

**DESARROLLO DE UN MÉTODO OPTIMIZADO DE EXTRACCIÓN DE RNA A
PARTIR DE MUESTRAS DE SANGRE**

Leidy Patricia Cristancho Maldonado

Universidad Industrial De Santander

Facultad de ciencias

Escuela de química

Bucaramanga

2017

**DESARROLLO DE UN MÉTODO OPTIMIZADO DE EXTRACCIÓN DE RNA A
PARTIR DE MUESTRAS DE SANGRE**

**Trabajo de grado para optar al título de
Químico**

AUTOR:

Leidy Patricia Cristancho Maldonado

DIRECTOR:

Herman José Arteaga, MD, PhD

CODIRECTOR:

Hermisul de Jesus Cano Calle, PhD

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2017

A mi madre

*Por ser pilar fundamental en todo lo que soy,
por su esfuerzo, su compañía,
su apoyo en todo momento, sus consejos
y motivación constante en cada paso de mi camino*

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por sus aportes invaluable, su tiempo y cariño, especialmente por todo su apoyo en el desarrollo y evolución de mi tesis.

A cada uno mis amigos, aun a aquellos que ya no están, por su compañía durante toda mi carrera universitaria, por sus risas, sus molestias y todos los momentos vividos que han hecho de esta experiencia algo único.

A la escuela de química, al personal administrativo y especialmente a mis docentes por su gran esfuerzo y dedicación en mi proceso de formación académica y personal.

Y por último a mi director, el Dr. Herman José Arteaga y mi codirector, el Hermisul de Jesus Cano Calle, por su paciencia, consejos y acompañamiento en el desarrollo de mi tesis de grado.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	15
1. OBJETIVOS.....	18
1.1. OBJETIVO GENERAL.....	18
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
2. ANTECEDENTES.....	19
3. MARCO TEÓRICO.....	24
3.1. MATERIAL GENÉTICO Y ÁCIDOS NUCLEICOS.....	24
3.1.1. DNA.....	27
3.1.2. RNA.....	28
3.1.2.1. RNA mensajero (mRNA).....	33
3.1.2.2. RNA ribosómico (rRNA).....	35
3.1.2.3. RNA de transferencia (tRNA).....	36
3.1.2.4. Otros tipos de RNA.....	39
3.2. QUÍMICA DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS.....	41
3.2.1. Apilamiento de bases.....	42
3.2.2. Desnaturalización de ácidos nucleicos.....	42
3.2.3. Transformaciones no enzimáticas.....	43
3.2.4. Reactividad química.....	44
3.2.4.1. Hidroxilamina (NH ₂ OH).....	44

3.2.4.2.	Hidrolisis del enlace β – N – glicosídico.....	45
3.2.4.3.	Hidrolisis del enlace fosfodiester.....	45
3.3.	MANIPULACIÓN, EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RNA.....	46
3.3.1.	Condiciones físicas y químicas para la manipulación de RNA.....	46
3.3.2.	Técnicas de extracción de RNA.....	49
3.3.3.	Técnica básica.....	50
3.3.3.1.	Parámetros críticos.....	51
3.3.3.2.	Resultados previstos.....	52
3.3.4.	Cuantificación del RNA.....	53
3.3.5.	Métodos comerciales.....	55
3.3.5.1.	RNeasy mini kit.....	55
3.3.5.2.	PureLink miRNA Isolation estuche.....	56
3.3.5.3.	Trisure y TRIzol LS.....	58
3.3.6.	Ventajas y desventajas de los métodos de extracción del RNA.....	59
4.	METODOLOGÍA.....	60
4.1.	REACTIVOS Y EQUIPOS.....	60
4.2.	MÉTODOS EXPERIMENTALES.....	60
4.2.1.	Preparación de la muestra.....	62
4.2.1.1.	Separación de glóbulos blancos (separación por gradientes de densidad, FICOLL – HYPAQUE).....	62
4.2.1.2.	Tampón de lisis.....	62
4.2.1.3.	Sangre total.....	63
4.2.1.4.	Proteinasa K.....	63
4.2.2.	Extracción del RNA.....	63
4.2.2.1.	Trisure.....	63
4.2.2.2.	Trisure modificado.....	64
4.2.2.3.	TRIzol LS.....	64
4.2.2.4.	TRIzol LS modificado.....	64

4.2.3. Precipitación y purificación del extracto.....	65
4.2.3.1. Protocolo tradicional.....	65
4.2.3.2. Protocolo tradicional modificado.....	65
4.2.3.3. Protocolo utilizando columnas de sílice.....	66
4.3. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	66
4.3.1. Cuantificación del RNA.....	66
4.3.2. Electroforesis.....	67
5. RESULTADOS.....	68
5.1. SEPARACIÓN POR GRADIENTE DE DENSIDAD, FICOLL-HYPAQUE...	68
5.2. TAMPÓN DE LISIS.....	74
5.3. SANGRE TOTAL.....	76
5.4. PROTEINASA K.....	85
5.5. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.....	90
6. CONCLUSIONES.....	92
7. RECOMENDACIONES.....	94
BIBLIOGRAFÍA.....	96

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Ventajas y desventajas de los métodos de extracción de RNA	59
Tabla 2. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 1.	69
Tabla 3. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 2.	70
Tabla 4. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 3.	71
Tabla 5. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 4.	71
Tabla 6. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 5.	73
Tabla 7. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 6.	73
Tabla 8. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 7.	74
Tabla 9. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 8.	75
Tabla 10. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 9.	77
Tabla 11. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 10.	77
Tabla 12. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 11.	78
Tabla 13. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 12.	79
Tabla 14. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 13.	80
Tabla 15. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 14.	81
Tabla 16. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 15.	81
Tabla 17. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 16.	82
Tabla 18. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 17.	83

Tabla 19. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 18.	84
Tabla 20. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 19.	84
Tabla 21. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 20.	85
Tabla 22. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 21.	87
Tabla 23. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 22.	87
Tabla 24. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 23.	88
Tabla 25. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 24.	88
Tabla 26. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 25.	89
Tabla 27. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 26.	89
Tabla 28. Protocolos de extracción de RNA que mostraron los mejores resultados	90

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Componentes básicos de los ácidos nucleicos	26
Figura 2. Estructura del DNA	28
Figura 3. Estructuras del RNA	32
Figura 4. mRNA procariota y eucariota	34
Figura 5. Estructuras de los rRNAs	36
Figura 6. Estructura del tRNA y sitio de unión de este al ribosoma	38
Figura 7. Proceso de traducción del código genético	38
Figura 8. Modificación química mediada por Hidroxilamina	44
Figura 9. Hidrolisis del enlace fosfodiéster	45
Figura 10. Electroforesis esperada de un RNA de buena calidad	52
Figura 11. Espectros UV – VIS de muestras de RNA	54
Figura 12. Protocolos de extracción con estuches comerciales	57
Figura 13. Diagrama experimental	61
Figura 14. Electroforesis protocolos 4,20 y 26 antes de DNAsas	91
Figura 15. Electroforesis de RNA obtenido mediante los protocolos 4,20 y 26 después de digestión con DNAsas	91

RESUMEN

TITULO: DESARROLLO DE UN MÉTODO OPTIMIZADO DE EXTRACCIÓN DE RNA A PARTIR DE MUESTRAS DE SANGRE *

AUTOR: LEIDY PATRICIA CRISTANCHO MALDONADO **

PALABRAS CLAVE: Sangre total, extracción de RNA, Trisure, TRIzol LS, columnas sílice

DESCRIPCIÓN

Actualmente existe una gran necesidad de obtener cantidades altas de RNA de buena calidad, a partir de diferentes fuentes, para un creciente número de aplicaciones en diversas áreas de trabajo. Varias casas comerciales han desarrollado estuches diseñados especialmente para la obtención de RNA de un tipo específico de muestra, e inclusive, para una aplicación determinada. Sin embargo estos reactivos no son siempre asequibles a toda la comunidad científica, en parte, debido a su alto costo. La sangre periférica es una de las principales fuentes de RNA y su obtención, transporte y almacenamiento son difíciles, especialmente durante trabajos de campo. Por lo anterior, se hace necesario el desarrollo de metodologías eficientes, accesibles a la mayor cantidad posible de investigadores y que requieran pequeñas cantidades de muestra.

Con el fin de obtener una metodología eficiente y de bajo costo para la extracción de RNA, a partir de sangre periférica total, se optimizaron los pasos de lisis, extracción y purificación, de este procedimiento, basándonos en los principios básicos del método clásico de un solo paso, desarrollado por Chomczynski y Sacchi y adoptando nuevas tecnologías y procedimientos mejorados, propuestos por otros autores. Mediante este procedimiento se diseñaron diversos protocolos de extracción de RNA de sangre periférica total, los cuales combinan procesos mejorados para cada uno de los pasos de la técnica. Estos protocolos permitieron obtener una producción altamente eficiente de RNA de buena calidad, en menor tiempo y a partir de una pequeña cantidad de muestra.

El protocolo que presento mejores resultados permitió alcanzar un rendimiento de 512 μg de RNA, con una pureza dentro de los rangos establecidos para muestras de alta calidad ($A_{260}/A_{280}=1,86 \pm 0,02$ y $A_{260}/A_{230} =1,96 \pm 0,04$) y por ende aptos para posteriores aplicaciones.

*Trabajo de grado

**Universidad Industrial de Santander. Facultad de ciencias. Escuela de Química. Director: Herman José Arteaga, MD, PhD; Coodirector: Hermisul de Jesus Cano Calle, PhD

ABSTRACT

TITLE: DEVELOPMENT OF AN OPTIMIZED RNA EXTRACTION METHOD FROM BLOOD SAMPLES *

AUTHOR: LEIDY PATRICIA CRISTANCHO MALDONADO **

KEYWORDS: Total blood, RNA extraction, Trisure, TRIzol LS, silica columns

DESCRIPTION

There is a great need for obtaining good amounts of high quality RNA, from different sources, for a growing number of applications in various work fields. Several companies have developed commercial kits, specially designed to obtain RNA from specific type of samples, and even, for a specific application. However, these reagents are not always affordable to all the scientific community. Peripheral blood is a major source of RNA and its acquisition, transport and storage is difficult, especially at field work. Therefore, it is necessary to develop efficient methods of RNA extraction, requiring small samples and accessible to as many researchers as possible.

To obtain an efficient and low-cost method for RNA extraction from total peripheral blood, the steps of this procedure for lysis, extraction and purification, were optimized, based on the basic principles of the one step-classical method developed by Chomczynski and Sacchi and adopting new technologies and improved protocols, proposed by other authors. By this approach, various RNA extraction protocols, from peripheral blood, were designed, which combine the best improved procedures for each step. These methods allowed to obtain a highly efficient production of high quality RNA, in the shortest possible time and from a small amount of sample.

The best developed protocol allowed to reach a 512 μg of RNA yield, with a purity within the established ranges for high quality samples ($A_{260} / A_{280} = 1,86 \pm 0,02$ and $A_{260} / A_{230} = 1,96 \pm 0.04$) and therefore suitable for downstream applications.

*Degree work

** Science Faculty. School of Chemistry. Director: Herman José Arteaga, MD, PhD; Co-Director: Hermisul de Jesus Cano Calle, PhD

INTRODUCCIÓN

Desde los descubrimientos de los ácidos ribonucleicos catalíticos (RNA catalítico) en la década de 1980 y del fenómeno de la interferencia de RNA (RNAi) a finales de 1990, la comprensión biológica del RNA ha evolucionado desde el simple papel de intermediario en la transferencia de información entre el ácido desoxirribonucleico (DNA) y las proteínas, a una molécula dinámica y versátil que juega un papel mucho más funcional y es responsable de una multitud de procesos biológicos esenciales.⁵

En los últimos 20 años el RNA ha sido el objeto de cuatro descubrimientos ganadores de premios Nobel (por los descubrimientos de el RNA catalítico en 1989, el mecanismo de corte y empalme en 1993, el RNAi en 2006 y la estructura ribosomal en 2009). Estos descubrimientos han mostrado que el RNA es un componente celular importante, con implicaciones sobre la evolución y la herencia. El descubrimiento de la actividad catalítica del RNA ha llevado a considerar la posibilidad de que los orígenes de la vida y su posterior diversificación fueron eventos mediados por el RNA.⁶

Por otra parte, la participación generalizada de RNA en la regulación de la expresión génica le confieren un gran potencial, bien sea como blanco o agente terapéutico. Hasta la fecha se han desarrollado, al menos, 4 tipos de agentes terapéuticos basados en moléculas de RNA, según su mecanismo de acción: (i) los inhibidores de la traducción del mRNA (RNA anti sentido), (ii) los agentes interferentes de RNA (RNAi), (iii) las moléculas de RNA con actividad catalítica (ribozimas) y (iv) el RNA con capacidad de unión a proteínas y otros ligandos moleculares (aptámeros). A pesar de los obstáculos encontrados, más de 50 aplicaciones de RNA o derivados de RNA terapéuticos han llegado a la fase de ensayos clínicos. Estos resultados,

⁵ SHARP, Phillip A. The centrality of RNA. *Cell*, 2009, vol. 136, no 4, p. 577-580

⁶ LEHMAN, Niles. RNA in evolution. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2010, vol. 1, no 2, p. 202-213.

junto a las nuevas técnicas de generación masiva de información, basadas en el secuenciamiento y la identificación de transcritos de RNA, refuerzan la importancia de la investigación y desarrollo de innovación sobre RNA y han llamado la atención de las industrias farmacéuticas y biotecnológicas.⁷

Debido a lo anterior, actualmente se requiere de la disponibilidad de técnicas apropiadas para la purificación de cantidades relativamente grandes de RNA de buena calidad. Por lo tanto se ha hecho necesario mejorar la escala de aislamiento y producción, así como los protocolos de purificación de RNA, para un creciente número de estudios que involucran diversos tipos de muestras biológicas. Procesos optimizados, simplificados y económicamente competitivos, para el aislamiento y purificación, a gran escala, de RNA de buena calidad, son requeridos por distintos laboratorios, especialmente de países en desarrollo.

