los productos específicos amplificados así como también la posible formación de dímeros mediante su análisis en un rango de temperaturas de 60 a 95 °C. Para la primera cuantificación de la expresión génica relativa, se realizaron tres réplicas técnicas.

Los datos de la reacción se recopilaron y analizaron utilizando el software Rotor-Gene 6000 System (Corbett Life Science, Sydney, Australia). Se estableció manualmente el umbral de detección a 0,0135 unidades de fluorescencia. El ciclo en el que la fluorescencia alcanza dicho umbral se denomina ciclo umbral o threshold cycle (Ct) y es inversamente proporcional a la cantidad de ADN original presente en la muestra.

Determinación de la eficiencia

La eficiencia de amplificación de cada par de cebadores está definida como la capacidad de duplicar el número de copias de ADN en cada ciclo (Bustin y Nolan 2004). La obtención de dicho valor se realizó a partir de las curvas de la amplificación de diluciones seriadas de una muestra de ADNc, cuya calidad de ARN era óptima. El ensayo incluyó dos réplicas técnicas de cada muestra y dos del control negativo (sin ADNc), para asegurar la no contaminación ni amplificación inespecífica en los reactivos. Las curvas estándar se realizaron con los valores de Ct obtenidos en función del logaritmo de la concentración del ADNc y partir de la pendiente se determinó la eficiencia utilizando la siguiente ecuación:

$$E = 10^{(-1/pendiente)} - 1$$

Ecuación 1. Cálculo de eficiencia, siendo E la eficiencia de par de cebadores.

Cuantificación en un muestreo extendido

Una vez determinadas las condiciones ideales, se realizó la cuantificación de la expresión génica, con 2 animales por cada condición experimental (n=8). Las condiciones utilizadas para los cebadores fueron las determinadas en la prueba inicial y las muestras se analizaron por triplicado.

Análisis de los niveles de expresión

El análisis de los resultados obtenidos mediante RT-qPCR se realizó utilizando el método de expresión génica relativa propuesto por Livak y Schmittgen (2001). Este método se basa en la cuantificación relativa de los niveles de expresión de los genes de interés (*BAX*, *BCL2* y *CASP3*) en comparación con el gen de referencia (*GAPDH*). La cuantificación se centra en la determinación del valor Ct de cada muestra, una vez establecido el límite de detección mínima mediante la línea base o umbral. En el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, el valor de ΔCt se obtiene restando la media de los valores Ct del gen de referencia a la media de los valores Ct del gen problema: $\Delta Ct = Ct(\text{gen problema}) - Ct(\text{gen referencia})$. El valor de $\Delta\Delta Ct$ se obtiene restando a cada uno de los valores ΔCt el valor de ΔCt de una muestra de referencia, obteniendo así el relativo de las demás: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{muestra}) - \Delta Ct(\text{muestra referencia})$. Finalmente, la expresión relativa de los genes problema se calcula utilizando la fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Modificación de las condiciones de ciclado

Los resultados preliminares llevaron a modificar las condiciones determinadas inicialmente de la siguiente forma: la desnaturalización inicial se redujo a 2 minutos a 95 °C, seguida de 40 ciclos de 5 segundos a 95 °C y 30 segundos a la temperatura de hibridación específica para cada par de cebadores. Se omitió la etapa de extensión para permitir la hibridación y extensión instantánea de los cebadores.

Selección de nuevos cebadores

Por los resultados obtenidos, en una segunda etapa se seleccionaron nuevos cebadores en base a dos estrategias: una búsqueda bibliográfica priorizando que fueran ampliamente utilizados en la literatura científica, y que cumplieran con los criterios de evaluación establecidos en esta tesis para garantizar su efectividad. En caso de no encontrarse cebadores que cumplieran con los criterios establecidos, se procedió a diseñarlos utilizando el software Primer Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Previo a la síntesis de los oligonucleótidos, se llevó a cabo una evaluación *in silico* para asegurar que cumplieran con todas las características necesarias para un análisis adecuado de la expresión génica mediante RT-qPCR.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la integridad, concentración y pureza de ARN

La obtención de ARN a partir de un único ovario congelado y sin disgregar de animales correspondientes a los grupos controles y tratados resultó en una baja integridad, reflejada por una clara degradación evidenciada por bandas difusas o la ausencia de bandas en el análisis electroforético (Fig. 6A). Además, los valores de concentración de ARN fueron más bajos de los esperados ($29,0 \pm 3,1$ ng/ μ L). Este resultado puede explicarse por la naturaleza fibrosa del ovario, lo que dificulta la extracción, y por la cantidad limitada de tejido disponible, lo que reduce el rendimiento de ARN obtenido. En contraste, la extracción de ARN a partir de dos ovarios con disgregación previa al congelamiento resultó en una mejora significativa en la integridad, demostrada por la presencia de bandas bien definidas correspondientes a los ARN ribosomales 28S y 18S (Fig. 6B), y una mayor concentración de ARN ($140,3 \pm 9,6$ ng/ μ L). Este cambio puede ser atribuido al uso de una mayor cantidad de material biológico inicial y la disgregación previa a la congelación de las muestras a -80°C , lo cual mejoró la eficiencia del proceso de extracción de ARN. Es destacable el buen rendimiento en cuanto a la concentración de ARN obtenida, especialmente considerando que se trata de un tejido con abundante material fibroso, lo que dificulta la extracción. En el gel se constató la ausencia de ADN genómico.

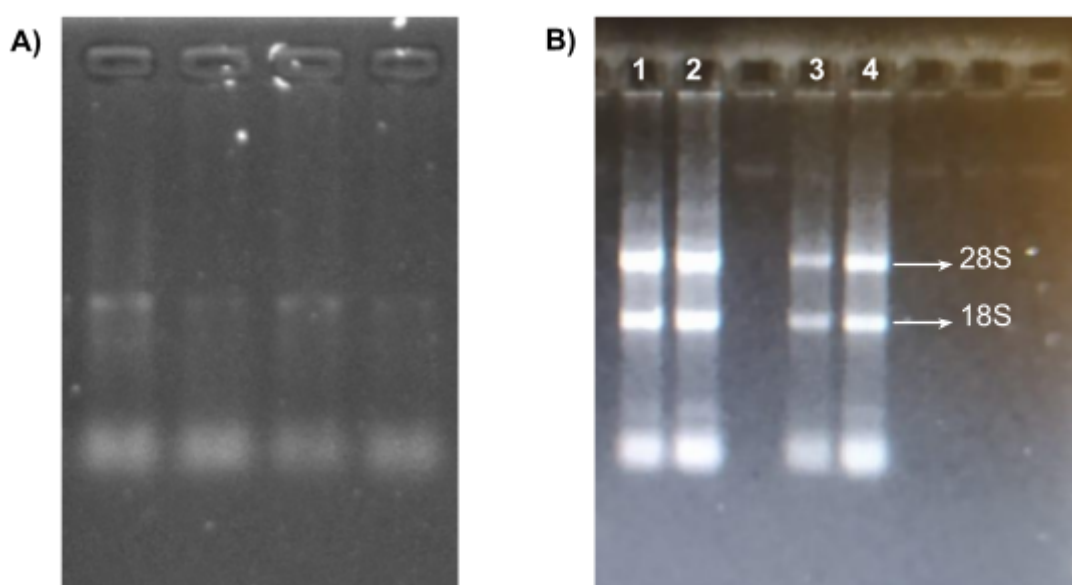


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para evaluar la integridad del ARN. A) Cuatro muestras de ARN obtenidas a partir de un ovario. B) Cuatro muestras de ARN (1-4) obtenidas a partir de dos ovarios cada una. Se muestran las bandas correspondientes a los ARNr 28S y 18S.

A partir de los resultados obtenidos, se decidió trabajar con el ARN extraído a partir de dos ovarios, al cual se le evaluaron los índices de pureza mediante medidas de absorbancia para descartar posibles contaminaciones. Las medias de dichos índices fueron $1,98 \pm 0,008$ para la relación Abs 260/280 y $1,80 \pm 0,040$ para la relación Abs 260/230. Los resultados de la primera relación de absorbancias se encuentran dentro de los rangos aceptados, indicando la ausencia de contaminación por polisacáridos o proteínas durante el proceso de extracción. Sin embargo, se observó una ligera disminución en la relación de absorbancia 260/230 nm, lo cual podría explicarse por la presencia de algún contaminante como fenoles, pero que es algo esperable dado el método de extracción utilizado. Estos resultados sugieren que la extracción fue efectiva y que el ARN obtenido es de calidad suficiente para su uso en experimentos posteriores.

Evaluación de los pares de cebadores

Se evaluaron *in silico* los cebadores correspondientes al gen de referencia y a los genes de interés para conocer criterios técnicos que resultan importantes para asegurar óptimos resultados en la reacción. Además, se determinaron las condiciones térmicas de la reacción y las concentraciones más adecuadas para cada par de cebadores. Los resultados del análisis se detallan en la Tabla 3. El par de cebadores correspondientes a *GAPDH* de rata (*Rattus norvegicus*) fue el primer gen de referencia probado, debido a su disponibilidad en el laboratorio. En una prueba *in silico* realizada con el programa BLAST del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se encontró que el cebador directo presenta complementariedad completa con la secuencia genética en ratón, mientras que el cebador reverso no muestra complementariedad en seis bases (ver Fig. A1). Se decidió proceder con su evaluación experimental.

Tabla 3. Características de los distintos cebadores obtenidas de la evaluación *in silico*.

Gen	T_m^a (°C)	LC ^b (pb)	% GC ^c	LP ^d (pb)	ΔG^e (kcal/mol)	Sitio de hibridación	Tipo de cebador
GAPDH (rata)	D: 59.7	21	52	88	> -9	Exón 3	Dentro de un exón
	R: 58.3	21	52				
GAPDH (ratón)	D: 59.1	24	46	266	< -9	Exones 5 - 6	Abarca intrones
	R: 60.6	19	53				
BAX	D: 55.6	20	55	140	<-9	Exones 2 - 3	Abarca intrones
	R: 57.5	19	58				
BCL2	D: 57.7	20	60	284	> -9	Exón 1	Dentro de un exón
	R: 58.2	20	60				
CASP3	D: 54.7	23	39	74	> -9	Exones 2 - 3	Abarca intrones
	R: 54.8	23	43				

^a Temperatura de desnaturalización; ^b Longitud del cebador; ^c Porcentaje del contenido en guanina y citosina; ^d Longitud del producto de amplificación; ^e Energía libre de Gibbs.

