

Marc Bañuls Tornero

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN  
EDEMAS INDUCIDOS A RATONES DIABÉTICOS

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Dirigido por Anna Ardévol Grau

Grado de Biotecnología



UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

Junio 2018

## ÍNDICE

Abstract .....	1
Palabras clave .....	1
Introducción .....	1
Explicación del proceso de curación del tejido y factores implicados .....	2
Métodos para mejorar la curación del tejido: .....	3
Uso de andamios: .....	4
Factores de crecimiento: .....	6
Uso de péptidos .....	7
Hipótesis del trabajo y objetivos .....	8
Metodología .....	8
Modelo animal .....	8
Generación de una úlcera hecha por presión .....	9
Aplicación de los andamios .....	9
Toma de muestras .....	9
Purificación de RNA Total del tejido de ratón .....	10
Cuantificación del RNA .....	10
Síntesis de cDNA .....	10
RT-qPCR .....	11
Resultados y discusión .....	12
Extracción del RNA y obtención del cDNA .....	12
RT-qPCR .....	14
Conclusión .....	19
Bibliografía .....	20
Autoevaluación .....	22
Anexos .....	23

Datos del centro: El estudio mostrado en este TFG se realizó durante la estancia de prácticas externas en el IBEC, localizado en Parc Científic de Barcelona (Barcelona).

## ABSTRACT

Actualmente hay 425 millones de personas con diabetes, las cuales tienen un 25% de posibilidades de desarrollar una úlcera del pie diabético, complicación que puede dar lugar a la amputación de la extremidad. Por ello, varios estudios se centran en investigar la mejora de la ratio de curación en estas heridas crónicas. Uno de los principales métodos para mejorar la curación de heridas consiste en utilizar andamios que contienen compuestos que mejoran la expresión de genes implicados activamente en la curación de heridas (que en personas diabéticas se observan reprimidos). En nuestro estudio se ha querido observar el efecto de un compuesto bioactivo añadido a un andamio de ácido poliláctico en la expresión de los genes COL1A1 y VEGF-A. Para ello se han obtenido muestras de tejido de úlcera de ratones y se ha obtenido RNA Total de estas para realizar una RT-qPCR. Los resultados obtenidos sugieren que el compuesto bioactivo utilizado da lugar a una represión de ambos genes. Pero cabe resaltar una importante limitación en su interpretación. Esto es debido a la baja validez estadística a causa del número reducido de muestras, y la limitada experiencia personal en los procedimientos realizados.

## PALABRAS CLAVE

Diabetes, andamios, curación de heridas, RT-qPCR,  $\Delta\Delta C_T$

## INTRODUCCIÓN

El tratamiento de heridas superficiales ha sido un tema de investigación de gran relevancia a lo largo de la historia. Concretamente, uno de los principales objetivos de investigación consiste en la mejora de la regeneración del tejido. Esto es debido a que algunas enfermedades producen una disminución en la regeneración o cierre del tejido dañado en la persona afectada. Una de las causas por las que se está investigando la mejora de la regeneración de tejido es porque esto tendría un gran impacto en la vida de las personas diabéticas.

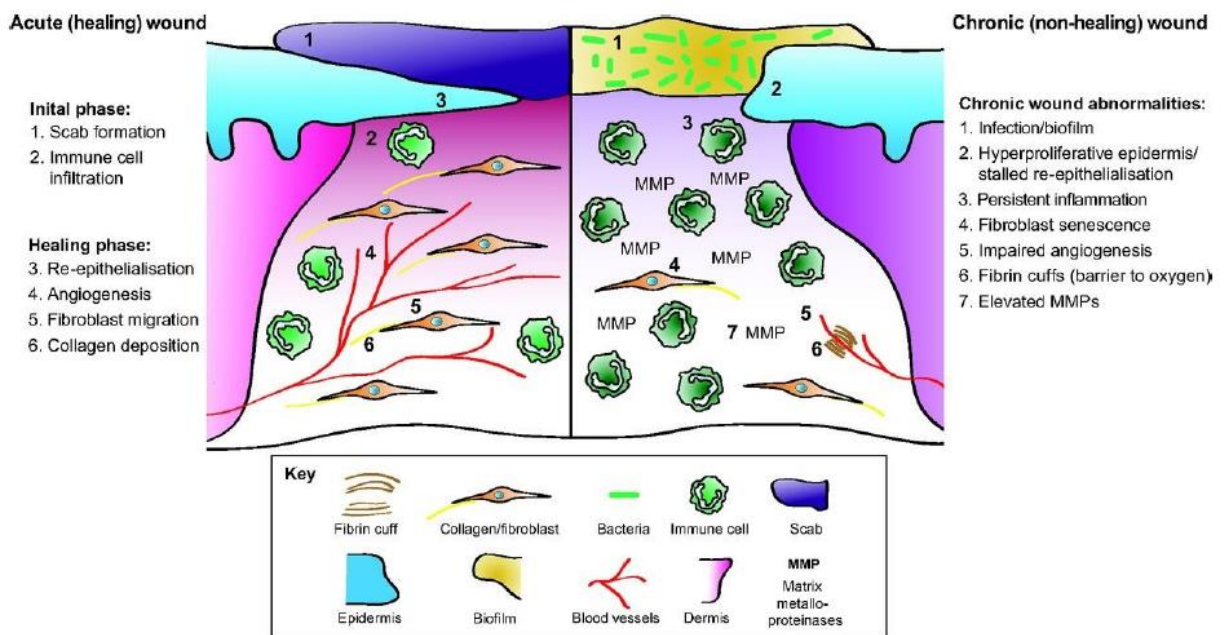
La diabetes es una enfermedad producida por la ausencia o no funcionalidad de la hormona insulina. Esta hormona es la encargada de mantener la concentración de glucosa en sangre por debajo de concentraciones que resultarían peligrosas para el organismo a corto y largo plazo. Actualmente, hay 425 millones de adultos con diabetes en el mundo, número que se espera que incremente a los 629 millones en el 2045 (International Diabetes Federation - IDF 2018 Hyderabad). Se estima que cada una de estas personas tiene un 25% de posibilidades de desarrollar una úlcera del pie diabético (DFU) (Davis et al. 2018). Esta complicación consiste en una infección, ulceración o destrucción de tejido en la zona del pie. Si su tratamiento no es adecuado la úlcera puede derivar en una posterior amputación. Las heridas producidas en diabéticos tienen la característica de tener una regeneración o cierre del tejido significativamente más lenta que la de personas sanas. Esta disminución en la regeneración del tejido se debe principalmente a una disminución en la concentración de factores de crecimiento, menor concentración de colágeno, menor angiogénesis y una menor migración y proliferación de queratinocitos y fibroblastos (Frykberg and Banks 2015). Las DFU si no son tratadas correctamente dan lugar a una alta tasa de mortalidad, teniendo un 16,7% de mortalidad en el primer año y un 50% de mortalidad a los 5 años (Davis et al. 2018).

#### EXPLICACIÓN DEL PROCESO DE CURACIÓN DEL TEJIDO Y FACTORES IMPLICADOS

En la etapa inicial de la regeneración del tejido se produce la coagulación de la sangre y la agregación de plaquetas en la zona de la herida. Posteriormente se observa una migración de neutrófilos a la zona de la herida, donde seguidamente migran los monocitos y fibroblastos. Estos macrófagos y fibroblastos inician una cascada de señalización en la que se activan varios genes que sintetizan factores de crecimiento y otras citoquinas y proteínas de la matriz. La última etapa de la regeneración de la herida consiste en el aumento de la concentración de colágeno en la zona de la herida y su posterior cierre y cicatrización. La duración de esta última etapa puede oscilar entre varias semanas hasta un año (Deuel and Chang 2013).

En el caso de heridas crónicas, se suele observar una inflamación prolongada en la herida a causa de una acumulación de enzimas, como las metaloproteinasas (MMP) que no son degradados. Esto es debido a la falta de una concentración suficiente de los inhibidores

de las enzimas correspondientes (Fig.1). Además, la inflamación se ve potenciada por altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno en la zona de la herida y una infección persistente.(Frykberg and Banks 2015) Esto da lugar a la degradación de varios componentes de la matriz extracelular. Además, se observa el incremento de serin proteasas los cuales inactivan los factores de crecimiento que promueven la regeneración correcta de la herida(MacEwan et al. 2017).



**FIGURA 1: COMPARACIÓN ENTRE LA CURACIÓN DE UNA HERIDA NORMAL Y UNA HERIDA CRÓNICA (MACÉWAN ET AL. 2017)**

Debido a la gran cantidad de elementos que pueden intervenir en la curación del tejido y las respuestas que pueden causar su modificación, hay una alta dificultad en el conocimiento de la funcionalidad de cada agente implicado. Por ello, se requieren diversos estudios para conocer las causas que dan lugar a la aparición de heridas crónicas para tratar estas causas para conseguir una curación del tejido normal.

#### MÉTODOS PARA MEJORAR LA CURACIÓN DEL TEJIDO:

Los estudios relacionados con la mejora de la regeneración del tejido tienen varios enfoques utilizando diferentes componentes o métodos, pero todos ellos tienen como objetivo final la disminución del tiempo requerido para la curación de la herida. Uno de los métodos en el que varios estudios están centrados consiste en mejorar los niveles

de expresión de los genes que participan activamente en el proceso de regeneración de heridas.

El gen COL1A1 se ha observado que tiene una disminución de expresión en los ratones con diabetes respecto a los ratones control, dando lugar a una menor tasa de acumulación de colágeno en el proceso de curación de la herida. Consecuentemente uno de los motivos por los que las heridas en personas diabéticas tienen una ratio de regeneración más lenta es la menor expresión de colágeno. Por ello, se están estudiando métodos para aumentar la expresión del gen COL1A1 en la zona de la herida para así mejorar la regeneración de tejido en personas diabéticas(Moura et al. 2014).