Actualmente, todas las técnicas de extracción de RNA, aun las que utilizan kits comerciales, conllevan pasos críticos y de alta dificultad debido a la gran degradabilidad de esta molécula, como consecuencia de su peculiar estructura química, la cual puede poner en peligro su estabilidad química y funcionalidad biológica, limitando su utilidad para aplicaciones posteriores, especialmente la investigación de campo.⁸

La sangre periférica ha sido considerada como una de las fuentes de RNA más valiosa y menos invasivas. Con el desarrollo de las denominadas tecnologías *ómicas*, el RNA sanguíneo ha sido cada vez más utilizado en aplicaciones de alto rendimiento como la determinación de perfiles de expresión génica o la secuenciación de transcriptomas.⁹

⁷ BURNETT, John C.; ROSSI, John J. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chemistry & biology*, 2012, vol. 19, no 1, p. 60-71.

⁸ MARTINS, R.; QUEIROZ, J. A.; SOUSA, F. Ribonucleic acid purification. *Journal of Chromatography A*, 2014, vol. 1355, p. 1-14.

⁹ LIU, Xiaopan, et al. Comparison of Six Different Pretreatment Methods for Blood RNA Extraction. *Biopreservation and biobanking*, 2015, vol. 13, no 1, p. 56-60, doi: 10.1089/bio.2014.0090

La identificación y optimización de los pasos críticos descritos en los diferentes protocolos actuales de extracción y purificación de RNA, que limitan la capacidad de su producción eficiente en ciertas circunstancias, puede ser posible mediante la combinación estratégica de las ventajas de cada uno de los métodos disponibles actualmente, así como la estandarización de un método optimizado. En este trabajo, se presentan los resultados de un proceso de estandarización de un método mejorado de extracción y purificación de RNA de sangre periférica utilizando la adaptación y combinación estratégica de las mejores condiciones de los pasos críticos de este procedimiento identificadas en los diversos protocolos actuales. Como resultado se presenta el desarrollo de un método optimizado de extracción y purificación de RNA de buena calidad, el cual puede ser viable económicamente para su aplicación en laboratorios de países en desarrollo que requieran trabajar extensamente con esta molécula.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un método optimizado de extracción de RNA de buena calidad a partir de muestras de sangre total u otros tejidos.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.2.1** Optimizar el proceso de preparación de las muestras a partir de las cuales se obtendrán los extractos de RNA.
- 1.2.2** Mejorar las condiciones para separación de RNA, DNA y proteínas de un extracto total de células, utilizando el método de Trisure como protocolo de extracción.
- 1.2.3** Desarrollar un método rápido y optimizado de precipitación/purificación de RNA de buena calidad.
- 1.2.4** Diseñar un método de extracción de RNA de buena calidad, que sea funcional para diversos tipos de muestras (p. e. sangre total, tejidos sólidos, etc.), utilizando los mejores resultados obtenidos luego de la optimización de los pasos críticos de la extracción y purificación.

2. ANTECEDENTES

En el año 1979 Chirgwin y col.¹⁰, extrajeron RNA de páncreas de rata, un tejido con una gran cantidad de ribonucleasas. El método desarrollado por estos investigadores fue altamente eficiente y se convertiría en los años siguientes, en el principal método utilizado para la extracción de RNA y es hasta la actualidad la base fundamental de todos los métodos modernos de extracción de RNA. Este método consiste en una homogenización altamente eficiente del tejido utilizando una solución de tiocianato de guanidina, la cual tiene una gran capacidad de desnaturalización de proteínas, incluyendo ribonucleasas, y 0,1 M de 2-mercaptoetanol para el rompimiento de enlaces disulfuro, seguido de ultracentrifugación en CsCl.

En el año 1987 Piotr Chomczynski y Nicoletta Sacchi¹¹ reportaron un método de extracción de RNA denominado el método de un solo paso, el cual se convirtió, desde entonces, en el método de extracción de RNA más utilizado, desplazando así al método desarrollado en el año de 1979, ya que este último implicaba la utilización de ultracentrífuga, con la cual no contaban la mayoría de los laboratorios de investigación en el área. El principio básico del método de Chomczynski y Sacchi se basa en la posibilidad de separar el RNA del DNA mediante la extracción con una solución acida, la cual contiene tiocianato de guanidina, acetato de sodio, fenol y cloroformo, seguido por una centrifugación convencional. En este procedimiento, bajo condiciones acidas, el RNA total permanece en la fase acuosa, mientras que el DNA y las proteínas se sitúan en la interface o en la fase orgánica. La fase acuosa es recuperada y el RNA total es recuperado mediante una precipitación con isopropanol y puede ser utilizado para un gran número de aplicaciones.

¹⁰ CHIRGWIN, John M., et al. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 1979, vol. 18, no 24, p. 5294-5299.

¹¹ CHOMCZYNSKI, Piotr; SACCHI, Nicoletta. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature protocols*, 2006, vol. 1, no 2, p. 581-585

Debido al aumento de la demanda de RNA, diversas compañías, han ido desarrollando a través de los años diversos estuches de extracción de RNA para propósitos específicos, los cuales se basan en el principio básico del protocolo de Chomczynski y Sacchi y nuevos desarrollos tecnológicos. Algunos ejemplos de esto son los estuches RNeasy (Quiagen)¹², PureLink® miRNA (Life technologies) ¹³ y NucleoSpin® (MACHEREY-NAGEL)¹⁴, los cuales, generalmente utilizan agentes caotrópicos para lisar las células e inactivar las RNAsas. Después de esto la solución obtenida se hace pasar por columnas de gel de sílice en las cuales el RNA polianiónico se une a las partículas de sílice por la interacción de puentes de hidrógenos. Posteriormente se realizan lavados para eliminar los posibles contaminantes y finalmente se eluye el RNA.

Al tiempo que se desarrollaron estuches comerciales la compañía Invitrogen desarrolló un reactivo monofásico, llamado TRIzol, el cual contiene fenol, tiocianato de guanidina y otros componentes. Este es el método comercial más utilizado, debido a su versatilidad para ser aplicado a distintos tipo de muestras (p. e. muestras de células y tejidos de origen humano, animal, vegetal, entre otros, así como muestras líquidas tales como plasma , etc.). Este reactivo está diseñado para aislar RNA de buena calidad (así como DNA y proteínas) y es uno de los más empleados debido a los buenos resultados obtenidos (mantiene la integridad del RNA debido a la inhibición altamente eficaz de la actividad de RNAsa, permite el procesamiento simultáneo de un gran número de muestras y el RNA obtenido es de buena calidad) y la fácil adquisición del reactivo. ¹⁵

En la actualidad se encuentran en el mercado una gran cantidad de reactivos monofásicos, los cuales contienen los componentes básicos presentes en el TRIzol, y producen, buenos resultados en la extracción de RNA de buena calidad.

¹² QUIAGEN, RNeasy ® Mini Handbook, cuarta edición, 2012, p. 1-80

¹³ LIFE TECHNOLOGIES, PureLink miRNA Isolation Kit, 2005, Catalogo numbers k1570-1, revisión 2.0, p. 1-19.

¹⁴ MACHEREY-NAGEL. RNA isolation User manual, 2014, revisión 16, p. 1-79,

¹⁵ LIFE TECNOLOGIES, TRIzol ® Reagent, 2012, Catalogo numbers 15596-018, p. 18-21.

A pesar de los diversos avances realizados durante los años posteriores al desarrollo del método de Chomczynski y Sacchi, aún persisten inconvenientes en el trabajo con RNA, principalmente cuando se trata de muestras de tejidos o especímenes diferentes a tejidos animales. Adicionalmente el alto costo de los estuches comerciales, impide que estos se puedan obtener como reactivos independientes para cada paso, sino como un set completo de reactivos específicos para cada tipo de muestra.

Por lo anterior diversos investigadores han estado trabajando para realizar mejoras al método general que conduzcan a la solución de estos problemas y generar métodos alternativos. Estas mejoras se centran en los procedimientos de pretratamiento de las muestras, así como en la precipitación y purificación del RNA obtenido.

Un ejemplo de esto son Vanessa Salette de Paula y col. (2003)¹⁶, los cuales realizaron un estudio comparativo de cuatro métodos de extracción de RNA (proteinasas K, TRIzol, tiocianato de guanidina y sílice) en muestras clínicas de suero y materia fecal, para el diagnóstico de la infección por el *Virus de la hepatitis A (VHA)* mediante la técnica de PCR, la cual requiere RNA de buena calidad. Este procedimiento es de gran importancia para el diagnóstico en las regiones endémicas para la infección con el VHA. En este trabajo se demostró que el método de extracción de RNA es un paso crítico para la detección exitosa de RNA viral, por PCR, en los diferentes tipos de muestras estudiadas y que para cada tipo de muestra se debe seleccionar cuidadosamente la técnica a ser utilizada. En este trabajo las técnicas de extracción con proteinasas K y con tiocianato de guanidina, fueron los mejores métodos para la extracción de RNA a partir de muestras de suero y de materia fecal, respectivamente.

¹⁶ DE PAULA, Vanessa S.; VILLAR, Livia M.; COIMBRA GASPAR, Ana M. Comparison of four extraction methods to detect hepatitis A virus RNA in serum and stool samples. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2003, vol 7, no 2, p. 135–141

En el año 2011 Damir Simic y col.¹⁷, desarrollaron un método de alto rendimiento para el aislamiento eficiente de RNA a partir de muestras numerosas de sangre total, la cual es un tipo de muestra que produce bajos rendimientos en la extracción de RNA. Estos investigadores lograron aislar RNA de alta calidad de una gran cantidad de muestras de sangre, utilizando volúmenes pequeños de 2,5 ml de sangre, mediante la optimización del paso de procesamiento de la sangre y el uso de la plataforma MagMAX™-96 extracción automatizada de RNA. Sin embargo, este método en su conjunto sigue siendo costoso debido a la necesidad de adquirir el sistema robótico MagMax de 96 pozos, el cual no sería de utilidad para laboratorios que no procesen grandes cantidades de sangre diariamente. En este trabajo SE introdujo una combinación de los métodos de TRIzol y proteinasa K utilizados en el trabajo de Paula y col, para optimizar la extracción de una buena cantidad de RNA de alta calidad a partir de sangre total, lo cual constituye una estrategia diferente a la utilizada en los estuches comerciales para la extracción de RNA a partir de sangre total.

Para el año 2012 Hila Yaffe y col.¹⁸ desarrollaron un método rápido y relativamente económico para la extracción de RNA total de plantas y tejidos infectados por hongos, así como de insectos, basado en un tampón de clorhidrato de guanidina y columnas de extracción de DNA común utilizados originalmente para la extracción y purificación de plásmidos y cósmidos, obteniendo rendimientos y purezas similares a las de los métodos comerciales. El método propuesto puede ser utilizado de forma reproducible para el aislamiento de RNA a partir de una variedad de especies de plantas, así como también se puede utilizar con tejido de plantas infectadas y micelios de hongos, que son típicamente recalcitrantes a los procedimientos de extracción de ácidos nucleicos.

¹⁷ SIMIC, Damir, et al. An alternative method for high throughput RNA isolation from whole blood. *Journal of Medical Genetics and Genomics*, 2011, vol. 3, no 4, p. 74-76

¹⁸ YAFFE, Hila, et al. LogSpin: a simple, economical and fast method for RNA isolation from infected or healthy plants and other eukaryotic tissues. *BioMed Center research notes*, 2012, vol. 5, no 45, p. 1-8

Más recientemente, en el año 2015, Xiaopan Liu y col.¹⁹ realizaron una comparación de seis diferentes métodos de pretratamiento de sangre periférica, evaluando sus efectos sobre la extracción de RNA de sangre, incluidos los rendimientos y calidad de RNA, demostrando que, si bien, la mayoría de estos métodos cumplen los requisitos básicos para los estudios de RNA, la simplicidad del procedimiento y el costo del mismo, son factores a considerar por los investigadores, teniendo en cuenta los requisitos específicos para su investigación.

La revisión de la literatura relacionada, muestra que los trabajos mencionados anteriormente han introducido mejoras o soluciones a diversos pasos del protocolo clásico de extracción de RNA. La combinación de estas pasos mejorados y la optimización adicional de otros pasos que aun presentan dificultades pueden dar lugar a un protocolo de extracción de RNA igualmente o aún más eficiente que los protocolos comerciales, mucho más versátil y económico, por lo tanto aplicable a diferentes tipos de muestras biológicas, y de fácil acceso para laboratorios de países en vías de desarrollo.

¹⁹ LIU, Xiaopan, et al. Comparison of Six Different Pretreatment Methods for Blood RNA Extraction. *Biopreservation and biobanking*, 2015, vol. 13, no 1, p. 56-60, doi: 10.1089/bio.2014.0090

3. MARCO TEORÍCO

3.1 MATERIAL GENÉTICO Y ÁCIDOS NUCLEICOS

La información genética se almacena en la célula en forma de macromoléculas biológicas, esencialmente como ácidos nucleicos asociados con proteínas. Esta información no sólo impulsa el funcionamiento de todo el organismo, sino también el motor evolutivo. Por lo tanto, la comprensión de las bases moleculares de la vida es fundamental para entender cómo la información genética da forma a la vida e impulsa su evolución.²⁰ En los primeros días de la biología celular, no se tenía clara la composición del material genético. De hecho, durante muchos años, se pensaba que las proteínas contenían el mapa genético para la herencia. Solo hasta 1952, cuando Alfred Hershey y su asistente de investigación Martha Chase publicaron los resultados de sus experimentos, se logró demostrar que es el DNA el que sirve como material genético en casi todos los casos, con algunas excepciones, tales como en algunos tipos de virus en los cuales el material genético es el RNA (retrovirus).²¹

Los ácidos nucleicos, el ácido desoxirribonucleico (DNA) y el ácido ribonucleico (RNA), son las moléculas codificadoras de la información génica que rige la conformación y el desarrollo de las diferentes estructuras y funciones celulares respectivamente. Estas moléculas guardan y transmiten la información genética y participan en su decodificación y expresión en una variedad de proteínas celulares. El DNA almacena la información genética como largas secuencias de bases nitrogenadas y, por su capacidad de copiarse a sí mismo y replicarse, tiene un papel

²⁰ CHOUDHURI, Supratim. *Bioinformatics for Beginners: Genes, Genomes, Molecular Evolution, Databases and Analytical Tools*. Elsevier, 2014, capítulo 1, vol. 17, p. 1–25. ISBN-13: 978-0124104716

²¹. WINK, M. *An Introduction to Biotechnology The Science, Technology and Medical Applications Chapter 4. Genes: The Blueprints for Proteins*. Elsevier Ltd., 1999. p. 65-105 doi:10.1016/B978-1-907568-28-2.00004-6