La longitud de las secuencias nucleotídicas de los cebadores osciló entre 19 y 24 nucleótidos, lo cual favorece la unión específica a las secuencias del gen en estudio.

En cuanto al tamaño del producto de amplificación, dos de los productos de los cebadores para *GAPDH* (ratón) y *BCL2* superan los 150 pb (Tabla 3). Sin embargo, esto no debería necesariamente interferir en el análisis, ya que se ha observado que los productos de amplificación que afectan negativamente la eficiencia de la reacción de qPCR son aquellos cercanos y mayores a 400 pb (Toouli et al. 2000).

El contenido de GC de cada cebador se encontró dentro del rango aceptado, lo que descarta posibles problemas de amplificación relacionados con la probabilidad de hibridación entre los cebadores.

El análisis en cuanto a la formación de homodímeros, heterodímeros y estructuras de horquillas de los pares de cebadores seleccionados mostró que las dimerizaciones más probables tenían valores de energía libre de Gibbs mayores que -9 kcal/mol, con excepción

de los genes *BAX* y *GAPDH* (ratón), que presentaron sólo una estructura con valores de ΔG más negativos de lo esperado. Además, se observó que ninguno de los cebadores tenía la posibilidad de formar horquillas.

El análisis de la localización de los cebadores para los genes *GAPDH* (ratón), *BAX* y *CASP3* mostró que éstos se extienden entre dos exones, separados por intrones, mientras que para *GAPDH* (rata) y *BCL2* los cebadores directos y reversos se ubican en un mismo exón. La característica para los tres primeros pares de cebadores asegura la precisión y especificidad del análisis de expresión génica, permitiendo una identificación clara y sin ambigüedades de los productos de PCR, ya que no amplifica el ADN genómico, lo que no puede ser asegurado para el caso de *BCL2* ni para *GAPDH* (rata). El tratamiento con ADNasa busca eliminar la posible contaminación por ADN genómico, reduciendo así la probabilidad de amplificarlo. Esta evaluación *in silico* indicó que algunos pares de cebadores no cumplían estrictamente con todos los criterios establecidos en la guía MIQE.

Para el análisis de las concentraciones óptimas de los cebadores necesarias para la mezcla de reacción de qPCR se probó una concentración de 0,4 μM tanto para el cebador directo como para el cebador reverso, como sugiere el protocolo de la enzima (*PowerTrack™ SYBR Green Master Mix*), pero no se logró visualizar en la corrida electroforética ningún producto de amplificación correspondiente a los genes en estudio. En base a estos resultados, se procedió a probar concentraciones mayores, incluyendo 10 μM , 5 μM y 2,5 μM . La formación del producto de amplificación para los genes *BAX*, *BCL2*, *CASP3* y *GAPDH* (rata) se observa en la Figura 7. Además, se observó la presencia de dímeros de cebadores, a pesar de que algunos de los cebadores mostraban valores de ΔG que no indicarían esta posibilidad. En base a estos resultados, se decidió utilizar la concentración más baja probada (2,5 μM) para todos los cebadores, ya que resultó ser efectiva para los genes en estudio y ayuda a minimizar la formación de estructuras secundarias, contribuyendo a una mejor eficiencia en la reacción de RT-qPCR. Para el gen *GAPDH* (ratón), sólo se probó una concentración de 2,5 μM , ya que esta concentración había demostrado ser efectiva para los genes anteriores.

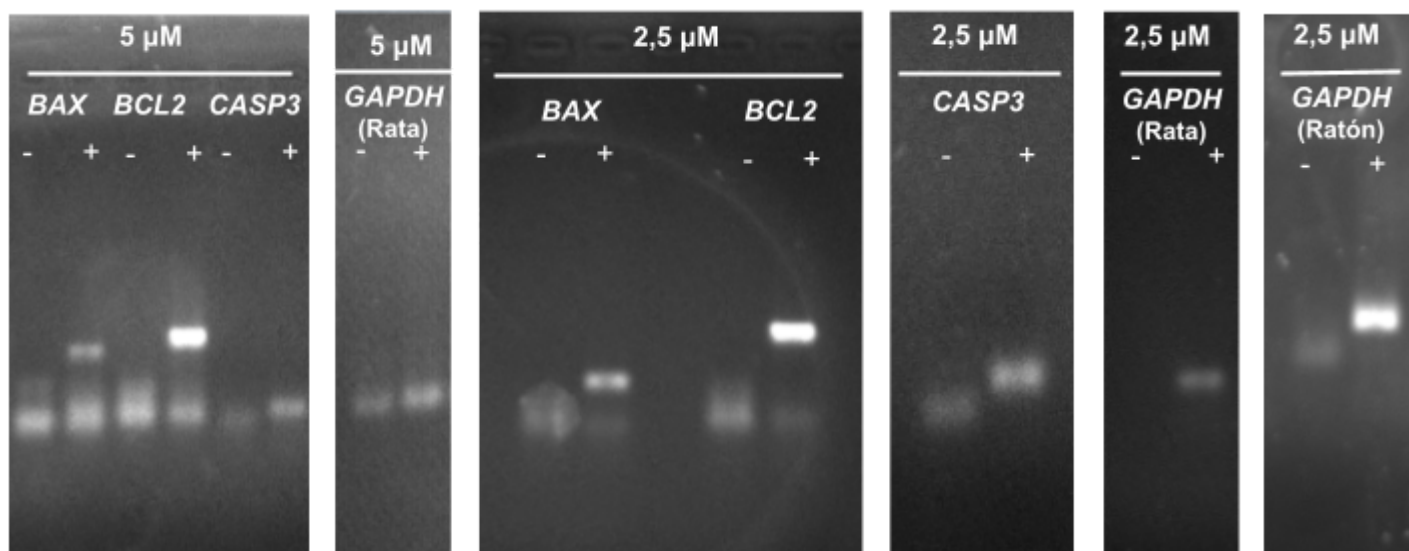


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos con distintas concentraciones de cebadores: 5 μ M para los pares de cebadores *BAX* y *BCL2*; 2,5 μ M para *BAX* y *BCL2*, *CASP3* y *GAPDH* (uno de rata y otro de ratón). Se utilizaron muestras con y sin ADNc (-, +) para cada uno de los genes.

Para evaluar la temperatura óptima de la reacción se realizó una PCR gradiente en tiempo final para los cebadores de *BAX*, *BCL2* y *CASP3* a la concentración determinada previamente. Se probaron las temperaturas 55,3°C; 56,8°C y 58,5°C para *BAX* y *BCL2*, y 54°C; 55,3°C y 56,8°C para *CASP3*, seleccionadas en base a las temperaturas de desnaturalización detalladas en la Tabla 3. Para el gen *GAPDH* (rata) se probó la temperatura de 55°C. En el caso de *GAPDH* (ratón) se probó a 58°C ya que fue la temperatura que funcionó para el resto de los genes evaluados. La evaluación se realizó mediante la visualización de los productos de amplificación en gel de agarosa como se muestra en la Figura 8.

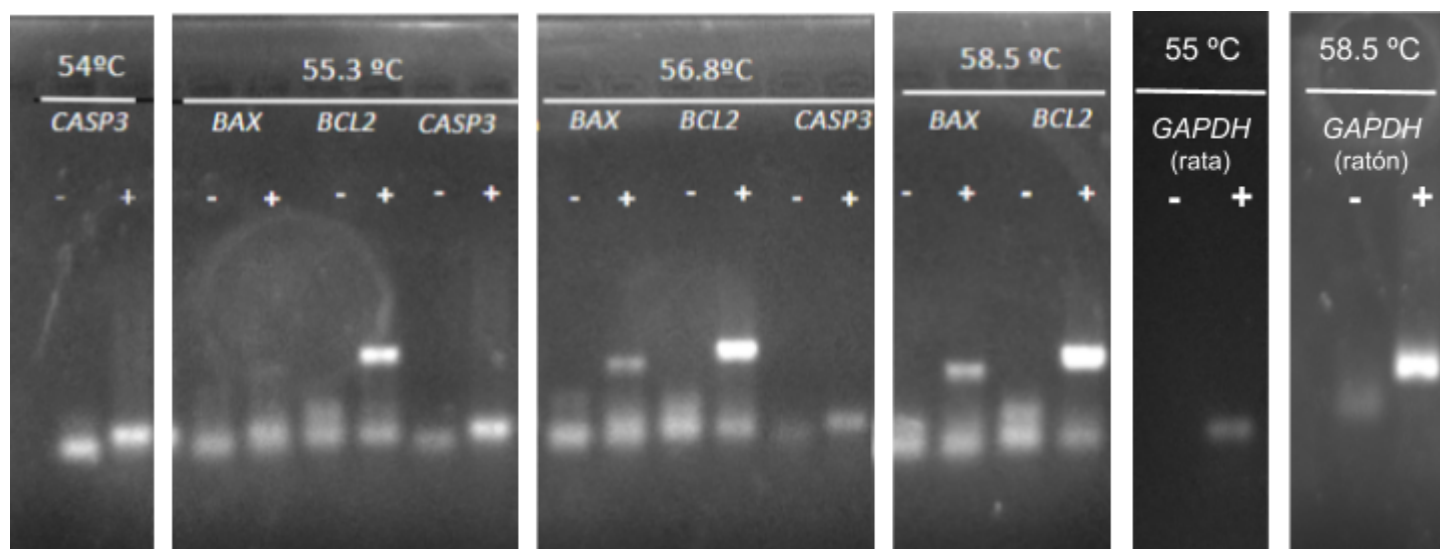


Figura 8. Evaluación de diferentes temperaturas de desnaturalización para los genes *BAX*, *BCL2* y *CASP3*. Se probaron tres temperaturas distintas para cada gen: 54°C; 55,3°C y 56,8°C para *CASP3*; 55,3°C; 56,8°C y 58,5°C para *BAX* y *BCL2*; 55°C para *GAPDH* (rata) y *GAPDH* 58,5°C (ratón).

Los cebadores para el gen *CASP3* mostraron ser más efectivos a la temperatura de 56,8 °C. Para el gen *BAX*, la mejor amplificación se logró a las temperaturas de 56,8 °C y 58,5 °C, mientras que a 55,3 °C no se obtuvo el producto de interés, como se visualizó en el carril (+). El gen *BCL2* resultó ser efectivo a todas las temperaturas evaluadas. Por su parte, el gen *GAPDH* demostró ser eficaz a las temperaturas evaluadas, tanto para el que procede de rata como el de ratón. La selección de la temperatura óptima para realizar la reacción de RT-qPCR fue la más alta dentro del rango efectivo para cada par de cebadores como se detalla en la Tabla 4. Esta elección se basó en la necesidad de mejorar la especificidad de la reacción, ya que las temperaturas más altas reducen la formación de dímeros de cebadores y amplificación de productos inespecíficos (Khrapko 2006).