Un gen que también tiene importancia en la regeneración de tejidos es el gen MMP9. Este gen tiene como función principal la movilización de las células progenitoras (EPC) las cuales se ven reducidas en personas diabéticas. Se ha estudiado que este gen promueve el corte y liberación de los factores de células madre (SCF), los cuales dan lugar a un efecto proinflamatorio en la herida (Cho et al. 2016), mejorando consecuentemente la regeneración del tejido.

#### USO DE ANDAMIOS:

Un tema de estudio enfocado a la mejora en la curación de tejidos consiste en el uso de andamios. Estos pueden ser fabricados utilizando diversos métodos y materiales siempre y cuando no sean tóxicos ni inmunogénicos para el organismo en el que va a ser utilizado. Además, se busca que el material permita la correcta migración y transporte de células, nutrientes y otros factores necesarios para la correcta regeneración del tejido.

Los materiales más utilizados para la fabricación de andamios destinados a la mejora de regeneración de tejidos son el alginato, elastina, colágeno y polivinil alcohol-quitosan, entre otros derivados de estos(Q. Liu et al. 2017).

El alginato de calcio se ha comprobado que tiene una gran utilidad para mejorar la regeneración de heridas crónicas. Comparando heridas de ratones diabéticos con un andamio de alginato de calcio con otros que tienen andamios de vaselina (control), se observa una mejora en la regeneración del tejido con el uso de andamios de alginato de calcio (Wang et al. 2015). Concretamente, los andamios de alginato de calcio tienen una

ratio de cierre de la herida significativamente superior al control, con una epitelización más rápida, y una menor inflamación en la herida. Además, se ha observado que andamio de alginato de calcio da lugar a una mayor deposición de colágeno. Esto hace pensar que el andamio puede afectar a los niveles de expresión de colágeno en la herida, aunque la RT-PCR del mRNA del colágeno en heridas no ha sido realizada de momento.

La elastina se puede utilizar en forma de nanopartículas, que tienen la capacidad de proteger del efecto proteolítico a las moléculas que se unen a ellas. Este efecto promueve la utilización de la elastina para el transporte y la degradación continuada de moléculas que promuevan la regeneración del tejido, como los factores de crecimiento de queratinocitos (Koria et al. 2011) o los factores de crecimiento derivados de células estromales (Warren et al. 2017).

El colágeno ha sido el material más utilizado como andamio debido a que cumple gran parte de los criterios que se buscan en los andamios, como su no toxicidad, facilitación de la migración celular en el tejido y promoción de la regeneración del tejido. Además, se han realizado diversos estudios para observar el efecto del colágeno como biomaterial para la regeneración de tejido, dando generalmente lugar a un aumento del ratio de regeneración de la herida (Gould 2016).

El polivinil alcohol-quitosan es un material compuesto que se está utilizando como andamio para la regeneración de heridas. El quitosan actúa como promotor de la proliferación y componente antibacteriano mientras que el polivinil alcohol tiene la capacidad de ser fácilmente modificado para adaptar el andamio al tipo de herida, además de promover la curación del tejido en el que se encuentra. El conjunto de ambos materiales da lugar a una significativa mejora en la curación del tejido en los primeros días de tratamiento (Charernsriwilaiwat et al. 2014).

Por otro lado, el método utilizado para la fabricación de los andamios también puede tener como consecuencia la mejora de la curación del tejido, ya que según qué método se use se puede facilitar la migración celular y el transporte de nutrientes en el tejido dañado. Por lo tanto, es una vía para considerar para el estudio de la mejora de regeneración de tejidos, incluyendo a las personas diabéticas.

Por ejemplo, hay andamios que se pueden construir mediante partículas microporosas de polietilenglicol-vinil sulfona formando un gel. Estos geles permiten una mejor migración y conectividad a nivel celular favoreciendo la regeneración de heridas, con un 40% de regeneración de heridas respecto a controles que no usan el gel (Griffin et al. 2015).

Otro método de fabricación de andamios consiste en utilizar la técnica de electrospineado, para así obtener andamios nanoporosos y con una gran versatilidad respecto a las propiedades del material. Por ejemplo, utilizando proteínas junto con metacrililo se obtiene un material modificable según el tiempo de exposición a la luz de este, pudiendo personalizar el material para cada tipo de herida y así optimizar la mejora de la curación de heridas (Zhao et al. 2017).

#### FACTORES DE CRECIMIENTO:

Otro tema de estudio basado en la mejora en la curación de heridas consiste en la investigación de los distintos tipos de moléculas señalizadoras que pueden intervenir en el proceso. En este aspecto, las moléculas que más alteran la curación de tejidos son los factores de crecimiento. De esta manera se pueden conocer de manera precisa los motivos por los que la regeneración de una herida se ve ralentizada respecto a la regeneración normal de esta.

Uno de los factores de crecimiento relevantes en la mejora de la curación de heridas es el bFGF (basic Fibroblast Growth Factor). Este factor de crecimiento mejora la regeneración de tejido dañado en diabéticos si se mantiene una dosis constante en la herida, aumentando la deposición de colágeno y la re-epitelización en la herida (Q. Liu et al. 2017). Otro factor de crecimiento que puede mejorar la curación del tejido dañado es VEGF-A (Vascular Endotelial Growth Factor A), un factor que promueve también la angiogénesis mediante la promoción de la migración, movilización y reclutamiento de células endoteliales (Guo et al. 2011). Un factor de crecimiento que también se ha estudiado que participa en la regeneración de tejidos es el rPDGF-BB (recombinant Platelet Derived Growth Factor-BB) el cual se ha visto que aumenta la angiogénesis y la curación de tejido en la herida (Greenhalgh et al. 1990).

## USO DE PÉPTIDOS

Otros estudios cuyo objetivo es el de mejorar la curación de heridas en personas diabéticas se basan en la utilización de péptidos, capaces de mejorar las funciones regenerativas deficientes en las personas diabéticas. Estos péptidos principalmente otorgan la mejora de las funciones de curación de tejido cuando son añadidos en la zona de la herida, preferiblemente junto a un andamio para mantener así una dosis constante de péptidos en la herida.

La neurotensina es un neuropéptido (concretamente un tridecapéptido) que se ha observado que tiene un papel importante en la liberación de citoquinas y en la quimiotaxis para mantener una correcta inmunomodulación. Además, la neurotensina también aumenta la permeabilización de los vasos sanguíneos y de la angiogénesis (Katsanos et al. 2008). Por lo tanto, el uso de este neuropéptido junto con un andamio de colágeno que permita la liberación continuada del tejido dará lugar a una significativa mejora en la curación del tejido. Se ha observado que el tejido tratado con un andamio de colágeno que contiene neurotensina tiene una mejora en la regeneración del tejido de un 17% respecto a los tratamientos control a los 3 días después de realizar la herida. Además, se observa una reducción de la expresión de citoquinas inflamatorias en la herida y un aumento en los niveles de colágeno COL1A2 (Moura et al. 2014).

Un péptido no secretado por el ser humano que también puede ayudar a mejorar la curación de tejidos es el péptido CW49, que se puede obtener a partir de la piel de una rana llamada *Odorrana grahami*, el cual puede aumentar significativamente la angiogénesis en la zona de la herida (H. Liu et al. 2014).

Como ya se ha mencionado, uno de los motivos por los que las heridas de personas diabéticas no se regeneren correctamente es la aparición de estrés oxidativo. Por lo tanto, la disminución o eliminación del estrés oxidativo presente en la zona de la herida mejoraría la regeneración del tejido. Uno de los péptidos que permiten esta disminución de estrés oxidativo son los procedentes de derivados de la leche de camello, cuya dosis continuada da lugar a un aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT en un 17,54% y 22% respectivamente (Ebaid et al. 2015).

## HIPÓTESIS DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

La hipótesis de este estudio fue la siguiente:

- El uso de andamios que contienen el compuesto bioactivo A\* permite que la ratio de curación de heridas en personas diabéticas se vea mejorada debido a un aumento de la expresión de genes importantes en la curación del tejido.

Para poder probar la hipótesis inicial, el principal objetivo marcado en este estudio fue:

- Estudiar la expresión de genes que intervienen activamente en la regeneración del tejido, comparando la expresión entre ratones diabéticos tratados con andamios control y ratones diabéticos tratados con andamios que contienen compuestos bioactivos.

Para ello, se han marcado como objetivos específicos de este estudio:

- Puesta a punto del protocolo de extracción y purificación del RNA total de los tejidos de ratones diabéticos, para pasarlo posteriormente a cDNA y realizar la RT-PCR.
- Comparar los niveles de expresión del gen VEGF-A y del gen COL1A1 entre los ratones diabéticos tratados con andamios control y los tratados con andamios que contienen el compuesto bioactivo A.

## METODOLOGÍA

### MODELO ANIMAL

Se utilizaron como modelos animales a cuatro ratones machos (para evitar interferencia hormonal en la curación de la herida) diabéticos y obesos. Estos ratones eran de la cepa BKS.Cg-Dock7<sup>m</sup> +/+ Lepr<sup>db</sup>/J la cual se puede utilizar como modelo para animales con diabetes tipo II y obesidad. Los ratones se obtuvieron del Charles River Laboratory y se utilizaron para este estudio cuando tenían 8 semanas. Los ratones se dividieron aleatoriamente en dos grupos: el primer grupo se fue tratado con materiales de electrospineado que contenían el compuesto bioactivo A<sup>1</sup> y el segundo grupo fue tratado solo con materiales de electrospineado (grupo control). En este estudio el

---

\*La composición del compuesto bioactivo no puede especificarse por temas de confidencialidad

ratón 3db era el grupo control mientras que los otros tres ratones (2db, 4db y 5db) formaron parte del grupo experimental.