único como una de las formas de material genético.²² Por su lado los diferentes tipos de RNA son también material de almacenamiento y transmisión de información genética, pero fundamentalmente desempeñan un papel importante en la expresión de la información genética almacenada en el DNA y adicionalmente participando en la regulación de una serie de diversas actividades celulares.²³

El DNA y RNA son polímeros de nucleótidos, que consisten en bases purínicas y pirimidínicas vinculadas a azúcares fosforilados (Figura 1). Un polímero de DNA o RNA lineal posee dos extremos, los cuales son químicamente diferentes. En uno de los extremos, se encuentra un grupo fosfato expuesto el cual está unido a una 2'-desoxirribosa o una ribosa. En el otro extremo, se encontrará un hidroxilo no polimerizado en el carbono 3' del azúcar. Los dos extremos diferentes le dan direccionalidad al polinucleótido y dan lugar a las terminaciones 5' fosfato y 3' hidroxilo o los extremos 5' y 3' de una molécula lineal de DNA o RNA.²⁴

El DNA está constituido de dos tipos de moléculas de purinas (adenina y guanina) y dos tipos de pirimidinas (citosina y timina). La Adenina, guanina y citosina también están presentes en el RNA el cual, a su vez, contiene uracilo en lugar de timina. Existen dos tipos de estructuras de anillo para estas bases, una estructura bicíclica, característica de las purinas, que contiene un anillo de cinco miembros y un anillo de seis miembros y una estructura monocíclica, característica de las pirimidinas, con un anillo de seis miembros (Figura 1). Las bases están vinculados a los azúcares (2'- desoxirribosa en el DNA, o ribosa en RNA) formando nucleósidos. Los

²² BHAGAVAN, N. V. & Ha, C.-E. Structure and Properties of DNA. En: *Essentials of Medical Biochemistry with Clinical Cases Modifications*. 2011, p. 275-286. doi:10.1016/B978-0-12-095461-2.00021-7

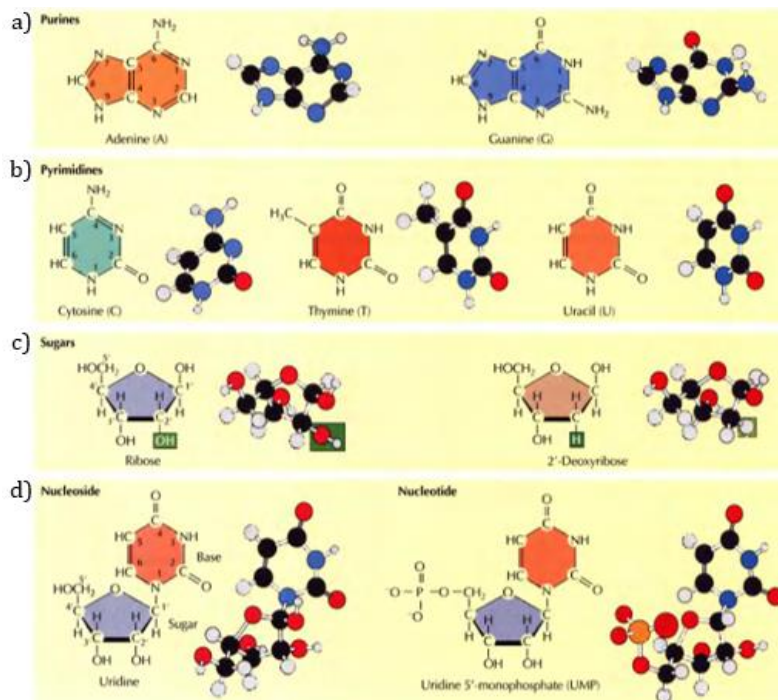
²³ COOPER, G. M., HAUSMAN, Robert. E., *The Cell A Molecular Approach*. Capítulo 4. *Fundamentals of molecular biology*, 4 ed. Washington DC. (editorial). 2007 p. 103-137

²⁴ WINK, M. *An Introduction to Biotechnology The Science, Technology and Medical Applications* Chapter 4. Genes: The Blueprints for Proteins. Elsevier Ltd., 1999. p. 65 doi:10.1016/B978-1-907568-28-2.00004-6

nucleótidos contienen adicionalmente uno o más grupos fosfato enlazados al carbono 5' de los azúcares de los nucleósidos.²⁵

La expresión de los genes es la base del metabolismo celular, y por ésta se entiende que la información codificada en una secuencia de DNA se transcribe en RNA, que a su vez se traduce en proteínas. Esta secuencia del flujo de la información génica DNA-RNA-proteínas constituye el dogma central de la biología molecular.²⁶

Figura 1. Componentes básicos de los ácidos nucleicos. a) Bases purínicas; b) bases pirimidínicas; c) azúcares (pentosas); d) nucleósido y nucleótido



Fuente: COOPER, G. M., HAUSMAN, Robert. E The Cell A Molecular Approach

²⁵ COOPER, G. M., HAUSMAN, Robert. E, Op. Cit., p. 132

²⁶ FALCÓN, Luisa I.; VALERA, A., Quinta parte: Las herramientas moleculares capítulo 16: Extracción de Ácidos nucleicos, EN: EGUIARTE, Luis E.; SOUZA, Valeria; AGUIRRE, Xitlaly, *Ecología Molecular*, Secretaria del medio ambiente y recursos naturales, instituto nacional de ecología, universidad nacional autónoma de México, 2008. comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. Pag, 499–516

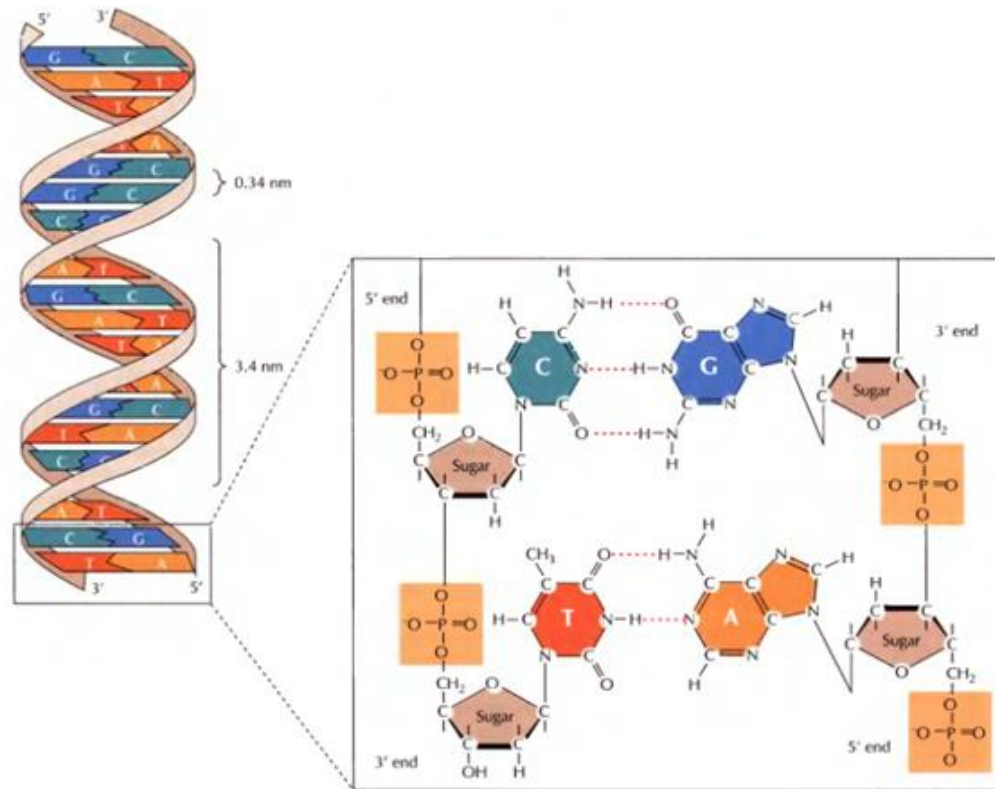
3.1.1 DNA. Dado el papel central del DNA como material genético la elucidación de su estructura tridimensional fue fundamental para comprender su función. Los datos experimentales sobre la estructura del DNA se obtuvieron de estudios de cristalografía de rayos X. El análisis de estos datos reveló que la molécula de DNA es una hélice que gira cada 3,4 nm, y la distancia entre bases adyacentes es 0,34 nm, por lo que hay diez bases por vuelta de la hélice y el diámetro de la hélice es de aproximadamente 2 nm. El DNA es una molécula con estructura de una doble hélice constituida de un esqueleto de moléculas de azúcar unidas por enlaces fosfodiéster en el exterior de la molécula. Las bases están en el interior de la doble hélice, orientadas de tal manera que se forman enlaces de hidrógeno entre las bases nitrogenadas de las cadenas opuestas. El apareamiento de bases es muy específico: Adenina (A) siempre se aparea con Timina (T) y Guanina (G) con Citosina (C) (Figura 2). Debido al emparejamiento de bases las dos hebras de una molécula de DNA son complementarias, de tal manera que cada hebra contiene toda la información necesaria para especificar las secuencias de bases en la otra.²⁷

El hecho de que el emparejamiento de bases fuera tan específico sugirió que el proceso de replicación del material genético (DNA) se lleva a cabo de manera semi-conservativa, es decir, que las dos hebras de una molécula de DNA pueden separarse y servir como plantillas para la síntesis de nuevas cadenas complementarias cuya secuencia será dada por el emparejamiento de bases. Esta estructura molecular le confiere al DNA la capacidad única de auto-replicarse y así poder transmitir de células progenitoras a células hijas toda la información biológica necesaria para que las células hijas desarrollen el mismo tipo de estructuras y funciones que las células progenitoras.²⁸

²⁷ NELSON, David L.; COX, Michael M., LEHNINGER Principios De Bioquímica, Quinta edición, Editorial OMEGA, 2009, p. 271-302, ISBN 978-282-1486-5

²⁸ COOPER, G. M., HAUSMAN, Robert. E., The Cell A Molecular Approach. Capítulo 4. *Fundamentals of molecular biology*, 4 ed. Washington DC. (editorial). 2007 p. 134

Figura 2. Estructura del DNA.



Fuente: COOPER, G. M., HAUSMAN, Robert. E The Cell A Molecular Approach

3.1.2 RNA. EL RNA tiene una serie de características químicas y propiedades estructurales únicas con implicaciones notables en la biología celular y es la única macromolécula conocida con capacidad de almacenamiento y transmisión de información genética y al mismo tiempo con otras actividades biológicas propias de las proteínas tales como la actividad catalítica de ciertos procesos bioquímicos. La expresión de la información génica requiere generalmente la síntesis de una molécula de RNA, transcrita a partir de una secuencia molde de DNA.

El RNA es un polímero de una larga cadena de monofosfatos de ribonucleósido, con similitudes al DNA pero con dos diferencias fundamentales que lo caracterizan: posee nucleótidos de uracilo (U) en lugar de timina (T) y la molécula de ribosa posee

un grupo 2'-OH en cada uno de los nucleótidos de RNA, el cual está ausente en el DNA (Figura3a). El RNA es menos estable que el DNA debido a que el grupo 2'-OH es vecinal al enlace 3'-fosfodiéster, el cual es susceptible a la escisión nucleófila, por lo que se hidroliza fácilmente por iones de hidróxido.²⁹

La estructura del RNA tiene tres niveles fundamentales de organización: estructura primaria, secundaria y terciaria. La secuencia lineal de RNA lo convierte en una simple fuente de información genética. La propiedad del RNA para formar la estructura secundaria, protegiendo algunas secuencias mientras que exponen otras para el reconocimiento, facilita sus interacciones con otras moléculas. De una manera más compleja, el RNA puede asumir estructuras terciarias que presentan superficies para interacciones y contienen ambientes internos que crean sitios de unión para iones metálicos suficientemente secuestrados del disolvente como para que puedan promover reacciones catalíticas. Ninguna otra macromolécula cubre esta gama de espacio y funciones químicas.³⁰

La estructura primaria se refiere a la secuencia de nucleótidos de un RNA. Dado que muchos RNAs biológicamente activos son modificados post-transcripcionalmente (metilación de bases de nucleótidos y grupos 2'-hidroxilo de azúcares de ribosa, formación de bases inusuales tales como pseudouracil (Y) y dihidouridina (D) e inserción o delección de nucleótidos en RNA mensajero), para determinar completamente la secuencia primaria, el RNA debe purificarse de su fuente nativa y ser caracterizado por una combinación de métodos de secuenciación y espectrometría de masas.³¹

La estructura secundaria del RNA se presenta como una representación bidimensional de sus pares de bases emparejados de acuerdo a la estructura de Watson – Crick (ver Figura 3b) y de las regiones “desapareadas” que intervienen.