Tabla 4. Temperaturas óptimas seleccionadas para la amplificación de cada gen en estudio.

Cebador	<i>T_m</i> (°C)
<i>GAPDH</i> (rata)	55
<i>GAPDH</i> (ratón)	58
<i>BAX</i>	58
<i>BCL2</i>	58
<i>CASP3</i>	56

Eficiencia de cebadores

Las curvas de amplificación, a partir de las cuales se obtuvieron los valores de Ct correspondientes a diluciones seriadas por duplicado de una de las muestras de ADNc, se presentan junto con sus respectivas curvas de disociación en la Figura 9. Estas curvas se presentan con el fin de ejemplificar, en una de las diluciones, que los duplicados ofrecen valores consistentes, un aspecto crucial para asegurar la reproducibilidad de los datos. Los resultados fueron satisfactorios en este sentido. Además, en las curvas de disociación se observa que para todos los genes se obtuvo un único pico que corresponde al producto amplificado de interés. Esta observación es indicativa de una amplificación específica y eficiente del objetivo deseado. Sin embargo, se identificaron excepciones en los genes *BAX* y *GAPDH* (rata). Para el gen *BAX*, se observaron dos picos con valores de fluorescencia que sugiere amplificación de dímeros de cebador, ya que aparece a menor temperatura. Este resultado es consistente con los hallazgos obtenidos en el gel de agarosa (ver Fig.7 y Fig.8). En el caso del gen *GAPDH* (rata), se observaron picos adicionales con menor fluorescencia en comparación con el del producto de amplificación en cuestión, indicando también la presencia de amplificaciones no deseadas.

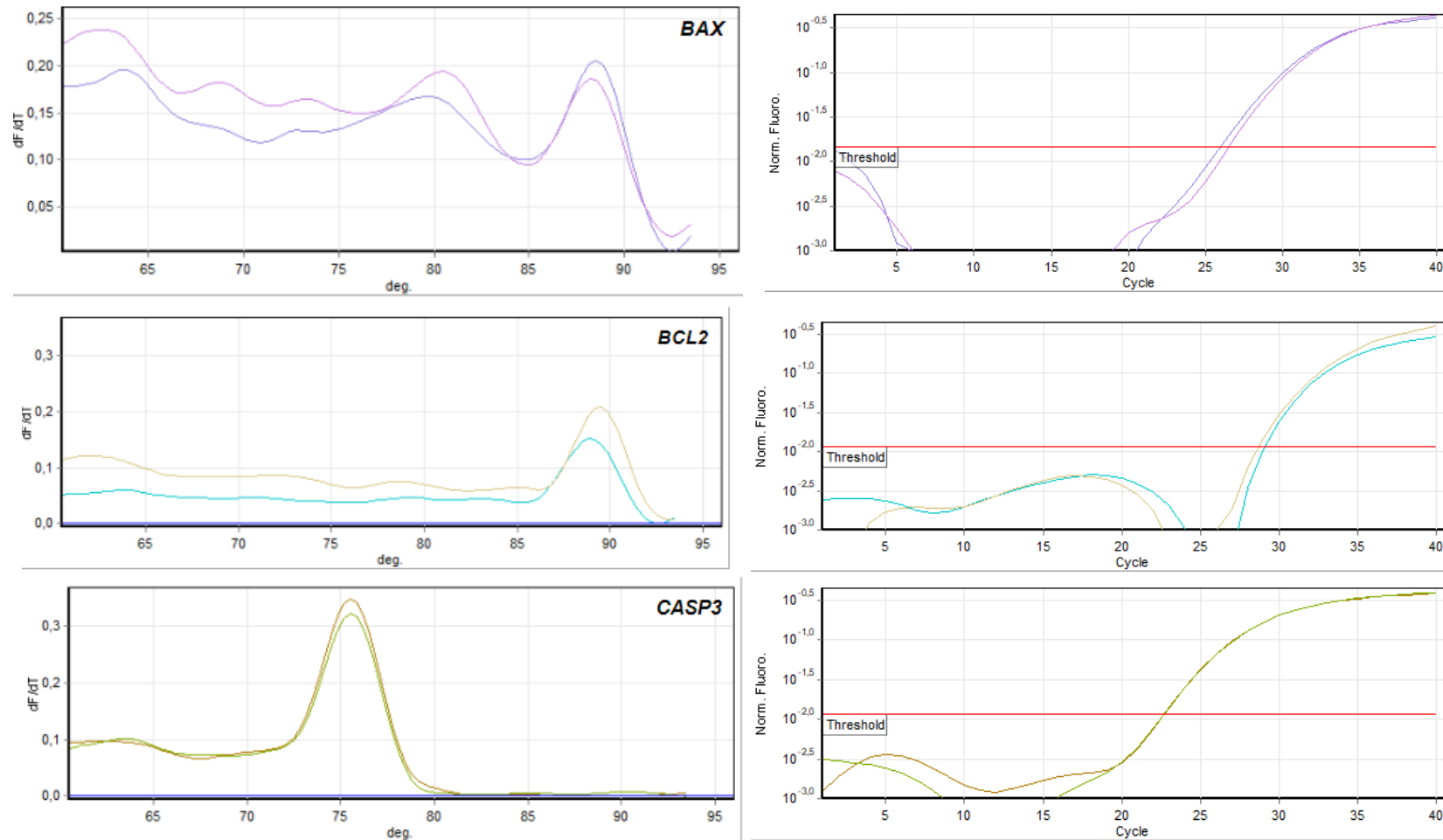


Figura 9. Curvas de amplificación (representación logarítmica) donde se grafica la fluorescencia en función del número de ciclos (derecha), junto con las respectivas curvas de disociación (izquierda), donde se grafica la fluorescencia en función de la temperatura. Estas curvas se ejemplifican con sólo una de las diluciones seriadas del ADNc para los genes *BAX*, *BCL2*, *CASP3* y *GAPDH* (ratón), *GAPDH* (rata).

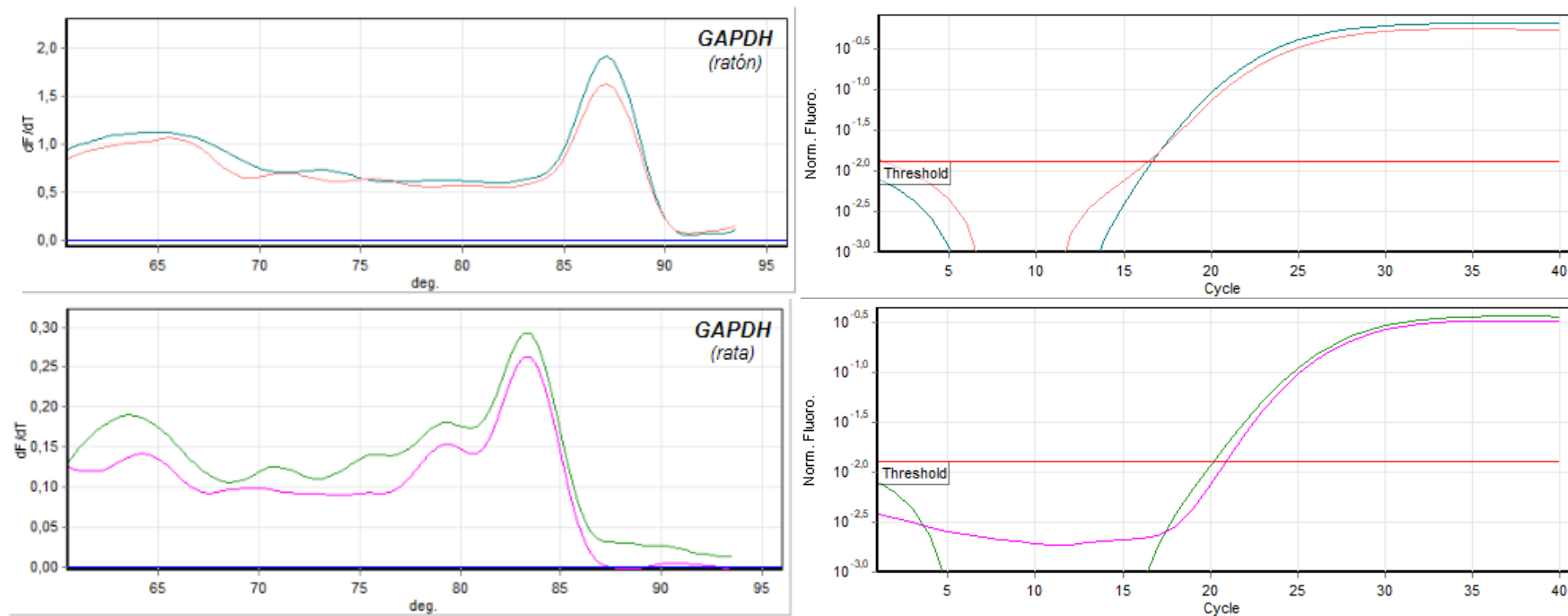


Figura 9 (cont.). Curvas de amplificación (representación logarítmica) donde se grafica la fluorescencia en función del número de ciclos (derecha), junto con las respectivas curvas de disociación (izquierda), donde se grafica la fluorescencia en función de la temperatura. Estas curvas se ejemplifican con sólo una de las diluciones seriadas del ADNc para los genes *BAX*, *BCL2*, *CASP3* y *GAPDH* (ratón), *GAPDH* (rata).

La curva estándar, que grafica los valores de Ct obtenidos de las curvas de amplificación anteriores en función del logaritmo de la concentración del ADNc amplificado para cada par de cebadores, se presenta en la Figura 10. A partir de la pendiente de estas curvas, se calcularon las eficiencias correspondientes utilizando la Ecuación 1. Los resultados se detallan en la Tabla 5.