#### GENERACIÓN DE UNA ÚLCERA HECHA POR PRESIÓN

Para generar úlceras en la parte dorsal del ratón, se utilizó un modelo anterior que consiste en realizar ciclos de reperfusión de isquemia (IR) mediante el uso de dos imanes proporcionados por la empresa IMA (Wassermann et al. 2009). Siguiendo el modelo propuesto, se generaron dos úlceras independientes en cada ratón, con una separación de 1cm entre estas dos úlceras.

#### APLICACIÓN DE LOS ANDAMIOS

El andamio destinado al ratón del grupo control era únicamente de ácido poliláctico. En cambio, a los ratones del grupo experimental se les aplicaron andamios hechos de ácido poliláctico junto con nanopartículas poliméricas bioactivas liberadoras del compuesto bioactivo A que se espera que promuevan la angiogénesis.

Antes de poner los andamios, los ratones fueron anestesiados y el tejido necrótico de la úlcera fue removido. Se pusieron los andamios correspondientes a cada ratón y para mantener los andamios en la zona de la úlcera, estos se cubrieron con un adhesivo Plaster (Coverplast® Latex-free, BSNmedical) y una gasa anelástica (Genové Dermatologics). Los cambios de los andamios se hicieron cada 24 horas poniendo a los ratones en estado de anestesia.

#### TOMA DE MUESTRAS

Ocho días después del tratamiento, los ratones fueron sacrificados mediante una dislocación cervical. Las heridas fueron sustraídas dejando márgenes de 2 mm, y se obtuvieron 0,5 gramos de tejido por cada úlcera. El proceso de almacenamiento del tejido para su posterior purificación de RNA consistió en un lavado del tejido con PBS y el emplazamiento del tejido en eppendorfs. Posteriormente se congelaron los eppendorfs con el tejido para su posterior purificación de RNA total.

Las muestras fueron nombradas según el ratón y la parte dorsal de cada ratón del que provenía la muestra, siendo los ratones numerados del 2 al 5 y los términos “Izq” y “Der” hacían referencia a cada una de las dos úlceras provocadas en cada ratón (úlcera provocada en la parte izquierda y derecha de la espalda del ratón respectivamente). El

ratón con el andamio control es el 3db tanto Izq i Der, aplicando a los demás ratones la estera con nanopartículas bioactivas.

#### PURIFICACIÓN DE RNA TOTAL DEL TEJIDO DE RATÓN

Las muestras se descongelaron mediante su incubación en un baño de agua a 37°C y se lisaron los tejidos de los eppendorfs utilizando un pestle junto con la adición de 100 µL de buffer RLT Plus de QIAGEN® y B-ME. Posteriormente se centrifugaron las muestras y se transfirieron 100 µL de sobrenadante de cada muestra a otros eppendorfs. Después se le añadió a cada muestra 600 µL de etanol 70% y se mezcló pipeteando.

Para realizar la purificación de RNA se utilizó el kit RNeasy Mini de la casa comercial QIAGEN® y se utilizó como referencia el protocolo facilitado junto el Kit, adjuntado en el anexo 1. Se transfirieron los 700 µL de cada muestra a una RNeasy Spin Column situada en un tubo colector de 2 mL y se centrifugaron las muestras. Se pusieron a centrifugar las muestras con la centrífuga de eppendorfs 5415 D de Thermofisher®. Posteriormente se añadieron los *buffers* y se realizaron las centrifugaciones necesarias para purificar el RNA Total y eliminar el etanol residual. Al finalizar la purificación del RNA Total se almacenaron los tubos colectores que contenían las muestras en un congelador a una temperatura de -20 °C.

#### CUANTIFICACIÓN DEL RNA

Para medir la concentración de RNA Total de la muestra se utilizó el espectrofotómetro Microplate Infinite M200 PRO de TECAN®. Primero se introdujo una placa NanoQuant de TECAN® con 2 µL de agua con Tris-CL (7,5pH) para hacer un blanco. Posteriormente se colocaron 2 µL de las muestras de cada ratón en la misma placa y se introdujeron en el equipo para obtener las absorbancias requeridas para cuantificar el RNA Total.

#### SÍNTESIS DE CDNA

Para realizar un control positivo en la posterior RT-qPCR se realizó la síntesis de cDNA del reactivo XpressRef Universal Total RNA. Se debería hacer un control negativo No Reverse Transcription (NRT) realizando la misma reacción de síntesis de cDNA pero sin añadir la enzima transcriptasa reversa, pero no llegó a realizarse en este experimento.

Para la síntesis de cDNA se utilizaron los reactivos del kit RT<sup>2</sup> First Strand procedente de QIAGEN® y se utilizó como referencia el protocolo facilitado en el kit, adjuntado en el anexo 2. Previamente se preparó la mezcla de eliminación de DNA genómico a diluyendo

las muestras para obtener 25ng de RNA en 8  $\mu$ L de agua libre de RNAsas. Se calentaron las muestras en el equipo Thermomixer Comfort de eppendorf® durante 5 minutos y se dejó en hielo durante 1 minuto.

Se preparó la mezcla de transcripción reversa para 8 muestras añadiendo un 20% extra de cada reactivo para tener en cuenta el error de pipeteo. Para ello se siguieron los volúmenes de la Tabla 1 y se extrapolaron para obtener volumen suficiente para 8 reacciones:

<b>Componentes</b>	<b>Volumen para 1 reacción</b>
<b>5x Buffer BC3</b>	4,8 $\mu$ L
<b>Control P2</b>	1,2 $\mu$ L
<b>RE3 Reverse Transcriptase Mix</b>	2,4 $\mu$ L
<b>Rnase-free water</b>	3,6 $\mu$ L
<b>Volumen total</b>	12 $\mu$ L

**TABLA 1: MEZCLA DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA**

Después de añadir la mezcla a cada muestra, las muestras se incubaron en el equipo Thermomixer comfort, se paró la reacción con la placa de temperatura Prima Series de GRANT® y se almacenaron en un congelador a una temperatura de -20°C.

#### RT-QPCR

Todos los reactivos necesarios para realizar la RT-qPCR provienen del kit RT<sup>2</sup> SYBR® Green/ROX PCR Mastermix de QIAGEN® y se utilizó como referencia el protocolo facilitado en el kit, que se encuentra adjuntado en el anexo 3. Además, se prepararon triplicados de los controles positivos (XpressRef Universal Total RNA sintetizado a cDNA anteriormente) y controles negativos (agua libre de RNAsas sustituyendo al primer). Se prepararon las mezclas de PCR para 8 muestras teniendo en cuenta que se iban a hacer 3 reacciones (triplicado) por cada muestra y añadiendo un 10% para tener en cuenta el error de pipeteo.

Componentes	Volumen para 1 reacción
RT <sup>2</sup> SYBR Green Mastermix	12,5 µL
cDNA	1 µL
RT <sup>2</sup> qPCR Primer Assay	1 µL
Rnase-free wáter	10,5 µL
Volumen total	25 µL

TABLA 2: MEZCLA DE COMPONENTES DE PCR

Se colocaron los componentes de la Tabla 2 en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de Applied Biosystems®, se colocó el adhesivo Optical Adhesive Cover de Applied Biosystems® sobre la placa y se centrifugó. Se utilizó el equipo StepOnePlus de Thermofisher® junto con su software correspondiente para realizar la RT-qPCR. La RT-qPCR empezó con un ciclo de 95°C durante 10 minutos y posteriormente se intercalaron ciclos de 15 segundos a 95°C con 1 minuto a 60°C con un total de 40 ciclos.

Los *primers* utilizados en las dos RT-qPCR realizadas en este estudio fueron los obtenidos de la casa comercial QIAGEN® relativos al gen COL1A1, el gen VEGF-A y el gen GapdH. Se tiene como el objetivo de estudio observar la expresión de los genes COL1A1 y VEGF-A mientras que se utiliza la expresión del gen GapdH como gen de referencia.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La metodología relacionada con la manipulación de los ratones fue realizada por otras personas debido a que no poseo la titulación necesaria para manipular animales. Si que pude realizar todo el trabajo de poyata relacionado con la cuantificación de RNA total y su purificación y la posterior RT-qPCR. Por lo tanto, ahora el estudio se centrará en discutir los resultados obtenidos en estos apartados.

### EXTRACCIÓN DEL RNA Y OBTENCIÓN DEL CDNA

El equipo y software de equipo Microplate Infinite M200 PRO de TECAN® realiza automáticamente la cuantificación del RNA de las muestras, basándose en la ecuación de Lambert-Beer:

$$c = (A * e)/b$$

ECUACIÓN 1: ECUACIÓN DE LAMBERT-BEER

Donde “c” es la concentración de ácidos nucleicos en ng/μL, “A” es la absorbancia en unidades de absorbancia, “e” el coeficiente de extinción en ng-cm/μL y “b” la distancia de recorrido en cm.

Cabe mencionar que en los cálculos también se ha de tener en cuenta que se ha de introducir 2 μL de muestra en el equipo, y por lo tanto los resultados obtenidos han de multiplicarse por dos para obtener la concentración en ng/μL. Teniendo en cuenta que el coeficiente de extinción de ácidos nucleicos aceptado para RNA es de 40 ng-cm/μL, la absorbancia utilizada es de 260 nm y 280 nm, la distancia de recorrido del equipo es de 1 cm y se han introducido 2 μL de muestra en el equipo se obtiene esta tabla de resultados:

Muestra	260nm	280nm	Conc ng/μl	Ratio
2Izq	0,023	0,008	18,56	2,90
2Der	0,032	0,015	25,44	2,16
3Izq	0,037	0,015	29,92	2,49
3Der	0,012	0,003	9,52	4,10
4Izq	0,036	0,014	29,12	2,53
4Der	0,010	0,002	7,92	6,19
5Izq	0,019	0,006	14,96	3,07
5Der	0,026	0,011	20,72	2,42

**TABLA 3: CUANTIFICACIÓN DE RNA TOTAL**

Se realiza la absorbancia a 280 nm para poder determinar posibles contaminaciones de las muestras mediante la ratio de absorbancia 260/280, ya que a 280nm se puede observar la concentración de proteína que produce una posible contaminación de la muestra.