²⁹ MARTINS, R.; QUEIROZ, J. A.; SOUSA, F. Ribonucleic acid purification. *Journal of Chromatography A*, 2014, vol. 1355, p. 2

³⁰ BATEY, R. T.; RAMBO, R. P.; DOUDNA, J. A. Tertiary motifs in RNA structure and folding, 1999, vol. 38, issue, 16, p. 2326–2343

³¹ *Ibíd.*, p. 2327-2328

El RNA adquiere una forma de hélice α , mientras que el DNA posee una forma β . La propensión del RNA a formar estructuras secundarias complejas, facilita las interacciones con otras moléculas.³² Los elementos estructurales secundarios comúnmente descritos son: dúplex, regiones de un solo grupo, horquillas, abombamientos, bucles internos y uniones, como se ilustra en la Figura 3c. Este nivel de estructura de RNA se determina a partir de varios métodos. La técnica más simple, pero más cargada de incertidumbre, es utilizar programas de predicción de estructuras secundarias que doblan la secuencia en posibles estructuras secundarias. Estos programas se basan en la estrategia de encontrar la estructura secundaria con la energía libre más baja total calculando la energía libre de un número variado de posibles esquemas de emparejamiento de bases, considerando las estructuras secundarias de potencial energético más bajo como las probables. Un medio más confiable para determinar la estructura secundaria de RNAs biológicos es el análisis comparativo de secuencias, para explorar, la tendencia de la arquitectura global de RNAs biológicos que tiende a ser más conservada. Una estructura secundaria generada a partir de los métodos anteriores debe ser verificada experimentalmente por técnicas bioquímicas.³³

Así mismo, el RNA puede asumir estructuras terciarias. Los elementos estructurales terciarios implican principalmente una interacción entre elementos estructurales secundarios distintos. Más allá de las estructuras terciarias de ciertos tRNA (Figura 3d), no se conocía mucho sobre este nivel de arquitectura debido a que estos tipos de interacciones son extremadamente difíciles de predecir o determinar experimentalmente. Recientemente ha habido un gran progreso en la elucidación de estas estructuras, gracias a la mejora de la síntesis de cantidades mayores de RNA y las técnicas avanzadas de análisis estructural como la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear (RMN).³⁴

³² MARTINS, R.; QUEIROZ, J. A.; SOUSA, F. Ribonucleic acid purification. *Journal of Chromatography A*, 2014, vol. 1355, p. 2

³³ BATEY, R. T., RAMBO, R. P. & DOUDNA, J., Op. Cit., p. 2328

³⁴ BATEY, R. T., RAMBO, R. P. & DOUDNA, J., Op. Cit., p. 2328 – 2329

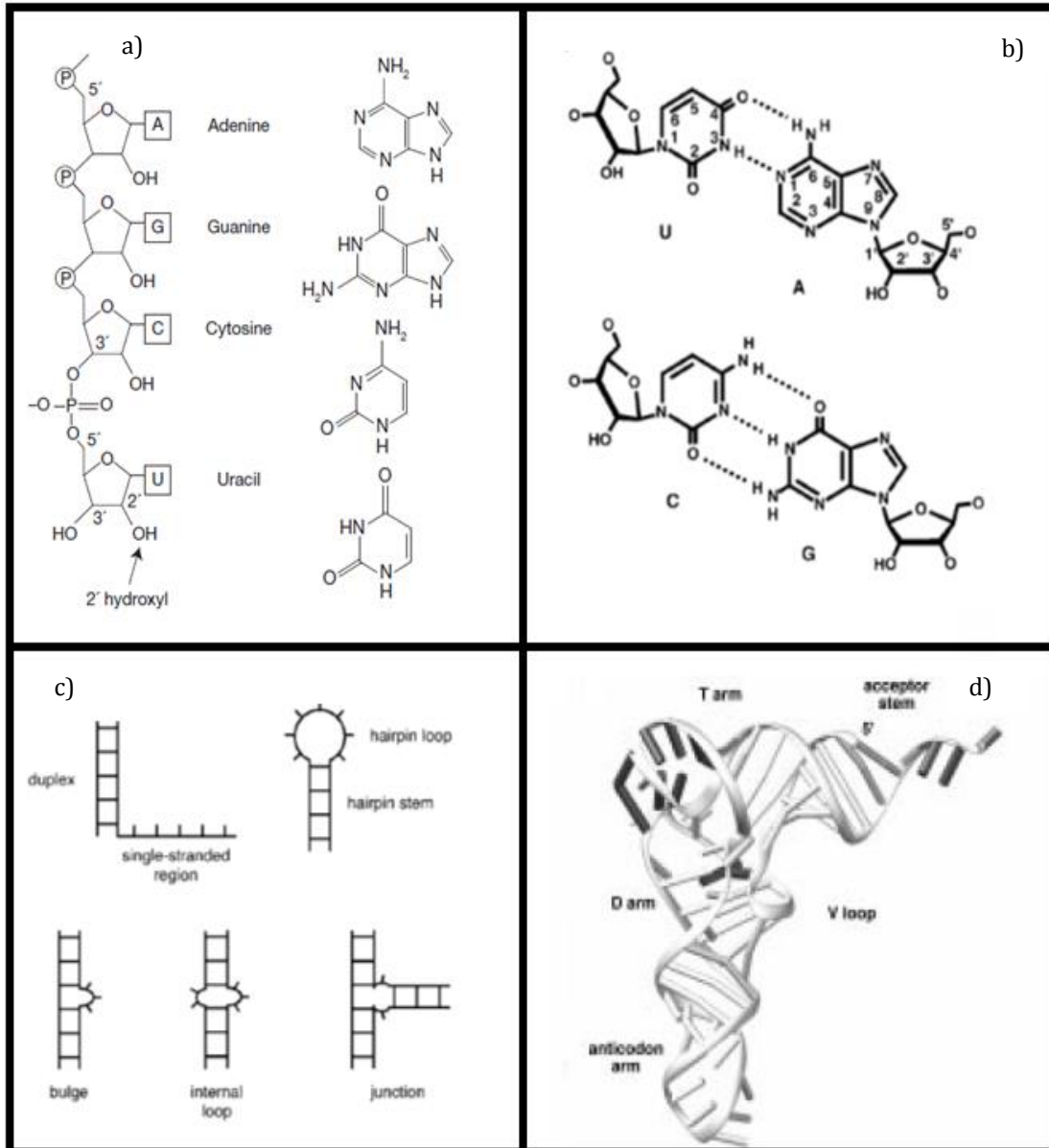
La alta reactividad química de RNA le confiere a esta molécula una alta susceptibilidad a la degradación. Esta inestabilidad, es fisiológicamente muy importante para las células, ya que les permite cambiar y regular sus patrones de síntesis de proteínas muy rápidamente en respuesta a las necesidades biológicas. Con la excepción de los genomas de RNA de ciertos virus, todas las moléculas de RNA se forman a partir de información almacenada permanentemente en el DNA.³⁵

Existen tres clases principales de RNA, el RNA mensajero (mRNA) el RNA ribosomal (rRNA) y los RNA de transferencia (tRNA). Sin embargo hay un gran número de variables de estas clases de RNA principales y una serie de moléculas pequeñas de RNA en una sola célula eucariota. La mayoría de los RNA que están presentes en el citoplasma, son los rRNA (10^6 moléculas) y los tRNA (10^8 moléculas) y se asocian con la síntesis de proteínas. Otros RNAs menos abundantes son los RNA de bajo peso molecular nucleares (LMW: del inglés *low molecular weight* nRNA o snRNA) los cuales se asocian con subestructuras y componentes moleculares nucleares. La concentración de mRNA, los cuales codifican las diversas proteínas celulares no es alta, pero se estima que existen entre 10^4 - 10^5 copias de mRNA en una sola célula, en un determinado tiempo.³⁶

³⁵ NELSON, David L.; COX, Michael M., LEHNINGER Principios De Bioquímica, Quinta edición, Editorial OMEGA, 2009, p. 271-302, ISBN 978-282-1486-5.

³⁶ CHOI, Yong C.; RO-CHOI, Tae-Suk, Basic Characteristics of Different Classes of Cellular RNA's: A Directory. EN: *A Comprehensive Treatise. Gene Expression: The Production of RNAs, Cell Biology*, 1980, vol. 3, editado por David M. Prescott, p. 609-667, ISBN: 978-0-12-289503-6

Figura 3. Estructuras del RNA. a) Estructura primaria del RNA. b) Pares de bases de Watson – Crick estándar que se encuentran en el RNA. c) Elementos estructurales secundarios comunes del RNA. d) Representación de la estructura cristalográfica de rayos X del tRNAPhe (Protein Data Bank (PDB) número de registro 6tna).



Modificado de: BATEY, R. T.; RAMBO, R. P.; DOUDNA, J. A. Tertiary motifs in RNA structure and folding.

3.1.2.1. RNA mensajero (mRNA). El RNA mensajero (mRNA) es un intermediario en el proceso de la traducción de las secuencias genéticas en proteínas. Los mRNA se caracterizan por ser los transportadores directos de la información genética desde el núcleo a los ribosomas citoplasmáticos.³⁷

Si bien hay diferencias entre la estructura y el mecanismo de la función de los mRNAs eucariotas y procariotas, también hay similitudes (Figura 4). En el mRNA, la información genética se codifica en un alfabeto de cuatro bases de nucleótidos, que forman codones que consta de tres bases cada una. Cada codón codifica un aminoácido específico, con la excepción de codones de parada que determinan dónde termina la síntesis de proteínas. El mRNA se traduce en los ribosomas, el cual permite que los codones sean leídos por los tRNA. El codón iniciador para procariotas y eucariotas es una secuencia AUG y la secuencia de codones se lee desde la dirección 5' a 3'. El mRNA eucariótico codifica generalmente una única proteína (monocistrónico), mientras que el mRNA procariótico codifica a menudo una serie de proteínas relacionadas con el mismo mRNA (policistrónico).

Debido a que la información dentro del mRNA se encuentra en la secuencia lineal de los nucleótidos, se hace necesario integridad absoluta de dicha secuencia, de tal modo que cualquier pérdida o cambio de la secuencia de nucleótidos podría producir una alteración en la proteína que se está traduciendo. Los mRNA, estructuralmente, son cadenas de largo tamaño. Durante la fase de transcripción diversas proteínas regulatorias se unen directamente a los mRNA.³⁸

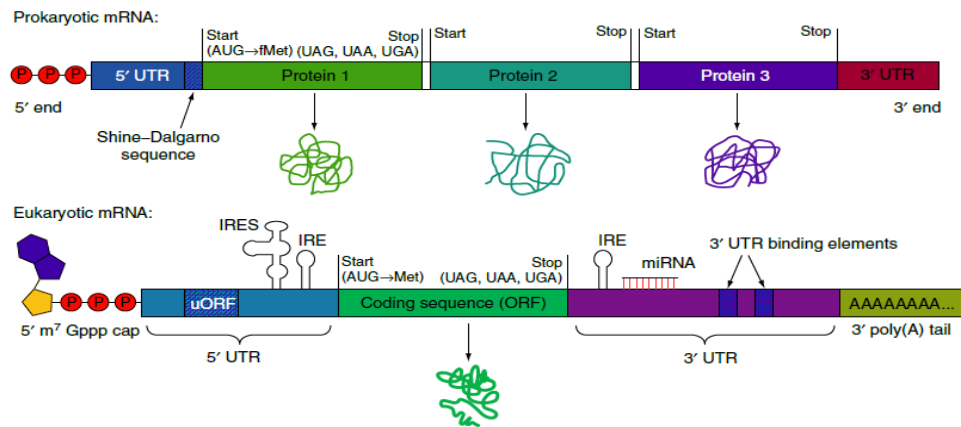
➤ **mRNA Procariota.** El mRNA procariota se sintetiza en el citoplasma (no requiere el transporte desde el núcleo). Tampoco requiere algún procesamiento y puede comenzar la traducción inmediatamente después de completarse la transcripción. La mayoría del mRNA contiene una secuencia en el extremo 5' del

³⁷ GOSS, D. J.; DOMASHEVSKIY, A. V., Messenger RNA (mRNA): The Link between DNA and Protein, EN: BRADSHAW, Ralph A.; STAHL, Philip D., *Encyclopedia of cell biolog*, Waltham, MA: Academic Press, 2001, vol 1, p. 341-345, doi:10.1016/B978-0-12-394447-4.10040-9 341

³⁸ LILJAS, A., Messenger RNA (mRNA). *Encyclopedia of Genetics*, 2001, p. 1184–1185, doi:10.1006/rwgn.2001.0821

mRNA antes del codón de inicio AUG, denominado región 5' no traducida (5' UTR) y una región que sigue al codón de parada (3' UTR). La mayoría de mRNA procariótico contiene una secuencia en el 5' UTR para posicionar los ribosomas para la traducción.^{25 39}

Figura 4. mRNA procariota y eucariota. Diagrama esquemático del mRNA procariota (superior) y eucariótico (inferior). Las barras indican la longitud relativa de las regiones.



Fuente: GOSS, D. J.; DOMASHEVSKIY, A. V., Messenger RNA (mRNA): The Link between DNA and Protein,

➤ **mRNA eucariota.** A diferencia de los mRNA procarióticos que se producen y se traducen en el citoplasma, los mRNA eucarióticos se producen en el núcleo y se traducen en el citosol, requiriendo transporte. Además, los mRNA eucarióticos son sometidos a procesamiento. Estos 'pre- mRNA ' sufren una serie de modificaciones, de la cuales la más llamativa es el proceso de corte y empalme, que implica la escisión de secuencias intermedias no expresadas, después de lo cual las secuencias flanqueantes se empalman o se unen entre sí. El mRNA eucariótico

³⁹ GOSS, D. J.; DOMASHEVSKIY, A. V., Op. Cit., p. 341

sufre también un proceso de modificación del extremo 5', mediante la adición de un nucleótido de guanina en posición invertida, denominado taponamiento y la adición de una cola poli adenina (Poli A) al extremo 3'.⁴⁰

3.1.2.2 RNA ribosómico (rRNA). Los rRNA constituyen el 80% del RNA celular total y tienen la propiedad de ser moléculas metabólicamente estables. Ésta estabilidad, indispensable para el funcionamiento repetido del ribosoma, está dada por su estructura y por su estrecha relación con las proteínas ribosómicas.

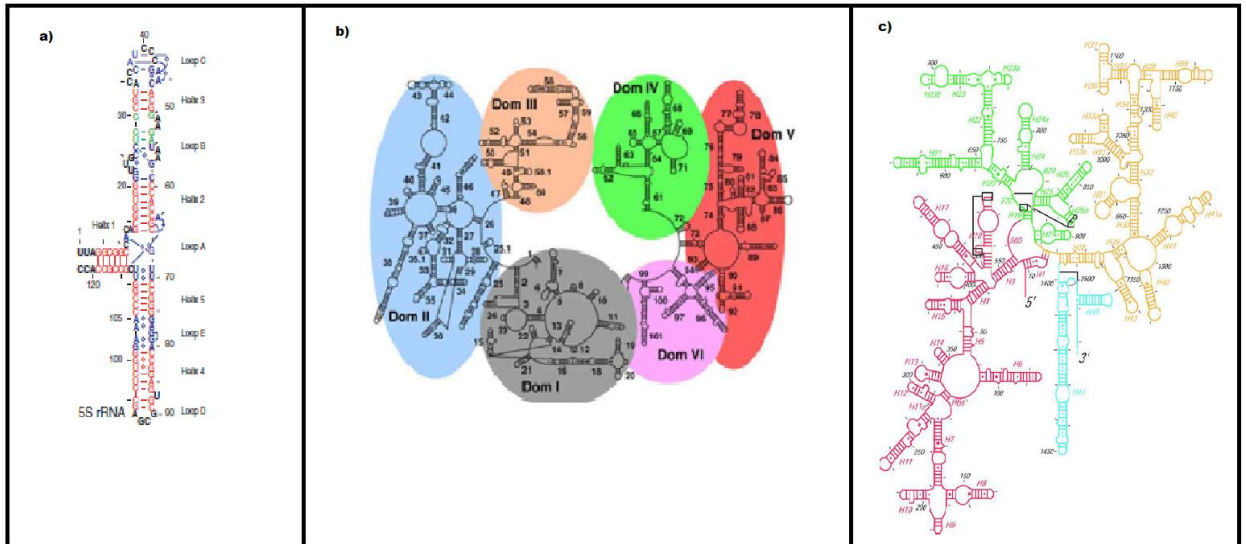
Los ribosomas citoplasmáticos eucarióticos son estructuras constituidas por cuatro moléculas de RNA de diferentes tamaños y de 70 a 80 proteínas, las cuales se encuentran divididas en dos subunidades ribosómicas. La subunidad pequeña o partícula de 40S, contiene un rRNA de 18S y el 55% de las proteínas ribosomales. La subunidad grande o partícula de 60S, contiene los rRNA restantes (28S, 5,8S y 5S), así como las demás proteínas ribosomales.