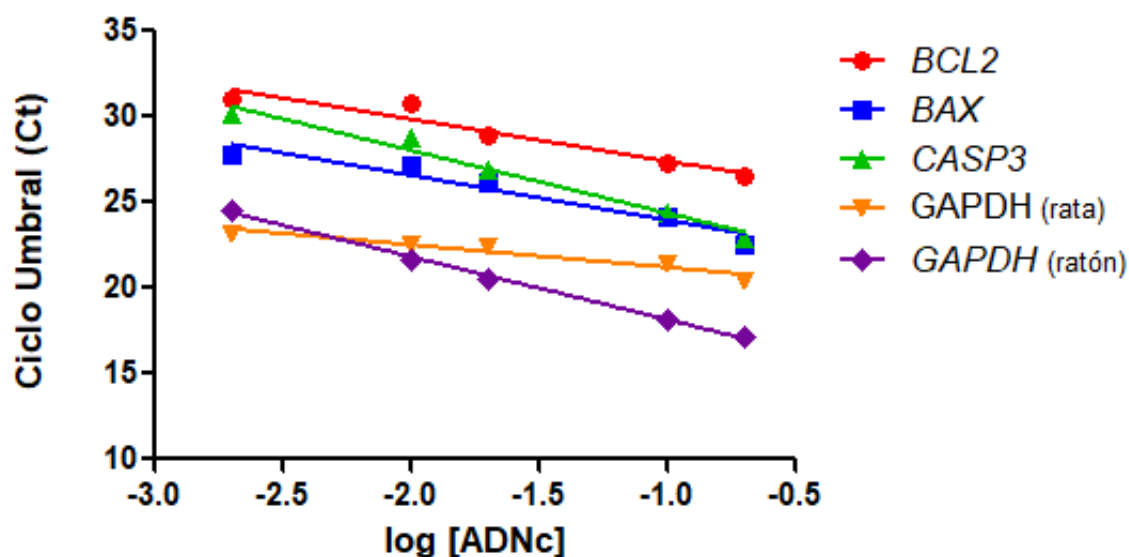


Figura 10. Curvas estándar que representan los valores de Ct en función del logaritmo de la concentración de ADNc para cada par de cebadores analizados, junto con sus respectivas líneas de tendencia. El círculo rojo corresponde a *BCL2*, los cuadrados azules a *BAX*, y los triángulos verdes y naranjas a *CASP3* y *GAPDH* (rata), respectivamente. El rombo violeta representa *GAPDH* (ratón).

Tabla 5. Valores de pendiente y de eficiencias obtenidas para cada gen.

Cebadores	Pendiente	Eficiencia (E)	% E
<i>BCL2</i>	-3,0528	2,12	112
<i>BAX</i>	-3,4312	1,96	96
<i>CASP3</i>	-3,6653	1,87	87
<i>GAPDH</i> (rata)	-1,951	3,25	225
<i>GAPDH</i> (ratón)	-3,4078	1,96	96

El valor de eficiencia ideal es del 100%, y un valor menor al 90% o mayor al 110% no se considera adecuado (Kubista et al. 2006). Los valores de eficiencia obtenidos para *BAX* y *GAPDH* (ratón) se encontraron dentro del rango aceptado, mientras que los valores para *BCL2* y *CASP3* mostraron ligeras desviaciones. Es importante destacar que la buena eficiencia obtenida para el gen *BAX* no fue coherente con los resultados observados en las curvas de disociación, donde se ven señales de fluorescencia compatibles con dímeros de oligonucleótidos (Figura 9). En cuanto a la eficiencia para *GAPDH* (rata) resultó ser significativamente mayor de lo esperado, lo cual confirma las observaciones realizadas en las curvas de disociación. Estas curvas sugieren amplificación de productos inespecíficos, lo que indica que el par de cebadores utilizado, diseñado para *GAPDH* de rata, no es recomendable para la amplificación del gen en ratón. Por tal motivo, en adelante, el gen *GAPDH* de ratón fue utilizado en este trabajo como gen de referencia para el análisis en las muestras de estudio.

Estudio de la expresión de los genes mediante RT-qPCR

Después de optimizar la técnica de RT-qPCR, se procedió a validarla mediante el estudio de la expresión génica en muestras de ovarios de ratonas adultas jóvenes de un grupo de animales sometidos a distintos tratamientos (n=4, con 1 muestra por grupo). En la Figura 11 se presentan las curvas de amplificación y sus respectivas curvas de disociación para cada uno de los genes analizados. Se incluye un ejemplo de una de las muestras para demostrar la consistencia entre los duplicados en las curvas de amplificación y la amplificación específica del producto deseado, sin señales de amplificaciones inespecíficas.

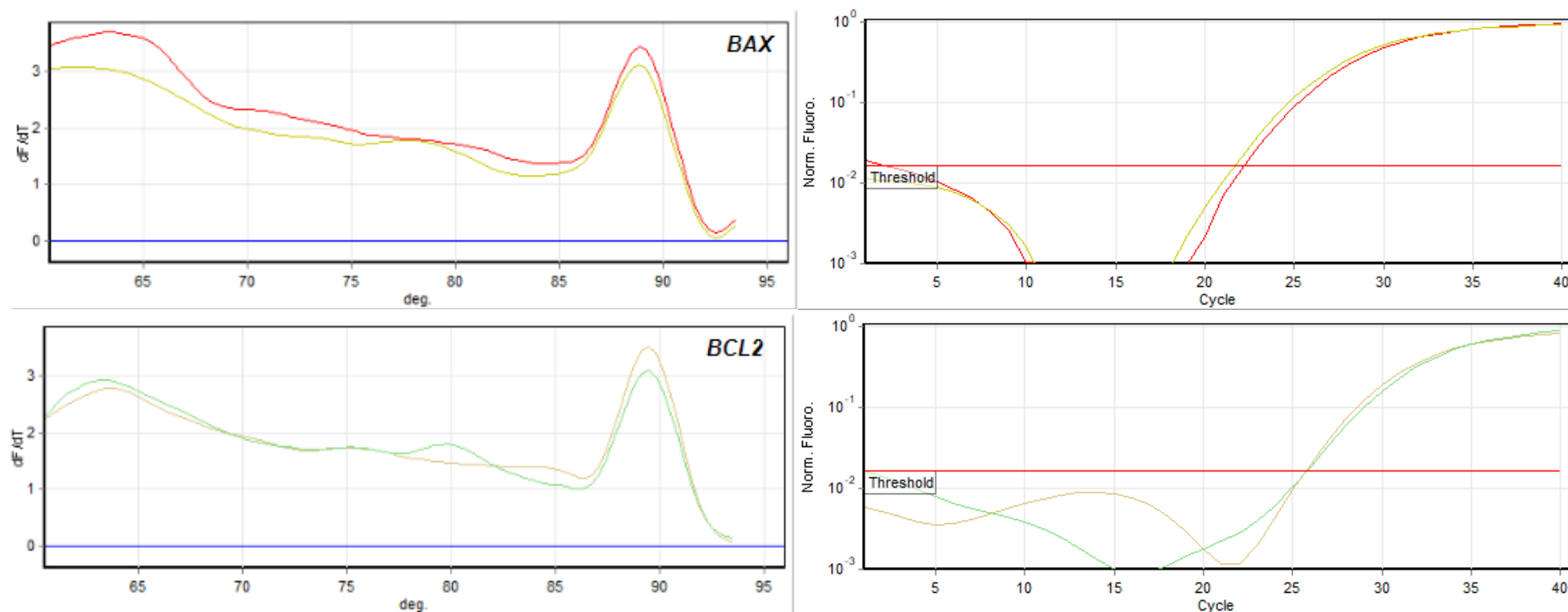


Figura 11. Curvas de amplificación (representación logarítmica, que grafican la fluorescencia en función del número de ciclos, junto con las respectivas curvas de disociación, donde se grafica la fluorescencia en función de la temperatura. Estas curvas se ejemplifican con una sola muestra para los genes *BAX*, *BCL2*, *CASP3* y *GAPDH* (ratón).

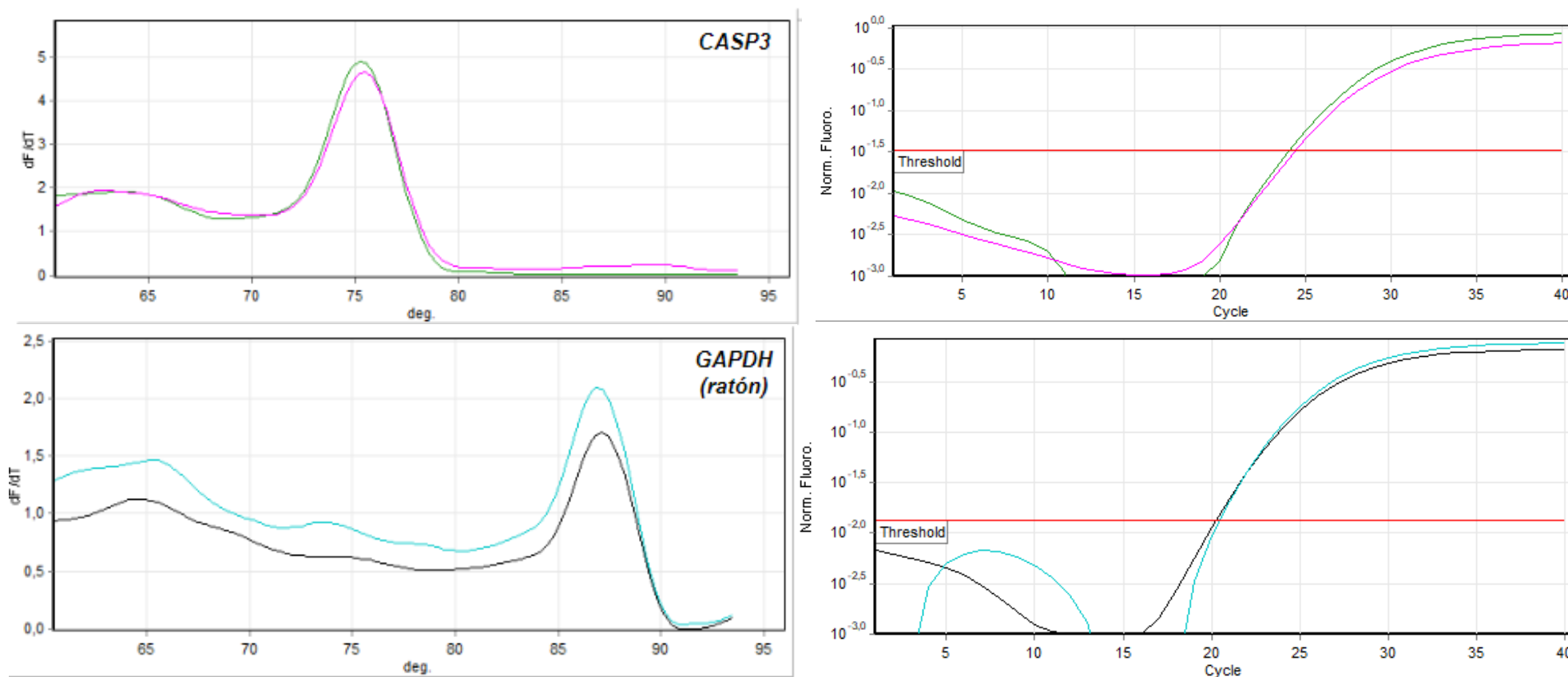


Figura 11 (cont.) Curvas de amplificación (representación logarítmica, que grafican la fluorescencia en función del número de ciclos, junto con las respectivas curvas de disociación, donde se grafica la fluorescencia en función de la temperatura. Estas curvas se ejemplifican con una sola muestra para los genes *BAX*, *BCL2*, *CASP3* y *GAPDH* (ratón).