Una ratio superior a 2 indica que el RNA de la muestra tiene un alto grado de pureza por ausencia de proteínas(How to quality control check your RNA samples - Bitesize Bio n.d.), concluyendo entonces que todas las muestras obtenidas con tienen RNA Total sin contaminación por proteínas. Aun así, las muestras tienen una ratio más elevada de lo esperado, sobre todo en las muestras 3Der y 4Der. Esto puede ser debido a que, al haber poca concentración en estas muestras, (9,52 y 7,92 ng/μL respectivamente) la ratio es más variable.

La observación de las absorbancias a 260 nm y 280 nm de cada muestra en la Tabla 3 da cierto grado de inquietud debido a las cantidades tan pequeñas de absorbancia. Esto es

debido a que para asegurar la significancia de los resultados obtenidos se recomienda tener absorbancias superiores a 0,15 (How should I quantify RNA isolated with RNeasy Kits? - QIAGEN n.d.), valor que al que no ha llegado ninguna de las muestras. Esto puede ser debido a que se han intentado homogeneizar 0,5 gramos de tejido dérmico, pero no se ha podido homogeneizar completamente consecuencia de la dureza de este tejido. Además hay que tener en cuenta que la alta presencia de RNAsas en este tipo de tejido (Bruning et al. 2011) dificulta la obtención de concentraciones altas de RNA. Además, aunque se haya realizado el proceso de purificación, durante este proceso las RNAsas ya pueden haber degradado cantidades significantes RNA Total si no se realiza el procedimiento con rapidez. Aun así, la baja concentración de estos valores no debería afectar a los resultados finales ya que, al diluir las concentraciones de todas las muestras para tener una misma concentración, se uniformizan los futuros valores en la RT-qPCR.

#### RT-QPCR

Se realizó la RT-qPCR en todas las muestras utilizando los *primers* correspondientes a VEGF-A y los *primers* correspondientes COL1A1 para observar los niveles de expresión del gen en cada muestra. El equipo utilizado calcula el valor de  $C_T$  (Threshold Cycle) para cada muestra, es decir, el número de ciclos de PCR necesarios para que la fluorescencia supere el nivel o línea umbral. Esto quiere decir que, si las muestras dan valores cercanos a 40, la concentración de cDNA de partida correspondiente al gen de interés de la muestra es muy pequeña ya que se necesitan varios ciclos para que la fluorescencia de la muestra supere el valor del nivel umbral. Si la muestra da lugar a valores inferiores a 20 significa que la muestra tiene grandes cantidades de cDNA correspondiente al gen de interés debido a que en pocos ciclos de la RT-qPCR se ha llegado a superar la fluorescencia del nivel umbral. En principio, los valores de  $C_T$  inferiores a 20 o superiores a 35 pueden ser descartables debido a la gran variación que puede dar a los valores de Fold Change, el cual se explicará más adelante.

Al obtener los valores de  $C_T$ , se utiliza el método  $\Delta\Delta C_T$  para obtener los valores finales de la RT-qPCR utilizando los niveles de expresión del gen GapdH como referencia.

En ambas RT-qPCR realizadas en este estudio, el valor de  $C_T$  del agua libre de RNAsas no ha dado ningún valor de  $C_T$ . Esto significa que no ha llegado a haber fluorescencia suficiente para llegar a la línea umbral debido a la ausencia de dsDNA al que unirse el

colorante SYBR Green. Por lo tanto, el control negativo es válido en ambas RT-qPCR, indicando ausencia de contaminación. El control positivo realizado con XpressRef Universal en las dos RT-qPCR realizadas ha dado lugar a valores de  $C_T$  válidos ( $C_T = 25,30$  y  $26,63$ ). Estos valores indican que el correcto funcionamiento de ambas RT-qPCR realizadas en este estudio

Los datos obtenidos en ambas RT-qPCR han sido analizados y se han descartado, de los triplicados de amplificación de cada muestra de RNA Total, los resultados que elevaban significativamente la variabilidad de estos. Para poder observar los niveles de expresión de los genes a partir de estos valores, se utiliza el método  $\Delta\Delta C_T$ .

El método  $\Delta\Delta C_T$  consiste en la comparación de los valores de  $C_T$  del gen de referencia (HKG) con el gen de interés (GOI) para normalizar los resultados obtenidos respecto a la expresión del gen de interés. El HKG es utilizado como referencia en este método debido a que es un gen endógeno con unos niveles de expresión constantes y poco variables. Los valores del HKG sirven para poder normalizar las muestras mediante el cálculo del  $\Delta C_T$  control y el  $\Delta C_T$  experimental donde:

$$\Delta C_T = C_T(GOI) - C_T(HKG)$$

**ECUACIÓN 2: CÁLCULO DE  $\Delta C_T$**

Cuando se obtiene el  $\Delta C_T$  control y experimental se calcula posteriormente el  $\Delta\Delta C_T$  utilizando los valores obtenidos anteriormente:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(experimental) - \Delta C_T(control)$$

**ECUACIÓN 3: CÁLCULO DE  $\Delta\Delta C_T$**

Finalmente se obtiene el valor Fold Change del gen:

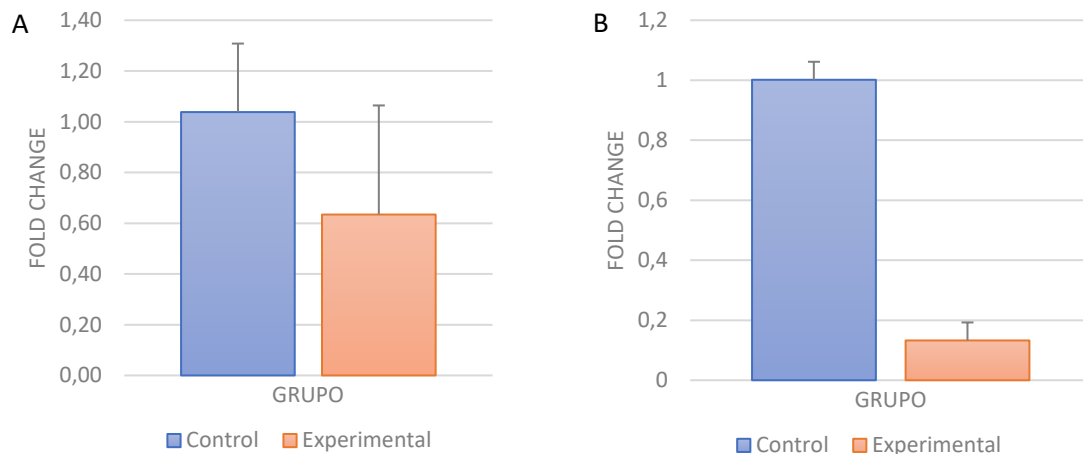
$$Fold\ Change = 2^{(-\Delta\Delta C_T)}$$

**ECUACIÓN 4: CÁLCULO FOLD CHANGE**

El Fold Change indica el aumento o disminución de expresión de un gen en una muestra respecto a la muestra control cuyo valor consecuentemente siempre será 1. Si el valor del Fold Change es inferior a 1 en una muestra significa que la expresión del gen es menor al control (el gen se encuentra más reprimido) mientras que si el Fold Change es

superior a 1 significa que la expresión del gen es mayor al control (el gen se encuentra sobre expresado).

A partir de los valores obtenidos de Fold Change se pueden realizar gráficas para observar visualmente el nivel de expresión génica de ambos genes. Estas gráficas de



**FIGURA 2: EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA AL GRUPO CONTROL DEL GEN COL1A1 (A) Y VEGF-A (B)**

barras muestran los cambios de expresión del gen COL1A1 y Vegfa en el grupo experimental respecto al grupo control, permitiendo comparar la expresión génica.

En los datos de la Figura 2A se observa que las muestras del grupo tratado con el compuesto bioactivo A tienen unos niveles de expresión génica significativamente menores al grupo control. Esto en primera instancia indica que las muestras del grupo experimental han tenido una fuerte represión del gen COL1A1 respecto al grupo control y, por tanto, sugiere que el uso del compuesto bioactivo A reprime la expresión del gen COL1A1.

Analizando los valores presentes en la Figura 2B también se observa que el grupo tratado con el compuesto bioactivo A tiene unos niveles de expresión génica muy inferiores respecto al Fold Change del grupo control. Estos valores indican que las muestras del grupo experimental tienen una gran represión del gen VEGF-A respecto a la expresión del grupo control, sugiriendo que el Compuesto bioactivo A tiene una fuerte actividad represora del gen VEGF-A

Los resultados obtenidos en ambas RT-qPCR resultan ser inesperados debido a que el compuesto bioactivo A tiene un efecto totalmente contrario al esperado, ya que se

pensaba que este compuesto aumentaría significativamente la expresión de los genes COL1A1 y VEGF-A. Además, el efecto observado en la Figura 2 indican una fuerte represión en ambos casos, efecto que resulta perjudicial en lo que respecta al tiempo de curación y cierre de heridas.

Como no conozco el compuesto bioactivo A no puedo comparar los resultados de este estudio con otros que hayan podido utilizar compuestos similares para el mismo objetivo. Debido a los resultados inesperados obtenidos en ambas RT-qPCR, se han propuesto diferentes hipótesis a partir de posibles factores que hayan podido afectar a los resultados.