Diversos estudios han demostrado que el rRNA 5S tiene una estructura secundaria que tiene la forma de Y donde los terminales 5' y 3' forman una de las hélices cortas de esta molécula (figura 5a). La molécula grande de la gran subunidad ribosomal forma seis dominios (figura 5b). Mientras que el rRNA de la pequeña subunidad se organiza en cuatro dominios (figura 5c)⁴¹

⁴⁰ GOSS, D. J.; DOMASHEVSKIY, A. V., Op. Cit., p. 342

⁴¹ LILJAS, A., Ribosomal RNA, EN: LAFONTAINE, D. L. J.; TOLLERVEY, D., *Encyclopedia of Life Sciences*, 2001, p. 1719-1723, doi:10.1038/npg.els.0003832

Figura 6. Estructuras de los rRNAs. a) Estructura secundaria del rRNA. b) Estructura secundaria del rRNA 28S, los seis dominios se muestran en diferentes colores. c) Estructura secundaria del rRNA 18S, los cuatro dominios se muestran en diferentes colores.



Modificado de: LILJAS, A., Ribosomal RNA, EN: LAFONTAINE, D. L. J.; TOLLERVEY, D., Encyclopedia of Life Sciences,

3.1.2.3 RNA de transferencia (tRNA). Los tRNA constituyen aproximadamente el 15% del RNA celular total. Aunque se sintetizan en el núcleo, los tRNA son elaborados rápidamente y utilizados en el citoplasma. Entre las funciones más importantes del tRNA se destaca la traducción del código genético, el cual es transcrito desde el DNA en el mRNA, en forma de tripletas de nucleótidos denominados codones, los cuales se traducen en secuencial lineales de aminoácidos.

En una célula cualquiera, existen alrededor de 56 variedades diferentes de tRNA, que se diferencian fundamentalmente en la secuencia de su anticodón. La función de los tRNA es llevar los aminoácidos específicos correspondientes a cada codón, a sitios especializados del rRNA donde este cataliza la unión de aminoácidos

mediante la conformación de enlaces peptídicos. Debido a que solo existen 20 aminoácidos para la conformación de proteínas, hay por lo tanto más de un tRNA que se une a un mismo aminoácido y se denomina tRNA isoaceptores.⁴²

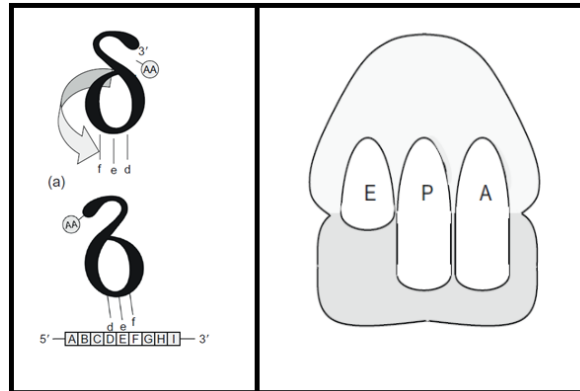
Una molécula de tRNA es en sí misma un polinucleótido, una molécula de RNA que tiene típicamente 73 – 93 nucleótidos de longitud. Poseen algunas zonas con estructura secundaria conferida en parte por las zonas donde no hay bases complementarias las cuales adquieren un aspecto de bucles y le dan al tRNA la forma de una hoja de trébol. Los plegamientos se llegan a hacer tan complejos que adquieren una estructura terciaria. El extremo 3' de la molécula de tRNA puede unirse covalentemente a un aminoácido específico. Una molécula de tRNA se emparejará con un codón a través de tres bases en la estructura de tRNA conocida como anticodón (Figura 4.11). Si el codón de mRNA es CUG, el tRNA que se utilizará en la traducción de este codón tendrá el anticodón CAG.

La subunidad ribosómica grande tiene tres lugares que pueden unirse a tRNA: el sitio A, el sitio P y el sitio E (del Inglés, *acceptor, peptidil and exit*, respectivamente). El sitio A contiene típicamente un aminoacil – tRNA, que significa un tRNA que lleva unido un aminoácido. El sitio P típicamente contiene el peptidil – tRNA, es decir el tRNA que sostiene la cadena peptídica en crecimiento. El sitio E puede ser pensado como un sitio de espera temporal para tRNAs vacíos.⁴³

⁴² LILJAS, A., Transfer RNA (tRNA), *Encyclopedia of Genetics*, 2001, p. 1986–1989, doi:10.1006/rwgn.2001.1302

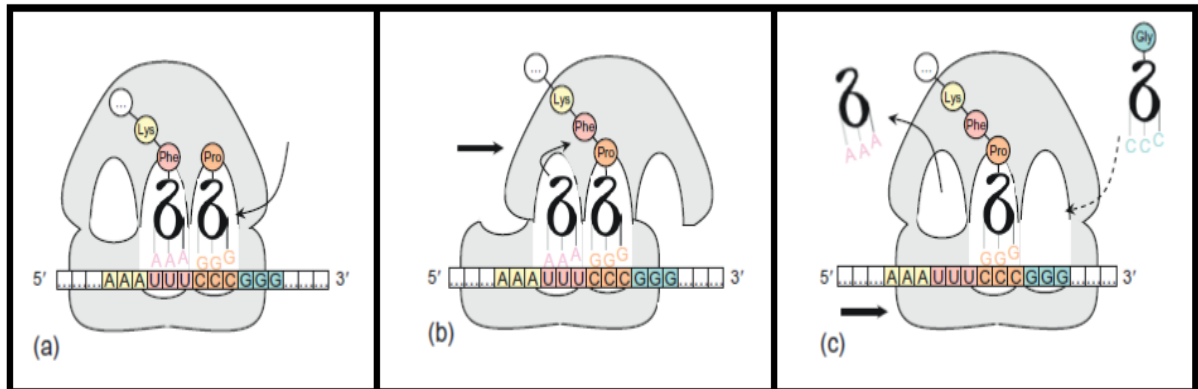
⁴³ WINK, M. An Introduction to Biotechnology The Science, Technology and Medical Applications Chapter 4. Genes: The Blueprints for Proteins. Elsevier Ltd., 1999. p. 79-81, doi:10.1016/B978-1-907568-28-2.00004-6

Figura 6. Estructura del tRNA y sitios de unión de este al ribosoma. La estructura de una molécula de tRNA (izquierda). Esquema del ribosoma, mostrando los tres sitios de unión para tRNA se muestran por las letras E (tRNA vacío), P (peptidil-tRNA) y A (aminoacil-tRNA).



Modificado de: WINK, M. An Introduction to Biotechnology The Science, Technology and Medical Applications Chapter 4. Genes: The Blueprints for Proteins.

Figura 7. Proceso de traducción del código genético.



Modificado de: WINK, M. An Introduction to Biotechnology The Science, Technology and Medical Applications Chapter 4. Genes: The Blueprints for Proteins.

3.1.2.4 Otros tipos de RNAs. Dentro de las diversas clases de ácidos nucleicos, una fracción significativa del contenido genómico se compone de microRNAs (miRNAs) y RNAs largos no codificantes (lncRNAs). Hace unos 10 años, los científicos quedaron sorprendidos por la amplitud de la regulación de la expresión génica mediada por el RNA que se hizo evidente con los del RNA interferente (RNAi), microRNAs y RNAs largos no codificantes. En los dos primeros casos, el resultado común es que estos RNAs pequeños silencian la expresión de genes mediante el reconociendo de secuencias complementarias en los mRNA, dirigiendo así su destrucción o inhibiendo su utilización en la traducción, o mediante ambos mecanismos. Por otro lado el hecho de que los lncRNAs contengan secuencias conservadas en diferentes especies, es una fuerte indicación de que esta es una función importante, conservada evolutivamente.⁴⁴

Se han identificado muchas familias de RNA pequeños, y la elucidación de su papel en la regulación génica está avanzando rápidamente. Con la disponibilidad de la tecnología de secuenciación profunda, la mayoría de los tipos de RNAs pequeños de menos de 20-30 nucleótidos probablemente ya se han descubierto. Sin embargo, la tecnología para explorar el rango de RNAs largos no codificantes está en sus inicios.⁴⁵

➤ **miRNAs.** El término microRNA (miRNA) hace referencia a una familia de RNAs pequeños de cadena sencilla no codificantes, altamente conservados (generalmente entre 18 y 25 nt de longitud), encontrados en genomas animales y vegetales, así como en algunos virus. Estos RNAs, descubiertos en 1993, representan aproximadamente del 1 al 2% de los genes conocidos en eucariotas y regulan la expresión génica a nivel postranscripcional. Se ha estimado que los miRNAs regulan aproximadamente el 50% de todos los mRNA en vertebrados. Esta

⁴⁴ DUTTAGUPTA, R., et al., Genome – Wide Maps of Circulating miRNA Biomarkers for Ulcerative Colitis. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7, issue 2, p. 1-13, doi:10.1371/journal.pone.0031241

⁴⁵ SHARP, Phillip A. The centrality of RNA. *Cell*, 2009, vol. 136, no 4, p. 578

regulación está mediada principalmente por el reconocimiento de secuencias dentro de la región 3' UTR de mRNAs.⁴⁶

Los miRNAs juegan una función fundamental en muchos procesos biológicos tales como proliferación y maduración de la célula, apoptosis, regulación de la inflamación crónica, y desarrollo del cáncer. Además, estas moléculas juegan un papel crítico en el desarrollo de diferentes enfermedades humanas, incluyendo cánceres, trastornos neurodegenerativos y enfermedades autoinmunes. El tamaño extremadamente pequeño de los miRNAs hace que la mayoría de las herramientas convencionales de amplificación sean menos eficaces, teniendo en cuenta que los RNA pequeños podrían precipitarse menos eficientemente en soluciones alcohólicas durante el proceso de purificación del RNA.⁴⁷

➤ **lncRNAs.** Los lncRNAs se definen como especies de RNA de más de 200 nt que no parecen tener potencial de codificación de proteínas. Lo lncRNA se revelaron por primera vez en un estudio utilizando la secuenciación a gran escala de bibliotecas de cDNA en ratón. El aumento de los estudios revela que los lncRNAs tienen una variedad de funciones importantes en procesos biológicos entre los cuales están en la transcripción, splicing, traducción, el tráfico de factores nucleares y la modificación de la cromatina, entre otros.⁴⁸

Los lncRNA se han clasificado en función de su posición con respecto a los genes codificantes de la proteína: (i) los lncRNAs anti sentido surgen de la cadena anti sentido de genes codificantes de la proteína, (ii) los lncRNAs intrónicos están codificados dentro de intrones de genes codificantes de proteínas, Los lncRNA intergénicos no codificantes largos (lincRNAs) se transcriben a partir de regiones intergénicas entre genes codificantes de proteínas, y (iv) lncRNA bidireccionales

⁴⁶ GRIFFITHS JONES, S., MiRBase: MicroRNA sequences and annotation, *Current Protocols in Bioinformatics*, 2010, Suplemento 29, p. 1–10, doi:10.1002/0471250953.bi1209s29

⁴⁷ BERGALLO, M. et al., Comparison of Two Available RNA Extraction Protocols for microRNA Amplification in Serum Samples, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2015, vol. 30, p. 277–283, doi: 10.1002/jcla.21848

⁴⁸ YAN, Biao; WANG, Zen-Hua; GUO, Jin-Tao, The research strategies for probing the function of long noncoding RNAs. *Genomics*, 2011, vol. 99, issue 2, p. 76–80, doi: 10.1016/j.ygeno.2011.12.002

cuya transcripción se inicia en la dirección opuesta al promotor de un gen codificador de proteína.⁴⁹

Los mecanismos moleculares por los cuales los lncRNAs ejercen su función no se entiende completamente, pero los estudios emergentes indican que los lncRNAs se asocian con proteínas en la cromatina o complejos ribonucleoproteína y actúan como señales, señuelos o guías para que estos complejos de proteínas logren ejecutar sus actividades en el genoma.⁵⁰

3.2 QUÍMICA DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Para entender las funciones de los ácidos nucleicos, debemos conocer sus propiedades químicas y sus estructuras. Los polinucleótidos de DNA y RNA poseen propiedades hidrófilas debido a que se pueden formar puentes de hidrogeno entre el agua y los fosfatos, o el agua y los OH de la pentosa. Así mismo son más solubles que las bases que los forman y, a pH fisiológico, los grupo fosfato presentan dos cargas negativas. Debido a que los polinucleótidos son moléculas muy largas en relación a su diámetro, forman soluciones viscosas.⁵¹

Químicamente son compuestos muy estables, especialmente el DNA, por el carácter del carbono 2 de la desoxirribosa. Es precisamente este radical el que proporciona las principales diferencias entre ambos ácidos nucleicos, además de ser el principal responsable de la actividad catalítica de las ribozimas.⁵²

⁴⁹ SHARMA, Vivek; MISTELI, Tom, Non-coding RNAs in DNA damage and repair. *FEBS Letters*, 2013, vol. 587, issue 13, p. 1832–1839, doi: 10.1016/j.febslet.2013.05.006

⁵⁰ *Ibíd.* 1834

⁵¹ NELSON, David L.; COX, Michael M., LEHNINGER Principios De Bioquímica, Quinta edición, Editorial OMEGA, 2009, p. 287, ISBN 978-282-1486-5

⁵² NIELSEN, Henri, Working with RNA, EN: WALKER, John M.; NIELSEN, Henri, *RNA Methods and Protocols*, Springer Protocols. Humana press, 2011, p. 15-29, ISBN 978-1-58829-913-0

3.2.2 Apilamiento de bases. Este fenómeno fue descubierto por Wilkins y Atsbury en 1941 al tratar de validar el modelo del treta-nucleótido. Este fenómeno se produce debido a la interacción electrónica entre nubes de electrones de las bases (interacciones hidrófobas), disminuyendo la tensión superficial generada entre las bases y el agua. Al disponerse el agua por fuera del polinucleotido de una manera ordenada, este tiende aún más a agregarse. El apilamiento se puede detectar mediante el efecto hipercrómico: a medida que se apilan más bases, va disminuyendo el coeficiente de extinción molar, y también disminuye (pero de manera menos perceptible) la longitud de onda a la que se obtiene ese valor.⁵³

3.2.3 Desnaturalización de ácidos nucleicos. El DNA nativo es muy viscoso a pH 7 y temperatura ambiente (25°C). Cuando este DNA es sometido a valores extremos de pH o a temperatura superiores a los 80°C, su viscosidad desciende rápidamente, lo cual indica que el DNA ha sufrido un cambio en su estado físico, provocando la desnaturalización del DNA de doble hélice. La ruptura de los enlaces de hidrogeno de los pares de bases y del apilamiento de bases provoca el desenrollamiento de la doble hélice, ya sea totalmente, dando lugar a dos hebras sencillas completamente separadas una de otra en toda su extensión, o bien parcialmente (desnaturalización parcial). La desnaturalización no rompe ningún enlace covalente del DNA. Cada especie de DNA tiene una temperatura de desnaturalización característica, el punto de fusión (t_m): cuanto mayor es el contenido de G-C, más alto es el punto de fusión del DNA. Ello es debido a que los pares de bases G-C con tres puentes de hidrogeno, requieren más energía calórica para disociarse que los pares A-T.