A partir de los valores de Ct obtenidos, se calculó el cambio en el nivel de expresión o *fold change* por el método de Livak y Schmittgen (2001) para cada gen bajo diferentes condiciones experimentales. Los resultados se presentan en la Figura 12. Se espera que en los animales tratados con vincristina y agua, la expresión de los genes *BAX* y *CASP3* aumente en comparación con la condición control (agua-vehículo), mientras que la expresión del gen antiapoptótico *BCL2* disminuya, favoreciendo así la activación de procesos apoptóticos. Por otro lado, en los animales tratados con vincristina y DCA, se espera que los genes proapoptóticos (*BAX* y *CASP3*) presenten una menor expresión respecto a la condición control, y que la expresión de *BCL2* se incremente. Esto indicaría que el modulador mitocondrial podría mitigar los efectos gonadotóxicos inducidos por la vincristina, favoreciendo la supervivencia celular en el tejido ovárico.

Aunque el tamaño de la muestra fue limitado (n=4), los datos obtenidos resultaron útiles para validar la funcionalidad de la técnica. Sin embargo, debido al número reducido de muestras, no es posible obtener conclusiones sobre los efectos de los distintos tratamientos.

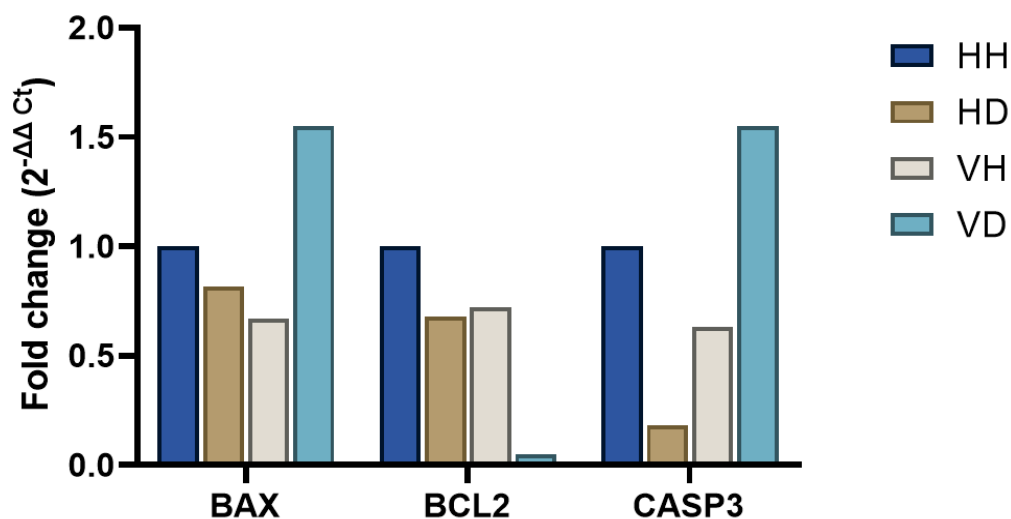


Figura 12. Expresión de los genes *BAX*, *BCL2* y *CASP3* en las diferentes condiciones experimentales: agua - vehículo (HH), vincristina - agua (VH), agua - DCA (HD), vincristina - DCA (VD). Todos los valores están normalizados respecto al gen de referencia (*GAPDH*) y al grupo control (HH) cuyo valor de referencia es 1.

El análisis de expresión en muestreo más extendido (n=8, con 2 muestras por grupo), utilizando los cebadores para *GAPDH*, *BAX* y *CASP3*, mostró resultados sin reproducibilidad dentro del ensayo ni en comparación con la primera cuantificación. Los valores de Ct, indicaron una amplificación tardía, y las curvas de disociación mostraron que no se obtuvo la correcta amplificación del producto de interés. Además, se detectaron picos correspondientes a productos inespecíficos, lo que indica la formación de dímeros de cebadores (Figura 13), que no aparecían en las pruebas anteriores. La ineficiencia de los cebadores pone de manifiesto que, a pesar de haber sido ya empleados en otros trabajos, el no seguimiento de los criterios de la guía MIQE puede afectar su eficiencia y, por consecuencia, la cuantificación de la expresión génica, lo cual se evidencia en este análisis.

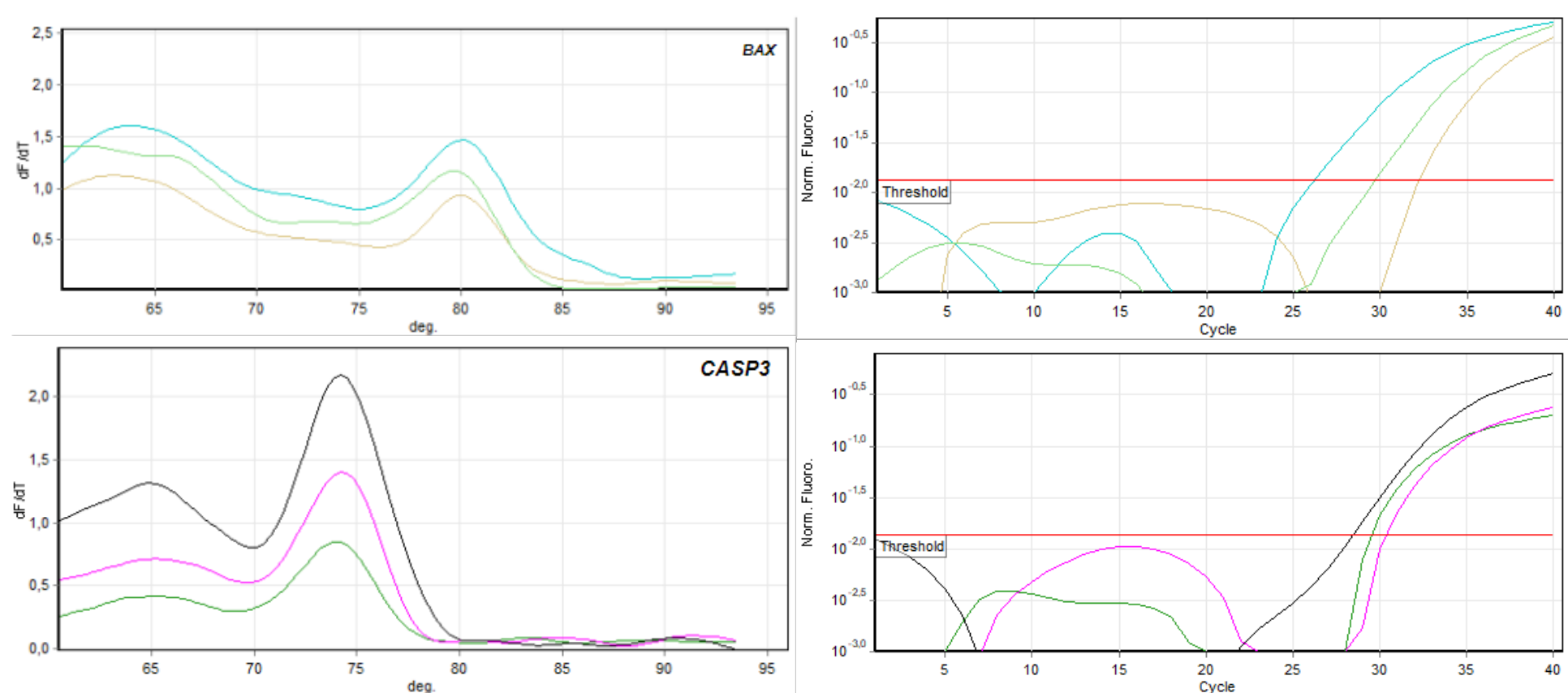


Figura 13. Curvas de amplificación (representación logarítmica, que grafican la fluorescencia en función del número de ciclos, junto con las respectivas curvas de disociación, donde se grafica la fluorescencia en función de la temperatura. Estas curvas se ejemplifican con una sola muestra para los genes *BAX*, *CASP3* y *GAPDH* (ratón).

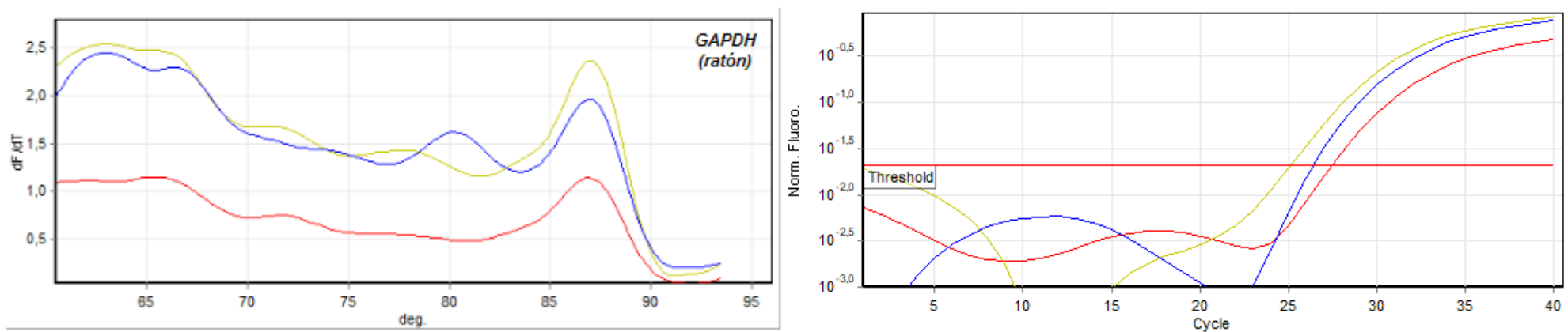


Figura 13 (cont.) Curvas de amplificación (representación logarítmica, que grafican la fluorescencia en función del número de ciclos, junto con las respectivas curvas de disociación, donde se grafica la fluorescencia en función de la temperatura. Estas curvas se ejemplifican con una sola muestra para los genes *BAX*, *CASP3* y *GAPDH* (ratón).