Un factor para tener en cuenta es que en este estudio se han utilizado 4 ratones y 8 muestras (2 muestras por cada ratón), utilizando solo uno de los ratones como control. Esto da lugar a la realización de medias y análisis de resultados de 6 muestras experimentales y 2 muestras control con sus respectivos triplicados. Consecuentemente, los resultados finales que se han obtenido han sido pocos y significativamente variables, tanto en el grupo experimental como en el grupo control. Esto da lugar a una pobre normalización, dando poca validez a los resultados obtenidos. Sobre todo, el hecho de utilizar sólo un ratón como control hace que no se pueda normalizar correctamente el grupo control del estudio y, por tanto, los resultados pueden no llegar a ser concluyentes. También hay que tener en cuenta el hecho de estar utilizando muestras de animales, ya que este tipo de muestras tienen una variación intrínseca afectando a los resultados, aunque las condiciones y tratamientos para estos hayan sido los mismos. Por ello, se recomienda que en futuros estudios se utilice un mayor número de muestras (tanto en el grupo control como el experimental) para así tener unos valores finales óptimos y normalizados

Otra causa que puede dar lugar a errores en los resultados es mi limitada experiencia y por tanto, falta destreza en lo referido a la realización de los protocolos necesarios para obtener los resultados de las RT-qPCR. Además, el hecho de que se me ha tenido que explicar el funcionamiento de parte de los equipos necesarios para realizar las RT-qPCR durante el seguimiento de los protocolos ha provocado que se ralentizaran algunos pasos. Estos factores han podido afectar consecuentemente a los resultados obtenidos en las RT-qPCR. Este factor es inevitable, pero con tiempo y práctica en la utilización de

estos métodos la posibilidad de error se verá significativamente disminuida, dando lugar a resultados más certeros.

Otra causa que puede dar lugar a los resultados obtenidos en ambas RT-qPCR podría ser el de un posible error producido por los *primers* GapdH (HKG). El motivo de esta posibilidad es que este gen es el utilizado como Housekeeping en ambas RT-qPCR y si estos *primers* no tienen una correcta funcionalidad (debido a su degradación o contaminación por un uso indebido) daría lugar a error en las dos RT-qPCR. Además, en ambas RT-qPCR realizadas se ha observado una significativa desviación estándar en los valores de  $C_T$  del gen GapdH, teniendo en cuenta que ya se han descartado valores para disminuir esta variación. En cambio, los valores de desviación estándar de los genes VEGF-A y COL1A1 se encuentran más estables entre las muestras. Esta suposición es corroborada con el hecho de que el HKG en una RT-qPCR debería ser lo más estable posible entre muestras, ya que supuestamente tanto los ratones control como los experimentales deberían tener una expresión similar de este gen, cosa que no ocurre en ninguna de las RT-qPCR. Si la hipótesis de la causa de estos resultados es correcta, los valores de referencia del método  $\Delta\Delta C_T$  serían erróneos, dando lugar a una incorrecta interpretación de los valores de  $C_T$  de los genes Vegfa y COL1A1.

Con los resultados obtenidos de ambas RT-qPCR se puede observar si los *primers* correspondientes al gen GapdH funcionan correctamente. Esto se puede hacer realizando un control interno comparando los valores de  $C_T$  del gen GapdH de cada muestra en una RT-qPCR respecto a los valores de  $C_T$  de la misma muestra y mismo gen de la otra RT-qPCR. De esta manera se puede observar si hay una variación entre valores de  $C_T$  que deberían ser similares. Para ello se realiza la ratio de la media de los valores de  $C_T$  del gen GapdH y de la misma muestra de una RT-qPCR respecto a la otra. Las ratios obtenidas en este control son generalmente cercanas a 1, excepto en las muestras relativas a los ratones 2 y 5 donde la ratio es inferior a 0,9 (0,83 y 0,87 en las muestras del ratón 2db y 0,88 en las muestras de 5db), indicando la diferencia de resultados entre los valores de las dos RT-qPCR en estas muestras. Estos resultados sugieren que los *primers* GapdH sí que funcionan correctamente (no se encuentran degradados o contaminados) pero surgen dudas sobre la integridad de las muestras, concretamente las muestras relativas al ratón 2db y 5db.

Aunque en la cuantificación de RNA Total inicial (Tabla 3) los valores de las muestras de los ratones 2db y 5db se observa que su RNA Total se encuentra puro, las muestras pueden haber sido contaminadas o degradadas durante los posteriores pasos hasta llegar a la RT-qPCR. Además, como ya se ha comentado anteriormente, los valores de absorbancia de todas las muestras son muy pequeñas, reduciendo la significancia de las concentraciones obtenidas. Las bajas absorbancias en la cuantificación de RNA Total pueden indicar que el método de homogeneización utilizado en los tejidos no ha liberado suficiente RNA Total. Esto podría explicar la variación de los valores de  $C_T$  de las mismas muestras respecto a un gen endógeno constante. Por ello, como objetivo de mejora de los resultados obtenidos en este estudio, se aconseja trabajar con una mayor cantidad de tejido para obtener consecuentemente mayor cantidad de RNA Total, o utilizar un método de homogeneización que aumente la eficiencia de obtención de RNA Total respecto al método utilizado. Uno de los ejemplos de métodos que pueden servir para homogeneizar tejido dérmico teniendo en cuenta su dureza es la utilización del homogeneizador QIAshredder.

## CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en el estudio sugieren que la utilización de andamios que contienen el compuesto bioactivo A dan lugar a una alta represión de los genes COL1A1 y VEGF-A. Estos genes están directamente relacionados con la mejora en la regeneración del tejido, y por tanto la represión producida por el compuesto bioactivo A dificulta en mayor medida la curación y cierre de heridas en personas diabéticas. Este resultado es el contrario al esperado en este estudio.

Aun así, debido a la baja validez estadística consecuencia de tener 3 ratones en el grupo experimental y 1 sólo ratón en el grupo control, los resultados obtenidos tienen una pobre normalización y pueden no ser representativos. Además, se han observado variaciones en los valores de  $C_T$  del gen GapdH entre las dos RT-qPCR en la misma muestra. Esto implica que puede haberse degradado o contaminado el RNA Total de estas muestras durante la preparación de las muestras hasta llegar a realizar las RT-qPCR. También se encuentran unos resultados de absorbancia bajos en la cuantificación del RNA Total, disminuyendo la validez de la concentración inicial obtenida. En este caso

se podrían mejorar los resultados de absorbancia aumentando la cantidad de muestra inicial o cambiar el método de homogeneización de las muestras. Otro factor que puede haber aumentado el error y consecuentemente disminuido la validez de los resultados es la falta de experiencia por mi parte a la hora de seguir los protocolos mencionados en este estudio.

Por lo tanto, debido a todos los factores mencionados anteriormente, los resultados obtenidos en este estudio tienen una alta probabilidad de ser inconcluyentes. Para determinar con certeza si el compuesto bioactivo A mejora o no la curación y cierre de heridas en personas diabéticas sería aconsejable repetir el estudio aumentando el número ratones utilizados. También se debería obtener una mayor cantidad de absorbancia en la cuantificación de RNA Total para aumentar la significancia de los resultados, ya sea cambiando el método de homogeneización o aumentando la cantidad de muestra utilizada. Además, todo el tratamiento de las muestras hasta llegar a realizar las RT-qPCR debería realizarse rápida y eficazmente para evitar posibles degradaciones o contaminaciones de las muestras.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bruning, Oskar et al. 2011. "RNA Isolation for Transcriptomics of Human and Mouse Small Skin Biopsies." *BMC Research Notes* 4(1): 438. <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/4/438>.
- Charernsriwilaiwat, Natthan, Theerasak Rojanarata, Tanasait Ngawhirunpat, and Praneet Opanasopit. 2014. "Electrospun Chitosan/Polyvinyl Alcohol Nanofibre Mats for Wound Healing." *International Wound Journal* 11(2): 215–22.
- Cho, Hongkwan et al. 2016. "Diabetic Wound Healing in a MMP9<sup>-/-</sup> Mouse Model." *Wound Repair and Regeneration* 24(5): 829–40.
- Davis, Frank M et al. 2018. "Dysfunctional Wound Healing in Diabetic Foot Ulcers : New Crossroads."
- Deuel, Thomas F., and Yunchao Chang. 2013. *Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition Growth Factors*. Fourth Edi. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-398358-9.00016-1>.
- Ebaid, Hossam et al. 2015. "Camel Milk Peptide Improves Wound Healing in Diabetic Rats by Orchestrating the Redox Status and Immune Response." *Lipids in Health and Disease* 14(1): 1–10. <http://dx.doi.org/10.1186/s12944-015-0136-9>.
- Frykberg, Robert G., and Jaminelli Banks. 2015. "Challenges in the Treatment of Chronic Wounds." *Advances in Wound Care* 4(9): 560–82. <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/wound.2015.0635>.