Los ácidos nucleicos de doble hebra formados por dos hebras de RNA o por una de RNA y otra de DNA (híbridos RNA – DNA) también pueden desnaturalizarse. Los dúplex de RNA son más estables que los de DNA. La estabilidad de un híbrido de

⁵³ NELSON, David L.; COX, Michael M., LEHNINGER Principios De Bioquímica, Op. Cit., p. 288-289

RNA – DNA es normalmente intermedia entre la del RNA y las del DNA. Se desconoce la base física de estas diferencias de estabilidad térmica.⁵⁴

3.2.3 Transformaciones no enzimáticas. Las purinas y pirimidinas, junto con los nucleótidos de los que forman parte, experimentan una serie de alteraciones espontaneas de su estructura covalente. Estas reacciones son normalmente muy lentas, pero resultan fisiológicamente significativas a causa de la muy baja tolerancia de la célula a alteraciones de su información genética. Las alteraciones en la estructura del DNA que dan lugar a cambios permanentes en la información genética codificada por la molécula se denominan mutaciones.

Varias bases sufren procesos de desaminación (perdida de sus grupos amino exocíclicos). Por ejemplo en condiciones intracelulares típicas, la desaminación de una citosina (del DNA) para dar lugar a uracilo se produce aproximadamente en una de cada 10^7 citosinas cada 24 horas. Ello equivale a unas 100 mutaciones espontaneas por día en una célula de mamífero. La desaminación de la adenina y la guanina es aproximadamente 100 veces más lenta.

La desaminación de la citosina es casi con toda seguridad la razón por la cual el DNA contenga timina en lugar de uracilo. El producto de la desaminación de la citosina (uracilo) es reconocido enseguida como extraño y es eliminado por un sistema de reparación.⁵⁵

⁵⁴ NELSON, David L.; COX, Michael M., LEHNINGER Principios De Bioquímica, Op. Cit., p. 287-289

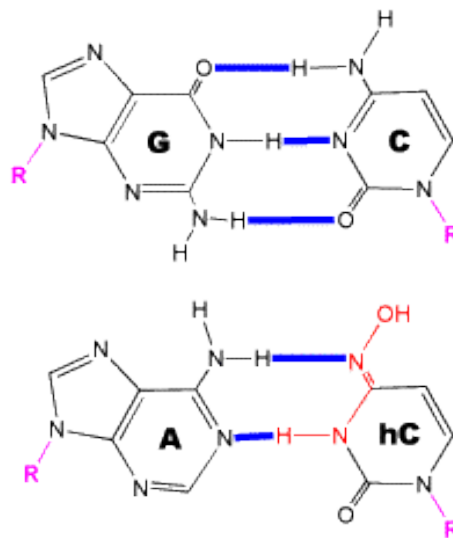
⁵⁵ NELSON, David L.; COX, Michael M., LEHNINGER Principios De Bioquímica, Op. Cit., p. 289-290

3.2.4 Reactividad química. Esta característica ha ayudado mucho a comprender la estructura, el funcionamiento y las condiciones más apropiadas para la purificación de los ácidos nucleicos. A continuación se mencionan las reacciones o modificaciones químicas más importantes.

3.2.4.1 Hidroxilamina (NH₂OH). La reacción de esta sustancia con los polinucleotidos provoca mutaciones. A pH ácido (5 a 6) provoca la hidroxilación del grupo 4 – amino de la citosina. Esta hidroxicitosina puede aparearse con la adenina, con lo que un ácido nucleico que tenga el par de bases C:G puede pasar a T:A. Este fenómeno es conocido como transición.

Por otra parte a pH muy básico (10 o mayor a 10) esta molécula reacciona con cada nucleótido de uracilo haciendo hidrolizar el anillo de uracilo. La hidroxilamina no hidroliza ni afecta los enlaces de fosfodiéster, siempre y cuando el tratamiento no sea drástico, por lo cual con este tratamiento se puede conseguir una eliminación selectiva de los uracilos en un RNA.

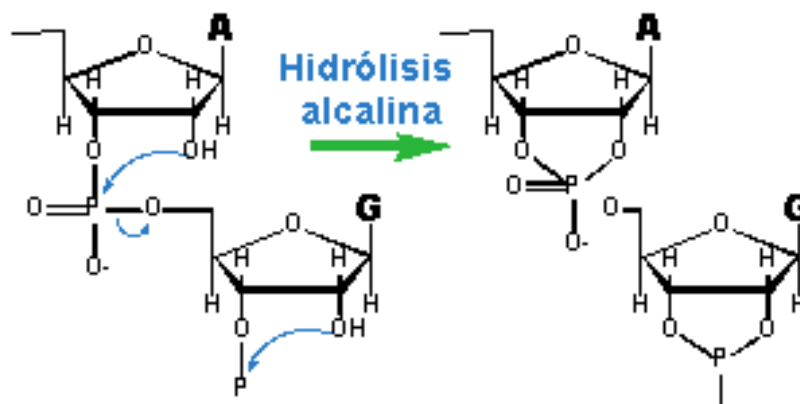
Figura 8. Modificación química mediada por Hidroxilamina (NH₂OH)



3.2.4.2 Hidrolisis del enlace β – N – glucosídico. La base nitrogenada del esqueleto del polinucleótido se puede separar mediante la hidrólisis ácida con un ácido débil, que protona el O de la pentosa. Los desoxirribonucleótidos son muy sensibles a este tratamiento, pero los ribonucleótidos tienen el grupo 2'-OH que atrae electrones de la base y el O de la pentosa es más difícil de protonar. Las purinas (A, G) se hidrolizan antes que las pirimidinas; en algunas oportunidades, la hidrolisis de las pirimidinas conduce también a la hidrólisis de la pentosa. En medio alcalino se considera que el enlace es estable. Las modificaciones de las bases, principalmente la alquilación, debilitan mucho el enlace N-glucosídico.⁵⁶

3.2.4.3 Hidrolisis del enlace fosfodiéster. Mediante hidrólisis alcalina en NaOH diluido se rompe el enlace P–O del enlace fosfodiéster en la posición 5' puesto que el grupo 2'-OH ataca al P y forma un intermediario cíclico 2'-3'-fosfato que luego se hidroliza por igual a 3' o 2' fosfato. Esta hidrólisis solo ocurre en el RNA puesto que es absolutamente dependiente del 2'-OH. De manera contraria a lo que ocurre con la hidrólisis ácida del enlace N-glucosídico, las purinas son más resistentes a hidrolizar el fosfato 3' de su nucleótido que las pirimidinas.

Figura 9. Hidrolisis del enlace fosfodiéster



⁵⁶ NELSON, David L.; COX, Michael M., LEHNINGER Principios De Bioquímica, Op. Cit., p. 290

3.3 MANIPULACIÓN, EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RNA

Como se ha mencionado, el RNA es químicamente diferente del DNA. Estas diferencias provocan profundas diferencias estructurales. Una de las principales y más significativas diferencias entre el DNA y el RNA, es la presencia del grupo 2'OH en el azúcar de este último. Este grupo 2'OH en el RNA tiene la consecuencia práctica de hacer el RNA químicamente inestable en muchas situaciones experimentales. Debido a esto ciertas reglas de trabajo deben ser implementadas para mantener la integridad del RNA, y se deben tomar precauciones especiales en comparación al trabajo con DNA.⁵⁷

3.3.1 Condiciones físicas y químicas para la manipulación de RNA. El principal desafío en cualquier situación experimental con RNA consiste en obtener moléculas intactas y mantenerlas así a través de las manipulaciones posteriores. Debido al grupo 2'-OH unido al anillo de pentosa, el esqueleto de RNA es más sensible a la degradación que el del DNA. Esto se debe a que el grupo 2'-OH adyacente al fosfodiéster puede actuar como un nucleófilo intramolecular y atacar el enlace fosfodiéster adyacente, creando un 2', 3' fosfato cíclico, fraccionando de esta manera el RNA. Hay cuatro causas principales de la degradación del RNA, pH alcalino, temperatura, iones metálicos divalentes y ribonucleasas, los cuales son evitables.⁵⁸

Cuanto mayor es el pH de una solución, más fácilmente el hidrógeno del grupo 2'-hidroxilo se abstrae por desprotonación, provocando que el oxígeno 2' sea más electronegativo. El oxígeno 2' desprotonado queda bien posicionado para el ataque

⁵⁷ NIELSEN, Henri, Working with RNA, EN: WALKER, John M.; NIELSEN, Henri, *RNA Methods and Protocols*, Springer Protocols. Humana press, 2011, p. 15-29, ISBN 978-1-58829-913-0

⁵⁸ NIELSEN, Timothy W. The Fundamentals of RNA Purification. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2013, vol. 8, p. 618–624, doi: 10.1101/pdb.top075838

nucleófilo sobre el fosfato, rompiendo así la cadena de RNA, una reacción denominada hidrólisis alcalina.⁵⁹

Al exponer el RNA durante pocos minutos a pH 9 o superior pueden causar una significativa hidrólisis alcalina; por lo tanto, es esencial mantener el RNA en soluciones tamponadas cerca al pH neutro, idealmente 6-7; pHs más altos pudieran ser necesarios para algunas aplicaciones, pero nunca es aconsejable mantener el RNA en soluciones de pH por encima de 8 durante largos períodos de tiempo. Cuanto más tiempo la molécula de RNA se mantenga a pHs alcalinos, más posibilidades de que la hidrólisis alcalina se produzca. Este tipo de hidrólisis se observa más fácilmente en moléculas grandes de RNA que en RNAs pequeños.⁶⁰

Por otra parte las altas temperaturas pueden promover una degradación del RNA similar, a la mencionada anteriormente, por lo que se recomienda trabajar con temperaturas bajas (0 – 4 °C), siempre que sea posible.

Una tercera causa común de la degradación del RNA proviene de la exposición a iones de metales divalentes, tales como Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , y Pb^{2+} . Estos iones tienen carga positiva y pueden interactuar bien con el esqueleto fosfodiéster cargado negativamente. A pH neutro, los iones metálicos divalentes pueden formar una esfera interior de interacciones con oxígenos del fosfato, facilitando la desprotonación del grupo 2'-hidroxilo, causando la hidrólisis de la hebra de RNA, como se describió anteriormente para soluciones a pH alto. La unión de metales divalentes es a menudo esencial para el plegamiento correcto del RNA y su función, y no todos los eventos de unión a metal desencadenan la hidrólisis.⁶¹

Para evitar el efecto de los iones metálicos sobre el RNA, se debe garantizar, en general, que las soluciones de RNA se hacen en agua destilada desionizada, la cual

⁵⁹ *Ibíd*, p. 618

⁶⁰ NIELSEN, Henri, *Working with RNA*, EN: WALKER, John M.; NIELSEN, Henri, *RNA Methods and Protocols*, Springer Protocols. Humana press, 2011, p. 15-29, ISBN 978-1-58829-913-0

⁶¹ NIELSEN, Timothy W. *The Fundamentals of RNA Purification*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2013, vol. 8, p. 618–624, doi: 10.1101/pdb.top075838

debe contener un quelante de metales tal como EDTA. La principal fuente de metales divalentes, son contaminantes de las soluciones tamponadas, tales como acetato de sodio. Diversos quelantes con distintas afinidades para los diferentes iones divalentes están disponibles. EDTA es ampliamente utilizado debido a su afinidad por el Mg^{2+} , el contaminante más común, además de su buena afinidad general por otros metales. EGTA es un buen quelante de Ca^{2+} , pero no Mg^{2+} , y trinitriiloacetato (TNA) es particularmente bueno para quelar Zn^{2+} . Sin embargo, la utilización de quelantes, particularmente de EDTA, debe mantenerse en las menores concentraciones posibles y durante tiempos cortos.⁶²

La contaminación del DNA también es un problema al extraer RNA de diversas fuentes y puede resultar en problemas para las diversas aplicaciones en las que RNA de alta pureza es necesario (p. e. qtPCR). En estos casos, es recomendable realizar una digestión del DNA que pueda haber con DNAsas.⁶³

Finalmente la circunstancia más crítica que debe ser controlada es la exposición a RNAsas. Estas pueden ser de dos tipos, endógenas (procedentes del mismo material biológico) o exógenas (presentes en el ambiente experimental). RNAsas están en todas partes y pueden estar presentes en el polvo, cristalería tratada inadecuadamente, pipetas contaminadas, nuestra propia piel, bacterias, mohos, o cualquier cosa que haya estado en contacto con una superficie contaminada. Vale la pena señalar que muchas RNAsas, por ejemplo, RNasa A, son resistentes a los agentes quelantes de metales y pueden resistir las temperaturas convencionales de esterilización. Es de suma importancia reconocer las fuentes potenciales de RNAsa.⁶⁴

Las RNAsas endógenas se encuentran en los compartimentos celulares y son liberadas durante la lisis celular. Para evitar la presencia de estos tipos de RNAsas,

⁶² *Ibíd.*, p. 620

⁶³ NIELSEN, Henri, *Working with RNA*, EN: WALKER, John M.; NIELSEN, Henri, *RNA Methods and Protocols*, Springer Protocols. Humana press, 2011, p. 15-29, ISBN 978-1-58829-913-0

⁶⁴ *Ibíd.*, p. 17-18

la lisis es realizada en presencia de un reactivo desnaturalizante, como el tiocianato de guanidino, la eparina o péptidos inhibidores de RNAsas.