Se repitieron los ensayos, pero nuevamente se obtuvieron datos inconsistentes, lo que impidió calcular con precisión el cambio en los niveles de expresión génica. Como consecuencia, se modificaron las condiciones de ciclado. Sin embargo, a pesar de estos ajustes, no se logró mejorar ni la reproducibilidad ni la especificidad de la amplificación de la secuencia de interés. Una posible explicación para esta inconsistencia es que las condiciones de ciclado no resultaron adecuadas para la extensión de productos de amplificación mayores a los recomendados por el protocolo de la enzima utilizada en la reacción de qPCR (150 pb), como podría ser el caso de *GAPDH*. Dado que los ARN utilizados demostraron ser óptimos en cantidad e integridad, es poco probable que la baja eficiencia de la PCR se deba a una calidad insuficiente de ARN. Respecto a las amplificaciones inespecíficas observadas en las curvas de disociación, estas podrían ser el resultado de la amplificación de dímeros de cebadores o de ADN genómico. A pesar de haberse descartado teóricamente durante la evaluación previa de los cebadores, algunos parecen estar formando dímeros de cebadores, lo cual disminuye su eficiencia en la reacción. La confirmación de cualquiera de estas posibilidades debería realizarse mediante electroforesis en gel de agarosa.

La imposibilidad de reproducir buenas eficiencias de amplificación en los amplicones seleccionados al aumentar el número de muestras, se debe muy probablemente a un diseño subóptimo de los cebadores elegidos. Por lo tanto, se decidió elegir y diseñar nuevos cebadores que cumplan estrictamente los criterios MIQE. Se eligió utilizar *ACTB* como nuevo gen de referencia, ampliamente utilizado y efectivo en el estudio de expresión en el tejido ovárico humano y de ratón (Yuan et al. 2015, Ofinran et al. 2016). Los cebadores elegidos para el gen de referencia *ACTB* y para el gen *BAX* fueron seleccionados de la bibliografía, ya que son comúnmente utilizados y cumplen con los criterios de evaluación establecidos en esta tesis, lo cual fue confirmado *in silico*. En el caso del gen *BCL2*, se optó por diseñar nuevos cebadores, ya que no se encontró en la bibliografía consultada ninguno que abarcara diferentes exones (Tablas 6 y 7). Para el gen *CASP3*, se decidió no buscar nuevos cebadores, dado que el par disponible cumplía con todos los criterios establecidos. Estos cebadores serán probados en el laboratorio para evaluar su eficiencia de amplificación.

Tabla 6. Secuencia nucleotídica de los pares de cebadores correspondientes a los genes *ACTB*, *BAX*, *BCL2* con sus respectivas referencias bibliográficas.

Gen	Accession Number	Cebador 5'-3'	Referencias
ACTB	NM_007393.5	D:GGCTGTATTCCCCTCCATCG	(Ruiz-Villalba et al. 2017)
		R:CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	
BAX	NM_007527.4	D:CGGCGAATTGGAGATGAACT	(Gao et al. 2016)
		R:GCAAAGTAGAAGAGGGCAAC	
BCL2	NM_009741.5	D:GAACTGGGGGAGGATTGTGG	Diseñado en este trabajo
		R:GCATGCTGGGGCCATATAGT	

La evaluación *in silico*, detallada en la Tabla 7, indica la baja posibilidad de formación de dímeros u horquillas y que todos los cebadores directo y reverso para los genes evaluados se extiendan en dos exones consecutivos. Además, los productos de amplificación generados por estos nuevos cebadores son más cortos en comparación con los utilizados anteriormente. Con estos nuevos cebadores y el cambio de gen de referencia, se espera mejorar la reproducibilidad y especificidad de las amplificaciones, lo que permitirá realizar un análisis más preciso de la expresión génica.

Tabla 7. Características de los distintos cebadores obtenidas de la evaluación *in silico*.

Gen	T_m^a (°C)	LC ^b	% GC ^c	LP ^d	ΔG^e (kcal/mol)	Ubicación	Tipo de cebador
ACTB	59,9	20	60	154	> -9	Exones 2 - 3	Abarca intrones
	59,4	22	45				
BAX	58,3	20	50	161	> -9	Exones 3 - 4	Abarca intrones
	56,7	20	50				
BCL2	60,0	20	60	194	> -9	Exones 1 - 2	Abarca intrones
	59,9	20	55				

^a Temperatura de desnaturalización; ^b Longitud del cebador; ^c Porcentaje del contenido en guanina y citosina; ^d Longitud del producto de amplificación; ^e Energía libre de Gibbs.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Durante la realización de este trabajo, se lograron cumplir los objetivos propuestos en cuanto a la obtención de ARN de alta calidad e integridad a partir de tejido ovárico de ratonas adultas jóvenes, a pesar de la naturaleza fibrosa del ovario, que lo convierte en un tejido difícil para la extracción. Asimismo, se evaluó la eficiencia de los cebadores disponibles y se optimizaron las condiciones para la reacción de RT-qPCR. Sin embargo, la cuantificación de la expresión génica de *BAX*, *BCL2* y *CASP3* no arrojó los resultados esperados, lo que motivó la búsqueda de nuevos pares de cebadores, que serán evaluados a corto plazo.

Confiamos en que las modificaciones y optimizaciones implementadas permitirán una cuantificación precisa de la expresión de genes clave potencialmente involucrados en la supervivencia y muerte celular en el ovario, contribuyendo así al cumplimiento de uno de los objetivos fundamentales del proyecto en el que se enmarca esta tesis. Además, los conocimientos adquiridos sobre la obtención de ARN de alta calidad a partir de muestras ováricas serán valiosos para ampliar el número de animales a analizar, y el proceso de optimización de los cebadores podrá aplicarse a otros genes relevantes para el proyecto. Asimismo, sería beneficioso complementar la etapa de obtención de muestras con la evaluación del ciclo reproductivo del animal, para evitar potenciales diferencias en los rendimientos de la extracción de ARN.

A largo plazo, estos avances no solo fortalecerán la validez de los resultados obtenidos, sino que también podrían contribuir a una mejor comprensión de las bases moleculares de la función ovárica, con implicancias potenciales en la protección del ovario y la preservación de la fertilidad, especialmente en contextos donde el tejido ovárico esté expuesto a agentes quimioterápicos con efecto gonadotóxico.

BIBLIOGRAFÍA

- Arya, M; Shergill, IS; Williamson, M; Gommersall, L; Arya, N; Patel, HRH. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. Expert review of molecular diagnostics 5(2):209-219.
- Bartlett, JMS; Stirling, D. 2003. A short history of the polymerase chain reaction. Methods in molecular biology 226:3-6.
- Basu, C. (Ed.). (2015). PCR primer design. New york: Humana Press.
- Bustin, SA; Benes, V; Garson, JA; Hellemans, J; Huggett, J; Kubista, M; Mueller, R; Nolan, T; Pfaffl, MW; Shipley, GL; Vandesompele, J; Wittwer, CT. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical chemistry 55(4):611-622.
- Bustin, SA; Nolan, T. 2004. Analysis of mRNA expression by real-time PCR (en línea). Real-time PCR. An essential guide. Disponible en <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=e060a07cfd29836534d1368d46d5b80ec2ee4a07>.
- Cobb, M. 2017. 60 years ago, Francis Crick changed the logic of biology. PLoS biology 15(9):e2003243.
- Crick, F. 1970. Central dogma of molecular biology. Nature 227(5258):561-563.
- Díaz-Alonso, CA; Garrote-Santana, H; Amor-Vigil, AM; Suárez-González, Y; Romero, R. 2013. Cuantificación de ácido ribonucleico para la realización de la técnica de RT-PCR. Revista Cubana de 29:298-303.
- Eshleman, J; Smith, DG. 2001. Use of DNase to eliminate contamination in ancient DNA analysis. Electrophoresis 22(20):4316-4319.
- Fleige, S; Pfaffl, MW. 2006. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. Molecular aspects of medicine 27(2-3):126-139.
- Gao, M; Li, Y; Ji, X; Xue, X; Chen, L; Feng, G; Zhang, H; Wang, H; Shah, W; Hou, Z; Kong, Y. 2016. Disturbance of Bcl-2, Bax, Caspase-3, Ki-67 and C-myc expression in acute and subchronic exposure to benzo(a)pyrene in cervix. Acta histochemica 118(2):63-73.
- Green, MR; Sambrook, J. 2019. How to Win the Battle with RNase (en línea). Cold Spring Harbor protocols 2019(2). DOI: <https://doi.org/10.1101/pdb.top101857>.
- Hu, J; Jin, J; Qu, Y; Liu, W; Ma, Z; Zhang, J; Chen, F. 2020. ERO1 α inhibits cell apoptosis and regulates steroidogenesis in mouse granulosa cells. Molecular and cellular endocrinology 511:110842.
- Joffe, L; Steinberg, DM; Strohli, T; Beauchemin, M. 2022. Adolescents and Young Adults with Cancer: Survivorship and Special Considerations. Pediatric annals 51(1):e27-e33.
- Khrapko, K. 2006. PCR troubleshooting. The essential guide. Expert review of molecular diagnostics 6(5):647-647.
- Kubista, M; Andrade, JM; Bengtsson, M; Forootan, A; Jonák, J; Lind, K; Sindelka, R; Sjöback, R; Sjögreen, B; Strömbom, L; Ståhlberg, A; Zoric, N. 2006. The real-time

polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine* 27(2-3):95-125.

Liu, Y; Shen, Q; Li, H; Xiang, W; Zhang, L. 2020. Cell-free mitochondrial DNA increases granulosa cell apoptosis and reduces aged oocyte blastocyst development in the mouse. *Reproductive toxicology* 98:278-285.

Livak, KJ; Schmittgen, TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4):402-408.

Li, X; Wang, J; Gong, X; Zhang, M; Kang, S; Shu, B; Wei, Z; Huang, Z-S; Li, D. 2020. Upregulation of BCL-2 by acridone derivative through gene promoter i-motif for alleviating liver damage of NAFLD/NASH. *Nucleic acids research* 48(15):8255-8268.