- Gould, Lisa J. 2016. "Topical Collagen-Based Biomaterials for Chronic Wounds: Rationale and Clinical Application." *Advances in Wound Care* 5(1): 19–31.  
<http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/wound.2014.0595>.
- Greenhalgh, D G, K H Sprugel, M J Murray, and R Ross. 1990. "PDGF and FGF Stimulate Wound Healing in the Genetically Diabetic Mouse." *The American journal of pathology* 136(6): 1235–46.
- Griffin, Donald R. et al. 2015. "Accelerated Wound Healing by Injectable Microporous Gel Scaffolds Assembled from Annealed Building Blocks." *Nature Materials* 14(7): 737–44.
- Guo, Rui et al. 2011. "The Healing of Full-Thickness Burns Treated by Using Plasmid DNA Encoding VEGF-165 Activated Collagen-Chitosan Dermal Equivalents." *Biomaterials* 32(4): 1019–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.087>.
- "How Should I Quantify RNA Isolated with RNeasy Kits? - QIAGEN."  
<https://www.qiagen.com/mx/resources/faq?id=fc31b2a3-f727-4d10-b7cf-444add819597&lang=en> (June 15, 2018).
- "How to Quality Control Check Your RNA Samples - Bitesize Bio."  
<https://bitesizebio.com/13527/how-to-quality-control-check-your-rna-samples/> (June 15, 2018).
- "International Diabetes Federation - IDF 2018 Hyderabad." <https://www.idf.org/our-activities/congress/hyderabad-2018.html> (June 14, 2018).
- Katsanos, G S et al. 2008. "EDITORIAL BIOLOGY OF NEUROTENSIN : REVISITED STUDY " Department Of Experimental Medicine , University Of L ' Aquila , Italy ; ' Clinic Of Infectious Diseases , Perugia , Italy ; " Biology Division , University Of Chieti-Pescara , Chieti , Italy ; " Dept . Med." 21(2): 255–59.
- Koria, P. et al. 2011. "Self-Assembling Elastin-like Peptides Growth Factor Chimeric Nanoparticles for the Treatment of Chronic Wounds." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(3): 1034–39.  
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1009881108>.
- Liu, Han et al. 2014. "A Short Peptide from Frog Skin Accelerates Diabetic Wound Healing." *FEBS Journal* 281(20): 4633–43.
- Liu, Quan et al. 2017. "Acceleration of Skin Regeneration in Full-Thickness Burns by Incorporation of BFGF-Loaded Alginate Microspheres into a CMCS-PVA Hydrogel." *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 11(5): 1562–73.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26118827> (May 14, 2018).
- MacEwan, Matthew R, Sarah MacEwan, Tamas R Kovacs, and Joel Batts. 2017. "What Makes the Optimal Wound Healing Material? A Review of Current Science and Introduction of a Synthetic Nanofabricated Wound Care Scaffold." *Cureus* 9(10).  
<https://www.cureus.com/articles/8632-what-makes-the-optimal-wound-healing-material-a-review-of-current-science-and-introduction-of-a-synthetic-nanofabricated-wound-care-scaffold>.
- Moura, Liane I.F. et al. 2014. "Neurotensin-Loaded Collagen Dressings Reduce Inflammation and Improve Wound Healing in Diabetic Mice." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1842(1): 32–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.10.009>.
- Wang, Tao et al. 2015. "Calcium Alginate Enhances Wound Healing by Up-Regulating the Ratio of Collagen Types I / III in Diabetic Rats." *Int J Clin Exp Pathol* 8(6): 6636–45.

Warren, John J et al. 2017. "HHS Public Access." 44(2): 319–35.

Wassermann, Esther et al. 2009. "A Chronic Pressure Ulcer Model in the Nude Mouse." *Wound Repair and Regeneration* 17(4): 480–84. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1524-475X.2009.00502.x> (May 28, 2018).

Zhao, Xin et al. 2017. "Cell Infiltrative Hydrogel Fibrous Scaffolds for Accelerated Wound Healing." *Acta Biomaterialia* 49: 66–77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.017>.

## AUTOEVALUACIÓN

Antes de empezar a escribir este trabajo esperaba que los procedimientos y resultados obtenidos para el trabajo serían fáciles de realizar, obtener e interpretar, llegando a conclusiones claras sobre el objetivo inicial del trabajo. Sin embargo, la realidad ha sido que los procedimientos realizados han tenido más problemas de los esperados y los resultados obtenidos se han tenido que interpretar de diversas maneras para finalmente llegar a unas conclusiones.

Durante la realización de este trabajo, debido a que lo he realizado basado en las prácticas externas, indirectamente he mejorado significativamente a la hora de comunicar las ideas o dudas con los compañeros de laboratorio y sobre todo con mi supervisora. Además, la necesidad de investigar cómo interpretar los resultados y compararlos con diferentes estudios me ha obligado a aprender los procedimientos realizados y el motivo por el que se realizan. Concretamente, he obtenido una mayor profundidad teórica en lo referente al proceso de la PCR y la cuantificación de RNA mediante un espectrofotómetro, temas que ya había estudiado en varias asignaturas del grado. Estas bases han facilitado mi comprensión de los resultados obtenidos en las RT-qPCR y en la cuantificación del RNA Total.

En el apartado experimental del trabajo, la realización de todo el proceso necesario para llegar a realizar las RT-qPCR me ha otorgado un alto nivel de experiencia que tendrá una gran utilidad en posteriores investigaciones similares.

Entre otros aspectos, creo que principalmente este trabajo ha ayudado a mejorar mi habilidad para redactar en un formato científico, mi capacidad de interpretar y calcular datos obtenidos y a promover el sentido autocrítico en la interpretación de los resultados.

## ANEXOS

**ANEXO 1:** PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RNA TOTAL A PARTIR DE TEJIDO ANIMAL, UTILIZANDO EL KIT RNEASY MINI

**ANEXO 2:** PROTOCOLO DE SÍNTESIS DE CDNA UTILIZANDO EL KIT RT<sup>2</sup> FIRST STRAND

**ANEXO 3:** PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y TERMOCICLADOR PARA LA REALIZACIÓN DE RT-QPCR

# Protocol: Purification of Total RNA from Animal Tissues

This protocol requires the RNeasy Mini Kit or RNeasy Protect Mini Kit.

## Determining the correct amount of starting material

It is essential to use the correct amount of starting material to obtain optimal RNA yield and purity. A maximum amount of 30 mg fresh or frozen tissue or 15–20 mg RNA<sup>later</sup> stabilized tissue (which is partially dehydrated) can generally be processed. For most tissues, the RNA binding capacity of the RNeasy spin column and the lysing capacity of Buffer RLT will not be exceeded by these amounts. Average RNA yields from various tissues are given in Table 2 (page 17).

Some tissues, such as spleen, parts of brain, lung, and thymus are more difficult to lyse or tend to form precipitates during RNA purification. The volume of Buffer RLT may need to be increased to facilitate complete homogenization and to avoid significantly reduced RNA yields, DNA contamination, or clogging of the RNeasy spin column. See the procedure below for details.

RNA yields from fibrous tissues, such as skeletal muscle, heart, and skin, may be low due to the abundance of contractile proteins, connective tissue, and collagen. For maximum RNA yields from these tissues, we recommend using the RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit instead. See page 74 for ordering information.

Greater RNA yields from fatty tissues, such as brain and adipose tissue, can be achieved using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit, which uses QIAzol Lysis Reagent for optimal tissue lysis. See page 74 for ordering information.

If there is no information about the nature of your starting material, we recommend starting with no more than 10 mg tissue. Depending on RNA yield and purity, it may be possible to use up to 30 mg tissue in subsequent preparations.

**Do not overload the RNeasy spin column, as this will significantly reduce RNA yield and quality.**

Weighing tissue is the most accurate way to quantitate the amount of starting material. As a guide, a 3 mm cube (27 mm<sup>3</sup>) of most animal tissues weighs 30–35 mg.

## Important points before starting

- If using the RNeasy Kit for the first time, read “Important Notes” (page 16).
- If working with RNA for the first time, read Appendix A (page 61).
- **For optimal results, stabilize harvested tissues immediately in RNA<sup>later</sup> RNA Stabilization Reagent (see protocol on page 34).** Tissues can be stored in the reagent for up to 1 day at 37°C, 7 days at 15–25°C, or 4 weeks at 2–8°C, or archived at –20°C or –80°C.

- Fresh, frozen, or RNA*later* stabilized tissues can be used. Tissues can be stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  for several months. Flash-freeze tissues in liquid nitrogen, and immediately transfer to  $-70^{\circ}\text{C}$ . Do not allow tissues to thaw during weighing or handling prior to disruption in Buffer RLT. Homogenized tissue lysates from step 4 can also be stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  for several months. Incubate frozen lysates at  $37^{\circ}\text{C}$  in a water bath until completely thawed and salts are dissolved before continuing with step 5. Avoid prolonged incubation, which may compromise RNA integrity.
- If desired, more than 30 mg tissue can be disrupted and homogenized at the start of the procedure (increase the volume of Buffer RLT proportionately). Use a portion of the homogenate corresponding to no more than 30 mg tissue for RNA purification, and store the rest at  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- Buffer RLT may form a precipitate upon storage. If necessary, redissolve by warming, and then place at room temperature ( $15\text{--}25^{\circ}\text{C}$ ).
- Buffer RLT and Buffer RW1 contain a guanidine salt and are therefore not compatible with disinfecting reagents containing bleach. See page 6 for safety information.
- Perform all steps of the procedure at room temperature. During the procedure, work quickly.
- Perform all centrifugation steps at  $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$  in a standard microcentrifuge. Ensure that the centrifuge does not cool below  $20^{\circ}\text{C}$ .

### Things to do before starting

- $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) must be added to Buffer RLT before use. Add  $10\ \mu\text{l}$   $\beta$ -ME per 1 ml Buffer RLT. Dispense in a fume hood and wear appropriate protective clothing. Buffer RLT containing  $\beta$ -ME can be stored at room temperature ( $15\text{--}25^{\circ}\text{C}$ ) for up to 1 month.  
Alternatively, add  $20\ \mu\text{l}$  of 2 M dithiothreitol (DTT) per 1 ml Buffer RLT. The stock solution of 2 M DTT in water should be prepared fresh or frozen in single-use aliquots. Buffer RLT containing DTT can be stored at room temperature for up to 1 month.
- Buffer RPE is supplied as a concentrate. Before using for the first time, add 4 volumes of ethanol (96–100%) as indicated on the bottle to obtain a working solution.
- If performing optional on-column DNase digestion, prepare DNase I stock solution as described in Appendix D (page 67).