Las RNAsas exógenas, son particularmente difíciles de evitar. La mayoría de los protocolos de trabajo con RNA recomienda limpiar todo el material de trabajo con agua con DEPC y que todas las soluciones se preparen con agua libre de RNAsas o agua tratada con DEPC. Así mismo, los artículos plásticos pueden ser tratados con NaOH, EDTA y posteriormente lavados con agua con DEPC.⁶⁵

3.3.2 Técnicas de extracción de RNA. A mediados de los 80s el método más utilizado para la extracción de RNA a partir de células y tejidos, era el método desarrollado por Chirgwin y col., el cual se basa en la utilización de tiocianato de guanidino, uno de los más efectivos agentes desnaturalizantes de proteínas y capaz de desnaturalizar eficientemente ribonucleasas endógenas. Este método es muy eficiente para separar RNA de DNA, pero requiere largas horas de ultracentrifugación con CsCl. La técnica de ultracentrifugación se basa en la separación de proteínas, RNA y DNA a través del gradiente de CsCl debido a sus diferencias de densidad. Debido al grupo 2'-OH, el RNA es significativamente más denso que el DNA, y ambos RNA y DNA son significativamente más densos que las proteínas. La densidad del amortiguador de CsCl se ajusta de tal modo que el DNA no entra en el amortiguador, mientras que el RNA atraviesa el amortiguador y forma gránulos en la parte inferior del tubo.⁶⁶

El descubrimiento hecho por Piotr Chomczynski y Nicoletta Sacchi de que la mayoría del RNA total (pero no el DNA y las proteínas) de células y tejidos, permanece soluble en la fase superior acuosa – acida luego de una sola extracción con tiocianato de guanidino, fenol y cloroformo, seguida de un procedimiento de centrifugación convencional, facilitó la extracción de RNA para quienes no contaban

⁶⁵ NIELSEN, Henri, Working with RNA, Op. Cit., p. 18

⁶⁶ MARTINS, R.; QUEIROZ, J. A.; SOUSA, F. Ribonucleic acid purification. *Journal of Chromatography A*, 2014, vol. 1355, p. 1-14

con la facilidad de una ultracentrífuga. Estos resultados fueron publicados en el año 1987 y este método se convirtió en la técnica básica de extracción de RNA.⁶⁷

3.3.3 Técnica básica. Desde su introducción (Chomczynski y Sacchi,⁶⁸ 1987), el método de extracción de RNA de un solo paso se ha usado ampliamente para el aislamiento de RNA a partir de un gran número de muestras. Este procedimiento permite, a su vez, la recuperación del RNA total de pequeñas cantidades de tejido o células, por lo que es adecuada para estudios de expresión génica, en los que, casi siempre, la cantidad de células o tejido disponibles es limitada.

El método de aislamiento de un solo paso se basa en la propiedad del RNA de permanecer soluble en agua en una solución que contiene tiocianato de guanidina y pH ácido, en presencia de una fase orgánica de fenol/cloroformo. Bajo tales condiciones ácidas, la mayoría de las proteínas y pequeños fragmentos de DNA (50 bases a 10 kb) se encuentran en la fase orgánica, mientras que los fragmentos más grandes de DNA y algunas proteínas permanecen en la interface.⁶⁹

En este protocolo, las células o tejidos cultivados se homogenizan en una solución desnaturizante que contiene tiocianato de guanidina. El Tiocianato de guanidina es uno de los desnaturizantes de proteínas más eficaces que se conocen. El uso de guanidina para lisar las células se desarrolló originalmente para permitir la purificación de RNA de las células con alto contenido de ribonucleasas endógenas. El homogenizado se mezcla secuencialmente con acetato de sodio, fenol, y finalmente cloroformo/alcohol isoamílico. La mezcla resultante se centrifuga, dando una fase acuosa superior que contiene el RNA total. En esta extracción de un solo paso, el RNA total se separa de proteínas y del DNA que permanecen en la interface

⁶⁷ CHOMCZYNSKI, Piotr; SACCHI, Nicoletta. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years. *Nature protocols*, 2006, vol. 1, no 2, p. 581-585

⁶⁸ *Ibid.*, p. 581-585

⁶⁹ KINGSTON, Robert E.; CHOMCZYNSKI, Piotr; SACCHI, Nicoletta, Guanidine Methods for Total RNA, *Current Protocols in Molecular Biology*, 1996, suplemento 36, p. 1-9

y en la fase orgánica. La fase acuosa es transferida a otro recipiente y el RNA total se precipita en isopropanol, se centrifuga, y el sedimento de RNA se re disuelve en solución desnaturizante (que contiene tiocianato de guanidina). Se realiza una nueva precipitación del RNA con isopropanol, se centrifuga y se lava el sedimento con etanol al 75%. Finalmente se deja secar el RNA obtenido y se almacena para su posterior utilización.⁷⁰

3.3.3.1 Parámetros críticos. Uno de los puntos más importantes para asegurar una extracción exitosa de RNA es tener un medio libre de RNAsas durante todos los pasos del protocolo; una de las estrategias usadas para asegurar esto, es hacer que todas las soluciones que entren en contacto con el RNA después de añadir la solución de guanidina sean tratadas con DEPC, con la excepción de la solución de TES (Tris – EDTA – SDS; Tris inactiva DEPC).

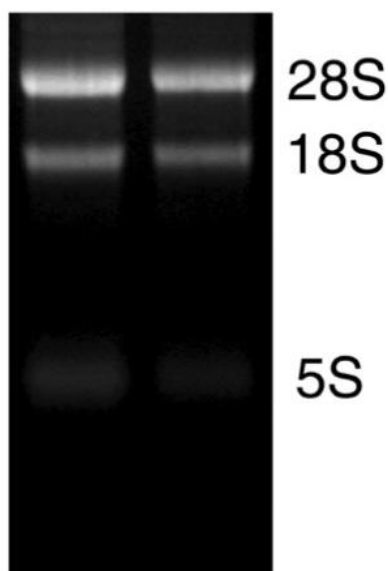
Otros aspectos importantes a considerar cuando se utiliza el protocolo de un solo paso son: en primer lugar, el tejido fresco es preferible para el aislamiento de RNA. Alternativamente, el tejido se debe congelar inmediatamente extraído, en nitrógeno líquido y se almacenan a -70 ° C. En segundo lugar, es importante no dejar que el precipitado final de RNA se seque por completo, ya que esto disminuye considerablemente su solubilidad. Esto es crítico en todos los métodos de aislamiento de RNA. La solubilidad del RNA se puede mejorar por calentamiento a 55 ° a 60 ° C con agitación con vórtex intermitente.⁷¹

⁷⁰ CHOMCZYNSKI, Piotr; SACCHI, Nicoletta. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years, Op. Cit., p. 583

⁷¹ KINGSTON, Robert E.; CHOMCZYNSKI, Piotr; SACCHI, Nicoletta, Guanidine Methods for Total RNA, Op. Cit., p. 8

3.3.3.2 Resultados previstos. El método de una sola etapa produce todo el espectro de moléculas de RNA, incluyendo las subunidades pequeñas (4S y 5S). La cantidad de RNA aislado depende del tejido utilizado para el aislamiento. Típicamente, a partir de 100 mg de tejido muscular se aíslan de 100 a 150 µg de RNA total y a partir de 100 mg de hígado se pueden aislar hasta 800 µg. El rendimiento de RNA total de 10^7 células cultivadas, oscila entre 50 y 80 µg para los fibroblastos y linfocitos y entre 100 a 120 µg para células epiteliales. El patrón electroforético de RNA aislado por el método de un solo paso contiene tres fracciones, 28s, 18s y 5s (Figura 10).⁷²

Figura 10. Electroforesis esperada de un RNA de buena calidad.



Fuente: CHOMCZYNSKI, Piotr; SACCHI, Nicoletta. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years.

⁷² CHOMCZYNSKI, Piotr; SACCHI, Nicoletta. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years, *Op. Cit.*, 585

3.3.4 Cuantificación del RNA. Los ácidos nucleicos son generalmente cuantificados por espectroscopia UV a 260 nm. Por regla general una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a una concentración de 40 mg/ml de una hebra sencilla de RNA. El valor exacto depende de la estructura del RNA (La hipocromicidad se genera por el apilamiento de bases) y pH. Otros factores influyen este valor indirectamente por la influencia que tienen en el plegamiento del RNA, p. e., fuerza iónica, tipo de iones presentes, presencia de EDTA y agentes desnaturizantes, y la temperatura. Por estas razones la cuantificación debe realizarse preferiblemente en soluciones tampón salinas en lugar de agua.

Dado que los nucleótidos, RNA, ssDNA y dsDNA absorben a 260 nm, todos contribuirán a la absorbancia total de la muestra. Por lo tanto, para asegurar resultados precisos, las muestras de ácido nucleico requerirán purificación antes de la medición.⁷³

La relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm se utiliza para evaluar la pureza de DNA y RNA. Una muestra pura de RNA presenta una relación $A_{260}/A_{280} > 1.8$, donde 280 nm es la longitud de onda de máxima absorbancia de las proteínas. Si la proporción es apreciablemente más baja, puede indicar la presencia de residuos de tirosina, proteínas, fenol u otros contaminantes que absorben fuertemente en 280 nm o cerca de dicha longitud de onda.⁷⁴

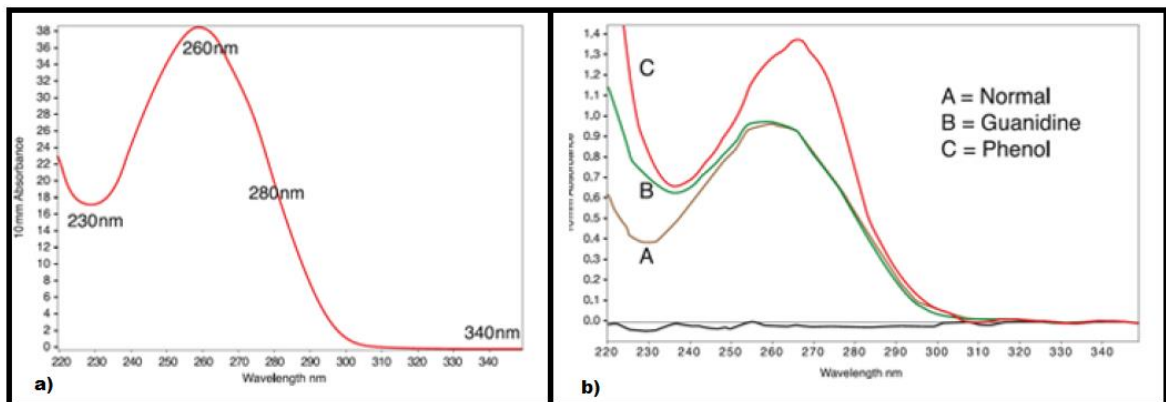
Así mismo la muestra debe presentar un valor de la relación $A_{260}/A_{230} > 2.0$. Esta relación se utiliza como una medida secundaria de la pureza del ácido nucleico. Los valores de A_{260}/A_{230} para ácido nucleico "puro" son a menudo más altos que los respectivos valores de A_{260}/A_{280} . Si la relación es sensiblemente más baja de lo esperado, puede indicar la presencia de contaminantes que absorben a 230 nm, p. e. tiocianato de guanidino, el cual tiene un máximo de absorción a 230 nm,

⁷³ THERMO SCIENTIFIC, Nucleic Acid Purity Ratios, Technical Bulletin, 1975, vol. 17, p. 8–9

⁷⁴ DESJARDINS, Philippe, CONKLIN, Deborah, NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids, *Journal of Visualized Experiments and Thermo Fisher Scientific*, 2010, vol 45, p. 1–4, doi: 10.3791/2565

carbohidratos y fenol los cuales tienen una absorbancia máxima cerca de 230 nm (Figura 11).⁷⁵

Figura 11. Espectros UV-VIS de muestras de RNA. a) Perfil característico de una muestra típica de ácido nucleico. b) Los desplazamientos en los picos y valles de las muestras B y C en comparación con la muestra A ilustran cómo los contaminantes pueden afectar los espectros de muestras de ácido nucleico.



Modificado de: DESJARDINS, Philippe, CONKLIN, Deborah, NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids

Un problema en la cuantificación por medio de espectroscopia es la pérdida de muestra durante el procedimiento. Normalmente, la concentración de RNA debe ser mayor a 5 µg/ml para obtener una medida confiable. Sin embargo, con la utilización de los nuevos equipos de espectrofotometría que utilizan micro volúmenes esta dificultad tiende a ser superada.

⁷⁵ THERMO SCIENTIFIC, Nucleic Acid Purity Ratios, Op. Cit., p. 2

Otra alternativa para cuantificar el RNA extraído, es el uso de ensayos fluorométricos. Los cuales están basados en la unión de un compuesto al RNA, p. e., RiboGreen (Molecular Probes), seguido por medidas de fluorescencia (excitación a 480 nm, emisión a 520 nm) y puede ser aplicado a concentraciones en el rango de 1 – 1000 pg/μl. Una de las principales ventajas de la cuantificación con RiboGreen es que es específico para RNA, en contraste con la espectroscopia UV, la cual también mide la concentración de DNA.⁷⁶

3.3.5 Métodos comerciales. Hay varios estuches comerciales para el aislamiento de RNA total los cuales utilizan métodos basados en guanidina y el procedimiento de un solo paso. El uso de estos estuches disminuye el tiempo necesario para la extracción de RNA, pero a un precio sustancialmente más alto que el método básico.