Loftis, AD; Reeves, WK; Wang, C; Kaltenboeck, B; Freeman, MD. 2012. Principles of real-time PCR. *Veterinary PCR Diagnostics*, Basseterre: Bhentam E-Books 1:3-6.

Martínez-Giner, M; Noguera, JL; Balcells, I; Fernández-Rodríguez, A; Pena, RN. 2013. Selection of internal control genes for real-time quantitative PCR in ovary and uterus of sows across pregnancy. *PloS one* 8(6):e66023.

Martins, M; Mesquita-Guimarães, J. 2016. Preservação da fertilidade em doentes oncológicos submetidos a terapêutica gonadotóxica. *Revista Portuguesa de Oncologia* 2(1):30-39.

Marton, S; Miquel, E; Acosta-Rodríguez, J; Fontenla, S; Libisch, G; Cassina, P. 2023. SOD1G93A Astrocyte-Derived Extracellular Vesicles Induce Motor Neuron Death by a miRNA-155-5p-Mediated Mechanism. *ASN neuro* 15:17590914231197527.

Meresman, GF. 2011. Relevancia de la apoptosis en la reproducción femenina. *Investigacion clinica* 52:274-290.

Morris, ME; Meinsohn, M-C; Chauvin, M; Saatcioglu, HD; Kashiwagi, A; Sicher, NA; Nguyen, N; Yuan, S; Stavely, R; Hyun, M; Donahoe, PK; Sabatini, BL; Pépin, D. 2022. A single-cell atlas of the cycling murine ovary (en línea). *eLife* 11. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.77239>.

Nouvel, A; Laget, J; Duranton, F; Leroy, J; Desmetz, C; Servais, M-D; de Préville, N; Galtier, F; Nocca, D; Builles, N; Rebuffat, S; Lajoix, A-D. 2021. Optimization of RNA extraction methods from human metabolic tissue samples of the COMET biobank. *Scientific reports* 11(1):20975.

Ofinran, O; Bose, U; Hay, D; Abdul, S; Tufatelli, C; Khan, R. 2016. Selection of suitable reference genes for gene expression studies in normal human ovarian tissues, borderline ovarian tumours and ovarian cancer. *Molecular medicine reports* 14(6):5725-5731.

Padhi, BK; Pelletier, G; Shwed, PS. 2020. A bioinformatics workflow for the evaluation of RT-qPCR primer specificity: Application for the assessment of gene expression data reliability in toxicological studies. *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP* 111:104575.

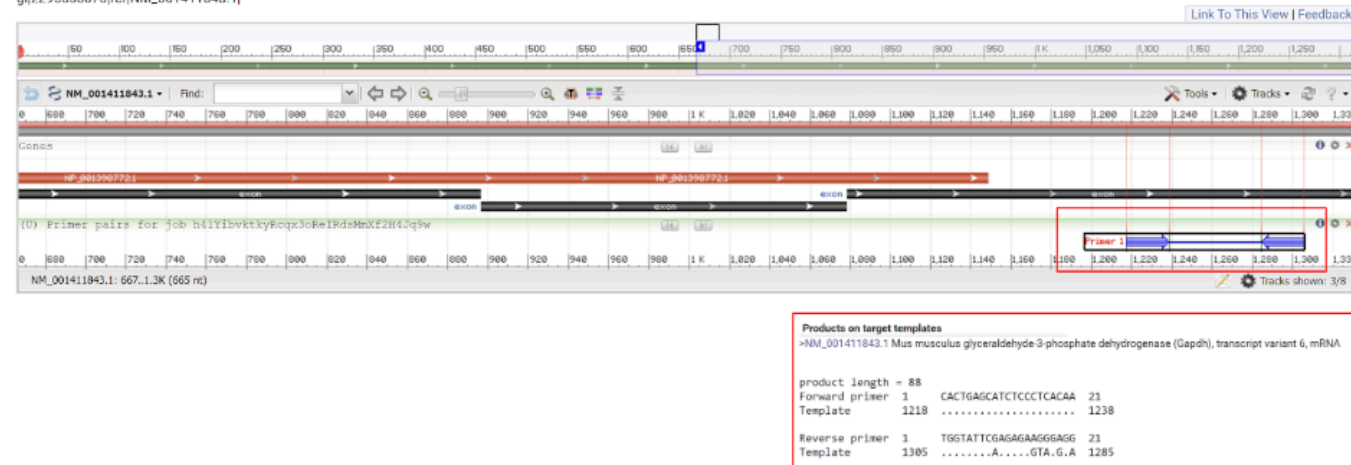
Parmigiani, G; Garrett, ES; Irizarry, RA; Zeger, SL. 2003. The Analysis of Gene Expression Data: An Overview of Methods and Software. *In Parmigiani, G; Garrett, ES; Irizarry, RA; Zeger, SL (eds.)*. New York, NY, Springer New York. p. 1-45.

Rio, DC; Ares, M, Jr; Hannon, GJ; Nilsen, TW. 2010. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harbor protocols* 2010(6):db.prot5439.

- Rodríguez, A; Rodríguez, M; Córdoba, JJ; Andrade, MJ. 2015. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. *Methods in molecular biology* 1275:31-56.
- Ruiz-Villalba, A; Mattiotti, A; Gunst, QD; Cano-Ballesteros, S; van den Hoff, MJB; Ruijter, JM. 2017. Reference genes for gene expression studies in the mouse heart. *Scientific reports* 7(1):24.
- Schroeder, A; Mueller, O; Stocker, S; Salowsky, R; Leiber, M; Gassmann, M; Lightfoot, S; Menzel, W; Granzow, M; Ragg, T. 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology* 7:3.
- Soltani, M; Zarei, MH; Salimi, A; Pourahmad, J. 2019. Mitochondrial protective and antioxidant agents protect toxicity induced by depleted uranium in isolated human lymphocytes. *Journal of environmental radioactivity* 203:112-116.
- Sonigo, C; Beau, I; Binart, N; Grynberg, M. 2019. The Impact of Chemotherapy on the Ovaries: Molecular Aspects and the Prevention of Ovarian Damage (en línea). *International journal of molecular sciences* 20(21). DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20215342>.
- Spears, N; Lopes, F; Stefansdottir, A; Rossi, V; De Felici, M; Anderson, RA; Klinger, FG. 2019. Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection. *Human reproduction update* 25(6):673-693.
- TamaydeDios, L; Ibarra, C; Velasquillo, C. 2013. Fundamentals of polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR.
- Toouli, CD; Turner, DR; Grist, SA; Morley, AA. 2000. The effect of cycle number and target size on polymerase chain reaction amplification of polymorphic repetitive sequences. *Analytical biochemistry* 280(2):324-326.
- Treuting, PM; Dintzis, SM; Montine, KS. 2017. *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, and Human Atlas*. s.l., Academic Press. 570.
- Valasek, MA; Repa, JJ. 2005. The power of real-time PCR. *Advances in physiology education* 29(3):151-159.
- Varmus, H. 1987. Reverse transcription. *Scientific American* 257(3):56-9, 62-4.
- Walker, DG; Whetzel, AM; Serrano, G; Sue, LI; Lue, L-F; Beach, TG. 2016. Characterization of RNA isolated from eighteen different human tissues: results from a rapid human autopsy program. *Cell and tissue banking* 17(3):361-375.
- Winship, AL; Carpenter, M; Griffiths, M; Hutt, KJ. 2019. Vincristine Chemotherapy Induces Atresia of Growing Ovarian Follicles in Mice. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* 169(1):43-53.
- Yuanyuan, S; Qin, S; Rongrong, X; Yujing, G; Chengbin, P; Jianjun, M; Yanzhou, Y; Xiuying, P. 2015. Reference gene selection for real-time quantitative PCR analysis on ovarian cryopreservation by vitrification in mice. *Journal of assisted reproduction and genetics* 32(8):1277-1284.

ANEXO

Mus musculus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh), transcript variant 6, mRNA
gi|2295558070|ref|NM_001411843.1|



Mus musculus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh), transcript variant 6, mRNA
gi|2295558070|ref|NM_001411843.1|

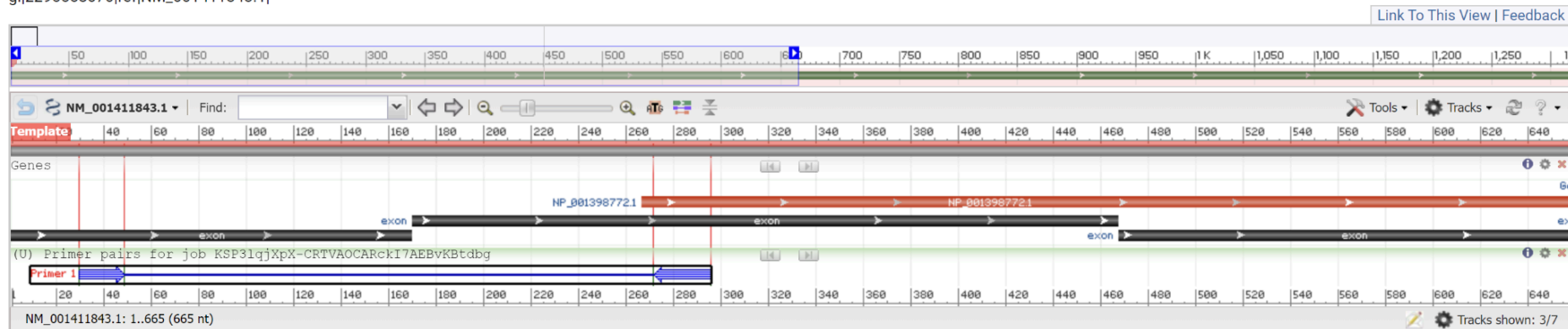


Figura A1. Localización exónica de los pares de cebadores correspondientes a *GAPDH* (rata) (arriba) y su respectiva hibridación en la secuencia de ratón (recuadro rojo), así como la localización de los cebadores específicos de *GAPDH* (ratón) (abajo).