## Procedure

- 1. Excise the tissue sample from the animal or remove it from storage. Remove RNA $later$  stabilized tissues from the reagent using forceps. Determine the amount of tissue. Do not use more than 30 mg.**

Weighing tissue is the most accurate way to determine the amount.

**Note:** If the tissues were stored in RNA $later$  Reagent at  $-20^{\circ}\text{C}$ , be sure to remove any crystals that may have formed.

- 2. Follow either step 2a or 2b.**

- 2a. For RNA $later$  stabilized tissues:**

**If using the entire tissue, place it directly into a suitably sized vessel for disruption and homogenization, and proceed to step 3.**

**If using only a portion of the tissue, cut it on a clean surface. Weigh the piece to be used, and place it into a suitably sized vessel for disruption and homogenization. Proceed to step 3.**

RNA in RNA $later$  stabilized tissues is protected during cutting and weighing of tissues at ambient temperature ( $15$ – $25^{\circ}\text{C}$ ). It is not necessary to cut the tissues on ice or dry ice or in a refrigerated room. Remaining tissues can be stored in RNA $later$  RNA Stabilization Reagent. Previously stabilized tissues can be stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  without the reagent.

- 2b. For unstabilized fresh or frozen tissues:**

**If using the entire tissue, place it directly into a suitably sized vessel for disruption and homogenization, and proceed immediately to step 3.**

**If using only a portion of the tissue, weigh the piece to be used, and place it into a suitably sized vessel for disruption and homogenization. Proceed immediately to step 3.**

RNA in harvested tissues is not protected until the tissues are treated with RNA $later$  RNA Stabilization Reagent, flash-frozen, or disrupted and homogenized in step 3. Frozen tissues should not be allowed to thaw during handling. The relevant procedures should be carried out as quickly as possible.

**Note:** Remaining fresh tissues can be placed into RNA $later$  RNA Stabilization Reagent to stabilize RNA (see protocol on page 34). However, previously frozen tissues thaw too slowly in the reagent, preventing the reagent from diffusing into the tissues quickly enough to prevent RNA degradation.

**3. Disrupt the tissue and homogenize the lysate in Buffer RLT (do not use more than 30 mg tissue) according to step 3a, 3b, 3c, or 3d.**

See “Disrupting and homogenizing starting material”, pages 18–21, for more details on disruption and homogenization.

**Note:** Ensure that  $\beta$ -ME is added to Buffer RLT before use (see “Things to do before starting”).

After storage in RNA*later* RNA Stabilization Reagent, tissues may become slightly harder than fresh or thawed tissues. Disruption and homogenization using standard methods is usually not a problem. For easier disruption and homogenization, we recommend using 600  $\mu$ l Buffer RLT.

**Note:** Incomplete homogenization leads to significantly reduced RNA yields and can cause clogging of the RNeasy spin column. Homogenization with the TissueLyser LT, TissueLyser II, and rotor–stator homogenizers generally results in higher RNA yields than with other methods.

**Table 8. Volumes of Buffer RLT for tissue disruption and homogenization**

Amount of starting material (mg)	Volume of Buffer RLT ( $\mu$ l)
<20	350 or 600*
20–30	600

\* Use 600  $\mu$ l Buffer RLT for tissues stabilized in RNA*later* RNA Stabilization Reagent or for difficult-to-lyse tissues.

**3a. Disruption and homogenization using a rotor–stator homogenizer:**

Place the weighed (fresh, frozen, or RNA*later* stabilized) tissue in a suitably sized vessel. Add the appropriate volume of Buffer RLT (see Table 8). Immediately disrupt and homogenize the tissue using a conventional rotor–stator homogenizer until it is uniformly homogeneous (usually 20–40 s). Proceed to step 4.

**3b. Disruption using a mortar and pestle followed by homogenization using a QIAshredder homogenizer:**

Immediately place the weighed (fresh, frozen, or RNA*later* stabilized) tissue in liquid nitrogen, and grind thoroughly with a mortar and pestle. Decant tissue powder and liquid nitrogen into an RNase-free, liquid-nitrogen-cooled, 2 ml microcentrifuge tube (not supplied). Allow the liquid nitrogen to evaporate, but do not allow the tissue to thaw.

Add the appropriate volume of Buffer RLT (see Table 8). Pipet the lysate directly into a QIAshredder spin column placed in a 2 ml collection tube, and centrifuge for 2 min at full speed. Proceed to step 4.

- 3c. **Disruption using a mortar and pestle followed by homogenization using a needle and syringe:**

Immediately place the weighed (fresh, frozen, or RNA/later stabilized) tissue in liquid nitrogen, and grind thoroughly with a mortar and pestle. Decant tissue powder and liquid nitrogen into an RNase-free, liquid-nitrogen-cooled, 2 ml microcentrifuge tube (not supplied). Allow the liquid nitrogen to evaporate, but do not allow the tissue to thaw.

Add the appropriate volume of Buffer RLT (see Table 8), and homogenize by passing the lysate at least 5 times through a blunt 20-gauge needle fitted to an RNase-free syringe. Proceed to step 4.

- 3d. **Disruption and homogenization using the TissueLyser LT or TissueLyser II:**  
See the *TissueLyser LT Handbook* or the *TissueLyser Handbook*. Then proceed to step 4.

4. **Centrifuge the lysate for 3 min at full speed. Carefully remove the supernatant by pipetting, and transfer it to a new microcentrifuge tube (not supplied). Use only this supernatant (lysate) in subsequent steps.**

In some preparations, very small amounts of insoluble material will be present after the 3 min centrifugation, making the pellet invisible.

5. **Add 1 volume of 70% ethanol\* to the cleared lysate, and mix immediately by pipetting. Do not centrifuge. Proceed immediately to step 6.**

**Note:** The volume of lysate may be less than 350  $\mu$ l or 600  $\mu$ l due to loss during homogenization and centrifugation in steps 3 and 4.

**Note:** Precipitates may be visible after addition of ethanol. This does not affect the procedure.

6. **Transfer up to 700  $\mu$ l of the sample, including any precipitate that may have formed, to an RNeasy spin column placed in a 2 ml collection tube (supplied). Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm). Discard the flow-through.<sup>†</sup>**

Reuse the collection tube in step 7.

If the sample volume exceeds 700  $\mu$ l, centrifuge successive aliquots in the same RNeasy spin column. Discard the flow-through after each centrifugation.<sup>†</sup>

**Optional:** If performing optional on-column DNase digestion (see “Eliminating genomic DNA contamination”, page 21), follow steps D1–D4 (page 67) after performing this step.

\* Using 50% ethanol (instead of 70% ethanol) may increase RNA yields from liver samples.

<sup>†</sup> Flow-through contains Buffer RLT or Buffer RW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 6 for safety information.

- 7. Add 700  $\mu$ l Buffer RW1 to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm) to wash the spin column membrane. Discard the flow-through.\***

Reuse the collection tube in step 8.

**Note:** After centrifugation, carefully remove the RNeasy spin column from the collection tube so that the column does not contact the flow-through. Be sure to empty the collection tube completely.

Skip this step if performing optional on-column DNase digestion (page 67).

- 8. Add 500  $\mu$ l Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm) to wash the spin column membrane. Discard the flow-through.**

Reuse the collection tube in step 9.

**Note:** Buffer RPE is supplied as a concentrate. Ensure that ethanol is added to Buffer RPE before use (see “Things to do before starting”).

- 9. Add 500  $\mu$ l Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 2 min at  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm) to wash the spin column membrane.**

The long centrifugation dries the spin column membrane, ensuring that no ethanol is carried over during RNA elution. Residual ethanol may interfere with downstream reactions.

**Note:** After centrifugation, carefully remove the RNeasy spin column from the collection tube so that the column does not contact the flow-through. Otherwise, carryover of ethanol will occur.

- 10. Optional: Place the RNeasy spin column in a new 2 ml collection tube (supplied), and discard the old collection tube with the flow-through. Close the lid gently, and centrifuge at full speed for 1 min.**

Perform this step to eliminate any possible carryover of Buffer RPE, or if residual flow-through remains on the outside of the RNeasy spin column after step 9.

- 11. Place the RNeasy spin column in a new 1.5 ml collection tube (supplied). Add 30–50  $\mu$ l RNase-free water directly to the spin column membrane. Close the lid gently, and centrifuge for 1 min at  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm) to elute the RNA.**
- 12. If the expected RNA yield is  $>30 \mu$ g, repeat step 11 using another 30–50  $\mu$ l RNase-free water, or using the eluate from step 11 (if high RNA concentration is required). Reuse the collection tube from step 11.**

If using the eluate from step 11, the RNA yield will be 15–30% less than that obtained using a second volume of RNase-free water, but the final RNA concentration will be higher.

\* Flow-through contains Buffer RLT or Buffer RW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 6 for safety information.

## Protocol: cDNA Synthesis Using the RT<sup>2</sup> First Strand Kit

Use of the RT<sup>2</sup> First Strand Kit is critical for obtaining optimal results and for detection of the reverse transcription controls contained in the RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array. If using the Fluidigm BioMark real-time PCR system, refer to page 42 for the cDNA synthesis protocol and for sample/plate preparation instructions.

### Important points before starting

- Use the same amount of total RNA for reverse transcription of each sample. First-time users are recommended to start with 0.5  $\mu\text{g}$  total RNA for 96-well plate formats, 0.8  $\mu\text{g}$  total RNA for Rotor-Disc 100 formats, 400 ng total RNA for format E and G 384 (4 x 96) option, or 1  $\mu\text{g}$  total RNA for format E and G 384 HT option. Use of less than 100 ng RNA will result in a high rate of false negatives. If  $\leq 100$  ng RNA is available, refer to the *RT<sup>2</sup> PreAMP cDNA Synthesis Handbook*. Use of more than the recommended amount of RNA may potentially overload the system.
- **Do not** use DEPC-treated water. Use high-quality, nuclease-free water.
- The RT<sup>2</sup> First Stand Kit is not compatible with the chemicals in DNA-free™ kits from Ambion. If your RNA sample has been treated with DNA-free reagents, contact QIAGEN Technical Service.

### Procedure

1. **Thaw the reagents of the RT<sup>2</sup> First Strand Kit. Briefly centrifuge (10–15 s) to bring the contents to the bottom of the tubes.**
2. **Prepare the genomic DNA elimination mix for each RNA sample according to Table 1. Mix gently by pipetting up and down and then centrifuge briefly.**

**Table 1. Genomic DNA elimination mix**

Component	Amount
RNA*	25 ng–5 $\mu\text{g}$
Buffer GE	2 $\mu\text{l}$
RNase-free water	Variable
<b>Total volume</b>	<b>10 <math>\mu\text{l}</math></b>

\* If using the kit for the first time, use the RNA amount recommended in “Important points before starting” above.

3. Incubate the genomic DNA elimination mix for 5 min at 42°C, then place immediately on ice for at least 1 min.
4. Prepare the reverse-transcription mix according to Table 2.

**Table 2. Reverse-transcription mix**

Component	Volume for 1 reaction	Volume for 2 reactions	Volume for 4 reactions
5x Buffer BC3	4 $\mu$ l	8 $\mu$ l	16 $\mu$ l
Control P2	1 $\mu$ l	2 $\mu$ l	4 $\mu$ l
RE3 Reverse Transcriptase Mix	2 $\mu$ l	4 $\mu$ l	8 $\mu$ l
RNase-free water	3 $\mu$ l	6 $\mu$ l	12 $\mu$ l
<b>Total volume</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>	<b>40 <math>\mu</math>l</b>

5. Add 10  $\mu$ l reverse-transcription mix to each tube containing 10  $\mu$ l genomic DNA elimination mix. Mix gently by pipetting up and down.
6. Incubate at 42°C for exactly 15 min. Then immediately stop the reaction by incubating at 95°C for 5 min.
7. Add 91  $\mu$ l RNase-free water to each reaction. Mix by pipetting up and down several times.
8. Place the reactions on ice and proceed with the real-time PCR protocol.

If you wish to store the reactions prior to real-time PCR, transfer them to a –15 to –30°C freezer.

For quality control analysis using the RT<sup>2</sup> RNA QC PCR Array, follow the protocol in the *RT<sup>2</sup> RNA QC PCR Array Handbook* using a 6  $\mu$ l aliquot of the diluted cDNA template.

---

# Protocol: Real-Time PCR Using RT<sup>2</sup> qPCR Primer Assays and RT<sup>2</sup> SYBR Green Mastermixes

## Important points before starting

- Ensure that the RT<sup>2</sup> SYBR Green Mastermix is suitable for your real-time cycler (see page 8).
- For accuracy and precision, ensure that micropipettors are calibrated before beginning the protocol. Be sure not to introduce bubbles into wells/tubes when pipetting.
- Do not use DEPC-treated water. Use high-quality, nuclease-free water.
- If precipitates are present in the Mastermix tubes, warm the reagents at 42°C for 1 min and vortex briefly to dissolve. Repeat if necessary.
- To ensure that each experimental sample yields a reliable detectable C<sub>T</sub> value in real-time PCR, we recommend using 1 µl of the undiluted cDNA template for each 25 µl qPCR reaction. To calculate the experimental variability, prepare at least three qPCR reactions for each qPCR assay.
- For every experimental sample, prepare reactions for every gene of interest and for a single housekeeping gene or a set of housekeeping genes to normalize the raw data. Choose housekeeping gene(s) known to not change their expression under the experimental conditions.
- Prepare a positive control reaction using template known to represent the genes of interest, such as template generated from XpressRef Universal Total RNA.
- To control for DNA contamination introduced during reaction setup, prepare a no template control (NTC) reaction replacing template with water.
- To control for genomic DNA contamination, perform one assay for each gene of interest and each housekeeping gene using an equivalent volume of product from the no reverse transcription (NRT) reaction performed for each RNA sample.

Optional: Generate a standard curve for each gene of interest and housekeeping gene(s). To generate a standard curve, prepare a 5-point series of 5- or 10-fold dilutions in duplicate using a template known to represent the genes of interest, such as template generated from XpressRef Universal Total RNA.

## Procedure

1. Briefly centrifuge the RT<sup>2</sup> SYBR Green Mastermix, RT<sup>2</sup> qPCR Primer Assay, and cDNA synthesis reaction (10–15 s) to bring the contents to the bottom of the tubes.

**Note:** As the RT<sup>2</sup> SYBR Green Mastermix contains HotStart DNA Taq Polymerase that is active only after heat activation, reactions can be prepared at room temperature (15–25°C).

2. Prepare the PCR components mix in a 5 ml tube, as indicated in Table 3.

**Table 3. PCR components mix for one reaction**

Component	Volume
RT <sup>2</sup> SYBR Green Mastermix	12.5 µl
cDNA synthesis reaction	1 µl
RT <sup>2</sup> qPCR Primer Assay (10 µM stock)	1 µl
RNase-free water	10.5 µl
<b>Total volume</b>	<b>25 µl</b>

**Note:** If performing multiple reactions, prepare a mix containing RT<sup>2</sup> SYBR Green Mastermix, RT<sup>2</sup> qPCR Primer Assay and RNase-free water by scaling up the volumes shown in Table 3. Prepare 10% more mix than is required to allow for pipetting errors (i.e., for 96 reactions, prepare enough PCR components mix for 106 reactions). Add the mix to the cDNA synthesis reactions using a repeat pipet.

- Briefly centrifuge the PCR components mix and place the tube(s) into the real-time cyclers.

If using plates instead of tubes, centrifuge the plate for 1 min at 1000 g to remove bubbles.

- Program the real-time cycler according to Table 4, 5 or 6, depending on the real-time cycler used. Run the program.

**Note:** For additional help with instrument setup, see our Instrument-Specific Setup Instructions and Protocol Files at [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

**Table 4. Cycling conditions\* for Applied Biosystems, Bio-Rad†, Stratagene and Eppendorf‡ cyclers**

Cycles	Duration	Temperature	Comments
1	10 min	95°C	HotStart DNA Taq Polymerase is activated by this heating step
40	15 s	95°C	Perform fluorescence data collection
	1 min	60°C	

\* Recommended for the following cyclers: Applied Biosystems models 5700, 7000, 7300, 7500, 7700, 7900HT, 7900 HT FAST 384-well block, StepOnePlus, QuantiStudio 384-well block, ViiA7 384-well block; Bio-Rad models iCycler, iQ5, MyiQ, MyiQ2, CFX96, CFX384; Stratagene models Mx3000P, Mx3005P, Mx4000P; Eppendorf Mastercycler ep realplex models 2, 2S, 4, 4S.

† For Bio-Rad models CFX96 and CFX384: adjust the ramp rate to 1°C/s.

‡ For Eppendorf Mastercycler ep realplex models 2, 2S, 4, and 4S: for the Silver Thermoblock, adjust the ramp rate to 26%; for the Aluminum Thermoblock, adjust the ramp rate to 35%. Refer to the Instrument Setup Guide at [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) for detailed setup instructions.

**Table 5. Cycling conditions for Roche cyclers\***

Cycles	Duration	Temperature	Comments
1	10 min	95°C	HotStart DNA Taq Polymerase is activated by this heating step
45	15 s	95°C	Perform fluorescence data collection Adjust the ramp rate to 1°C/s.
	1 min	60°C	

\* Recommended for the Roche LightCycler 480 96 and 384-well blocks. If using a Roche LightCycler 480 II, adjust the ramp rate to 1.8°C/s. Refer to the "Instrument Setup Guide" at [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) for more information on other required changes to settings for Melt Curve Acquisition.

**Table 6. Cycling conditions for Bio-Rad and Takara cyclers and all other cyclers\***

Cycles	Duration	Temperature	Comments
1	10 min	95°C	HotStart DNA Taq Polymerase is activated by this heating step
40	15 s	95°C	Perform fluorescence data collection Different cyclers need different lengths of time to detect the fluorescent signal. Choose the appropriate time for the annealing step (55°C) for your cycler
	30–40 s	55°C	
	30 s	72°C	

\* Recommended for the following cyclers: Bio-Rad / MJ Research models Chromo4, DNA Engine Opticon, DNA Engine Opticon 2; Takara TP-800; all other cyclers.

5. Recommended: Perform dissociation (melting) curve analysis to verify PCR specificity. Run a melting curve program and generate a first derivative dissociation curve for each well using the real-time cycler software. A single peak should appear in each reaction at temperatures greater than 80°C.

**Note:** If your instrument does not have a default melting curve program, run the following program instead: 95°C, 1 min; 65°C, 2 min (optics off); 65°C to 95°C at 2°C/min (optics on).

**Note:** For cycler-specific melting curve analysis settings, please refer to the Instrument Setup Guide for your cycler at [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

**Note:** Reactions can be stored at –20°C wrapped in aluminum foil and melting curve analysis performed at a later time. When ready to perform melting curve analysis, warm the tube to room temperature (15–25°C), place it in the real-time cycler, and run the melting curve analysis program.

6. Optional: agarose gel electrophoresis analysis can be performed if necessary for troubleshooting purposes.

No more than one band should be visible in each lane. The RT<sup>2</sup> qPCR Primer Assay Product Sheet details the expected size of the PCR product.