Mus musculus BCL2-associated X protein (Bax), transcript variant 1, mRNA
 gi|2301398499|ref|NM_007527.4|



Mus musculus BCL2-associated X protein (Bax), transcript variant 1, mRNA
 gi|2301398499|ref|NM_007527.4|

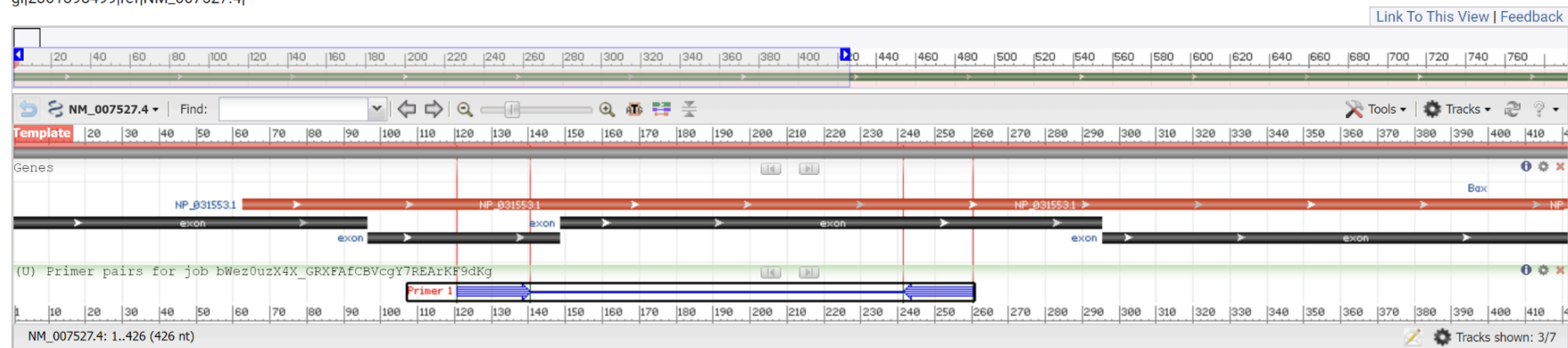
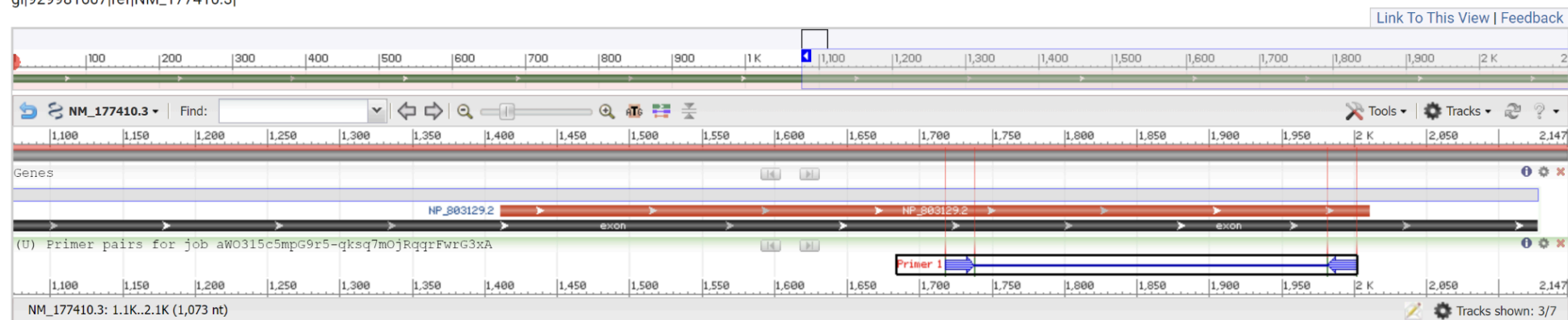


Figura A2. Localización exónica de los pares de cebadores correspondientes a *BAX* ya existentes en el laboratorio (arriba) y de los nuevos pares de de cebadores de *BAX* (abajo).

Mus musculus B cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl2), transcript variant 2, mRNA
 gi|929981607|ref|NM_177410.3|



Mus musculus B cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl2), transcript variant 1, mRNA
 gi|929981608|ref|NM_009741.5|

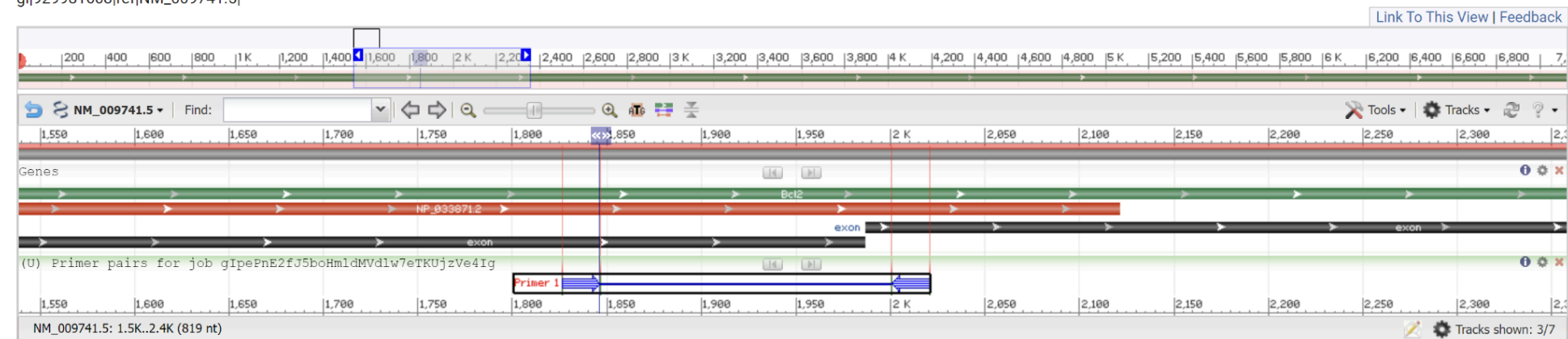


Figura A3. Localización exónica de los pares de cebadores correspondientes a *BCL2* ya existentes en el laboratorio (arriba) y de los nuevos pares de de cebadores de *BCL2* (abajo).

Mus musculus caspase 3 (Casp3), transcript variant 1, mRNA

gil549806821|ref|NM_001284409.1|

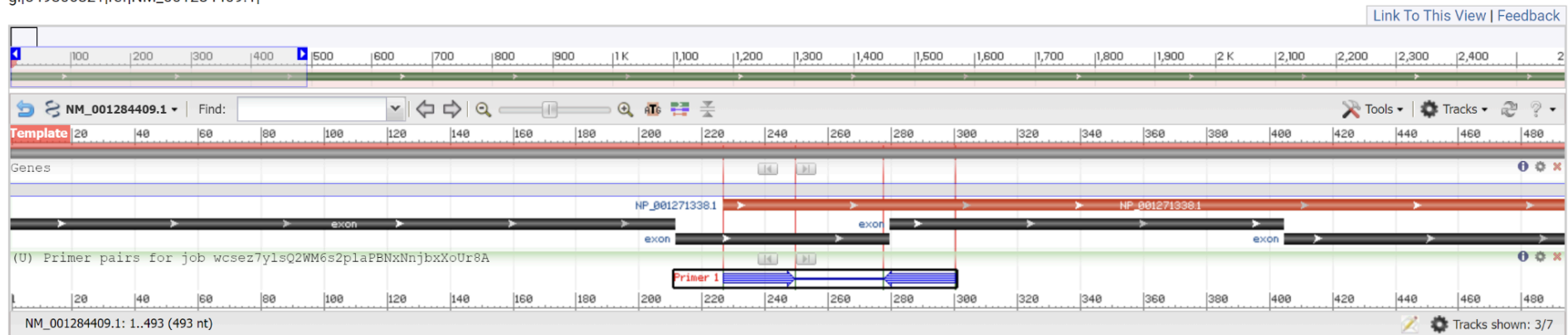


Figura A4. Localización exónica de los pares de cebadores correspondientes a *CASP3*.

Mus musculus actin, beta (Actb), mRNA

gil930945786|ref|NM_007393.5|

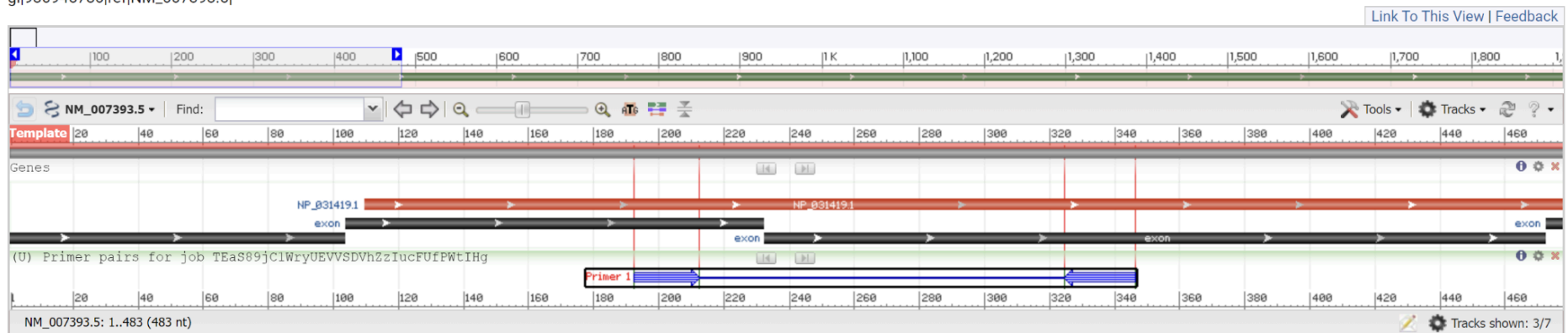


Figura A5. Localización exónica de los pares de cebadores correspondientes a *ACTB*.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a la Unidad Académica de Histología y Embriología de la Facultad de Medicina por abrirme sus puertas. Asimismo, agradezco al Laboratorio de Biología de la Reproducción por permitirme realizar esta tesina de grado y apoyarme en cada etapa del proceso.

Un agradecimiento especial a Gabriel Anesetti y Silvana Pereyra por compartir generosamente su conocimiento y por guiarme con dedicación y paciencia a lo largo de este proyecto. También quiero reconocer a Agustina Toledo y Rebeca Chávez, cuyo apoyo y palabras de aliento han sido una fuente constante de motivación.

Extiendo mi gratitud a los evaluadores Leticia Pérez y Santiago Chávez por su tiempo y valiosos aportes.

A todas las personas que formaron parte de este camino, especialmente a mis amigos de Facultad, gracias por hacer de esta experiencia algo más ameno y por estar a mi lado tanto en los momentos difíciles como en las alegrías.

Finalmente, a mi familia: mamá, papá y Manuel, ustedes son el pilar más importante en mi vida. Su amor, comprensión y constante apoyo han sido esenciales para que pueda alcanzar mis metas y seguir creciendo en lo que realmente me apasiona.