A continuación se mencionan los principios de funcionamiento de algunos de los estuches comerciales disponibles para el aislamiento de RNA.

3.3.5.1 RNeasy mini kit. Este estuche combina las propiedades de unión selectiva de una membrana a base de sílice, con la velocidad de la tecnología “micro spin”. Un sistema especializado de tampón de alta salinidad permite que hasta 100 μg de RNA (de más de 200 bases) se unan a la membrana de gel de sílice. El procedimiento general de extracción se inicia con la lisis de las muestras biológicas y posterior homogenización en presencia de un tampón de isotiocianato de guanidina altamente desnaturizante, el cual contiene un reactivo adicional para la inactivación de las RNasas, con el fin de asegurar el aislamiento de RNA intacto. Posterior a esto se puede añadir etanol para proporcionar condiciones de unión apropiadas a la membrana de sílice y se introduce la muestra a la columna de centrifugación RNeasy, donde el RNA total se une a la membrana y los

⁷⁶ NIELSEN, Henri, *Working with RNA*, EN: WALKER, John M.; NIELSEN, Henri, *RNA Methods and Protocols*, Springer Protocols. Humana press, 2011, p. 15-29, ISBN 978-1-58829-913-0

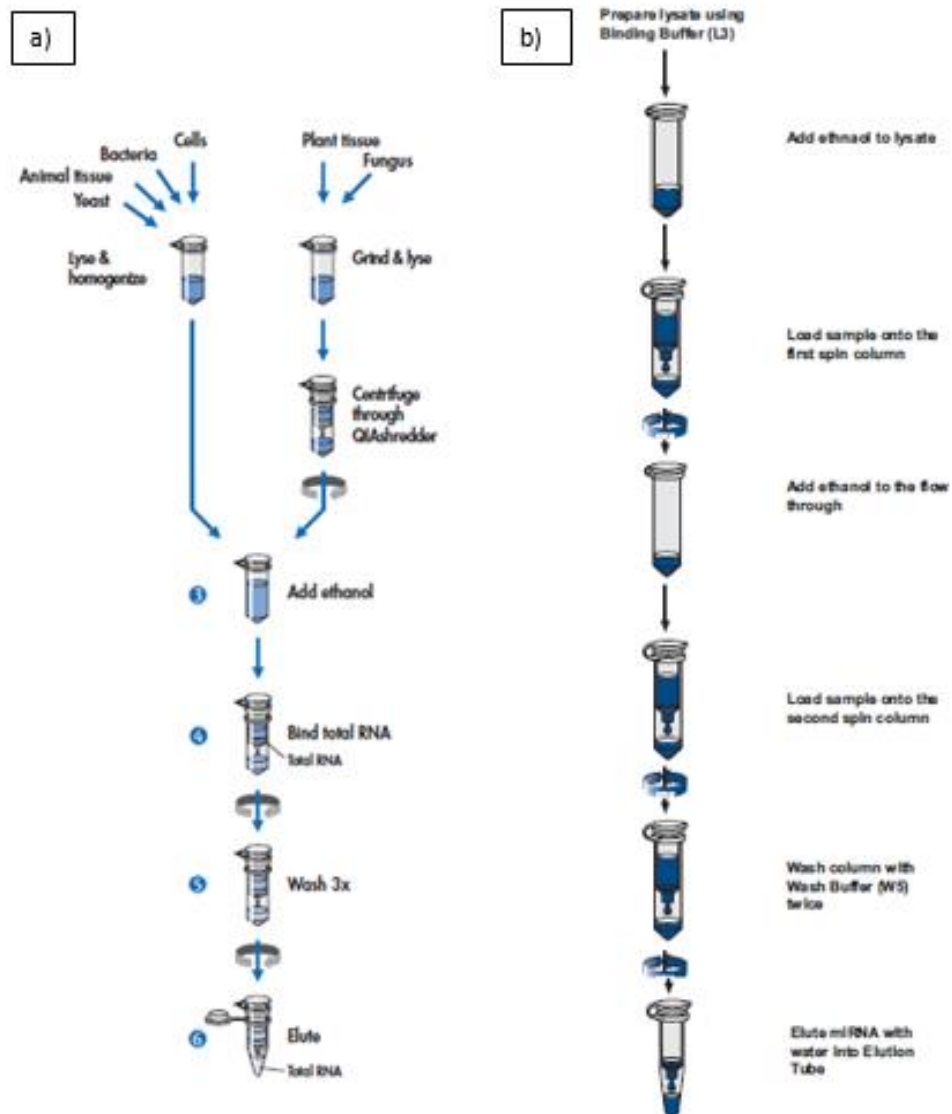
contaminantes se lavan de manera eficiente con lavados simples, utilizando soluciones tamponadas incluidas en el estuche. Finalmente el RNA de alta calidad se eluye con 30µL, o más, de agua libre de RNAsas.⁷⁷

3.3.5.2 PureLink® miRNA Isolation Kit. El estuche de aislamiento de PureLink® miRNA proporciona un método rápido y eficiente para purificar pequeñas moléculas de RNA a partir de muestras biológicas para el análisis funcional. El estuche está diseñado específicamente para aislar pequeñas moléculas de RNA de alta calidad, incluyendo tRNA, rRNA 5S, rRNA 5.8S y moléculas de RNA reguladoras tales como microRNA (miARN) y RNA de interferencia corto (siRNA). Este estuche se basa en la unión selectiva de pequeñas moléculas de RNA a la membrana a base de sílice, en presencia de etanol al 70%. El lisado se puede preparar a partir de células y tejidos de mamífero, tejidos vegetales, E. coli y células de levadura utilizando un tampón de unión que contienen isotiocianato de guanidina más un agente caotrópico capaz de proteger el RNA de RNAsas endógenos. Se añade etanol al lisado a una concentración final de 35% y el lisado se procesa a través de una primera columna. Las moléculas grandes de RNA se unen a la membrana a base de sílice en la columna, mientras que las moléculas pequeñas de RNA se eluyen de la columna. Se añade etanol a la fracción en una concentración final de 70% y la muestra se carga en una segunda columna. Las moléculas pequeñas de RNA se unen a la membrana a base de sílice en esta columna y las impurezas se eliminan por lavado con una solución tampón de lavado. El RNA se eluye en agua estéril libre de RNasa.⁷⁸

⁷⁷ QUIAGEN, RNeasy® Mini Handbook, cuarta edición, 2012, p. 1-80

⁷⁸ LIFE TECHNOLOGIES, PureLink miRNA Isolation Kit, 2005, Catalogo numbers k1570-1, revisión 2.0, p. 1-19.

Figura 12. Protocolos de extracción con estuches comerciales. a) Protocolo para extracción de RNA con el estuche RNeasy (Quiagen). b) Protocolo para extracción de RNA con el estuche PureLink® miRNA Isolation Estuche.



Modificado de: RNeasy® Mini Handbook - Quiagen. 344, (2008) y (Life technologies). PureLink™ miRNA Isolation Kit. Methods (2005).

3.3.5.3 Trisure y TRIzol LS. El reactivo Trisure es un reactivo clásico semejante al TRIzol, listo para usar, diseñado para aislar RNA total de alta calidad (así como DNA y proteínas) a partir de muestras de células y tejidos de origen humano, animal, vegetal, levadura, o bacterias. Trisure es una solución monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina, y otros componentes que facilitan el aislamiento de una variedad de especies de RNA de tamaño molecular grande o pequeño. La propiedad inhibidora de RNAsa altamente eficaz de Trisure protege la integridad del RNA durante la lisis y da como resultado el aislamiento de material de alta calidad. 1 ml de TRIsure es suficiente para aislar RNA de 1×10^7 células o 100 mg de tejido.

Trisure permite al usuario realizar la precipitación secuencial de RNA, DNA y proteínas a partir de una sola muestra. Después de homogeneizar la muestra con reactivo Trisure, se añade cloroformo, se homogeniza y esto permite la formación de una capa transparente superior acuosa (que contiene RNA), una interfase, y una capa orgánica inferior roja (que contiene el DNA y las proteínas). El RNA se precipita de la capa acuosa con isopropanol.⁷⁹

Por otra parte el reactivo TRIzol también se puede utilizar para extraer el RNA a partir de muestras líquidas (por ejemplo, extractos celulares). Para esto se utiliza una formulación diferente de TRIzol -TRIzol LS- diseñado para muestras líquidas.

80

⁷⁹ BIOLINE, Protocol for the Isolation of RNA using TRIsure, 2000, catalog numbers BIO-38032, vol. 3, p. 60–61

⁸⁰ LIFE TECHNOLOGIES, TRIzol ® LS Reagent, 2012, Catalogo numbers 10296-028, p. 3-6

3.3.6 Ventajas y desventajas de los métodos de extracción de RNA. A continuación se muestra una tabla en la cual se describen las ventajas y desventajas de los diferentes métodos de extracción de RNA

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los métodos de extracción de RNA

Método	Ventajas	Desventajas
Guanidina – CsCl.	<ul style="list-style-type: none"> - Económico. - Se logra extraer RNA libre de DNA. 	<ul style="list-style-type: none"> - Protocolo extenso. - Utilización de reactivos tóxicos. - Ultracentrifugación - Difícil re-suspender el RNA y RNAs pequeños son poco recuperables.
Método de un solo paso.	<ul style="list-style-type: none"> - Económico. - Mayor protección contra RNAsas. - Buenos rendimientos y pureza. 	<ul style="list-style-type: none"> - Requisito de productos químicos tóxicos. - Implica gran cantidad de tiempo. - Altamente dependiente del operador.
Estuches comerciales basados en el uso de sílica – gel. <ul style="list-style-type: none"> - RNeasy - PureLink® miRNA - NucleoSpin® 	<ul style="list-style-type: none"> - Rápido. - No requiere el uso de disolventes orgánicos o precipitación con alcohol. - Susceptibles de automatización. 	<ul style="list-style-type: none"> - Costoso. - Capacidades de unión del RNA baja. - La purificación se basa en mecanismos de adsorción / desorción en superficies sólidas. - Generalmente no diferencia entre el RNA o DNA. - Requiere tratamiento con DNAsa.
Trisure TRIzol® TRIzol LS	<ul style="list-style-type: none"> - Reactivos son prefabricados - Procedimiento es rápido y sencillo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Posible contaminación con concentraciones altas de sal en la fase acuosa y con DNA y proteínas.

4. METODOLOGÍA

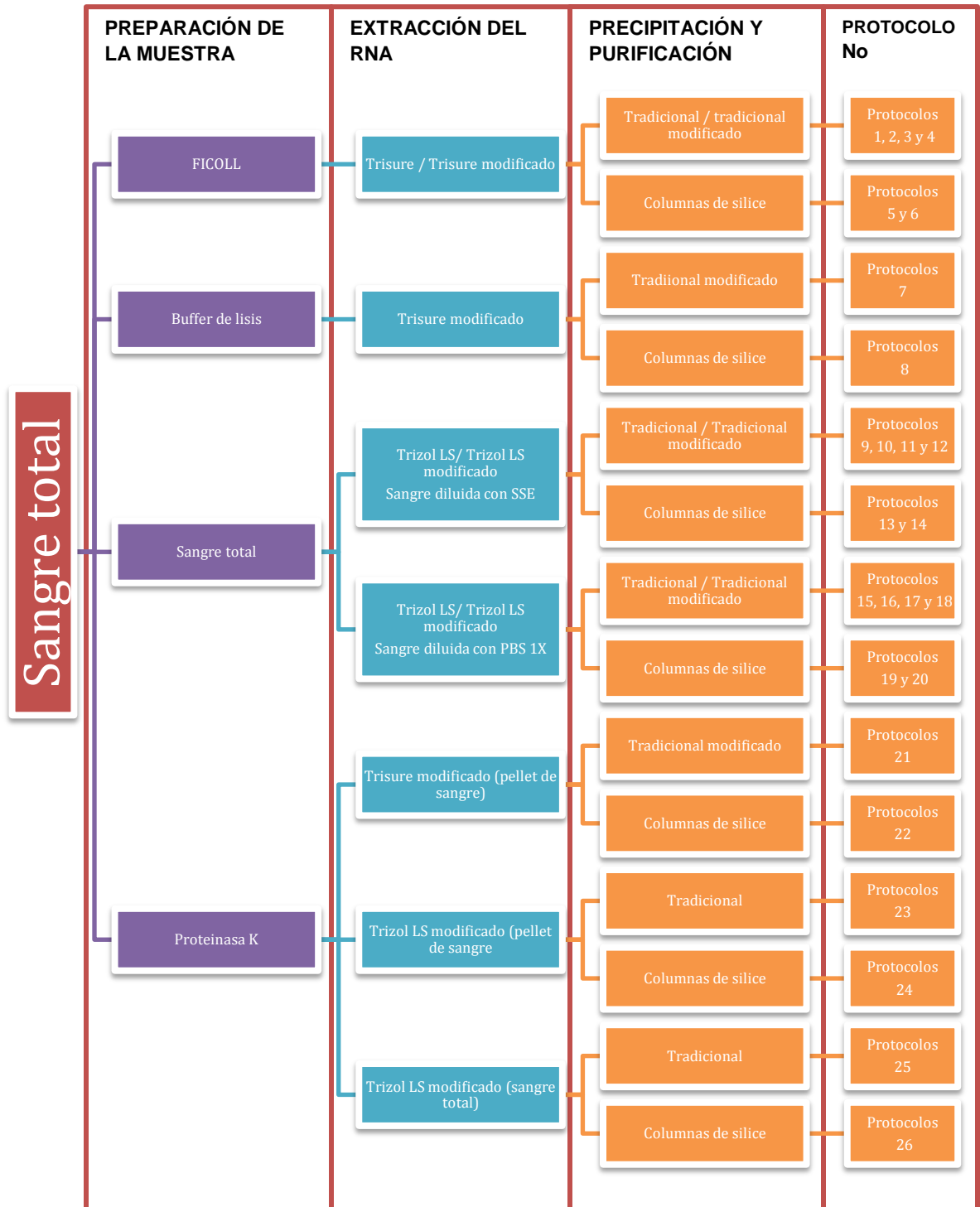
4.1 REACTIVOS Y EQUIPOS

Los reactivos utilizados fueron Cloroformo, isopropanol, Etanol, ácido acético, Hidróxido de sodio, formaldehído, sucrosa, Triton X100, glicerol, azul de bromofenol, fueron obtenidos de Merck; Acetato de sodio, proteinasa k, se obtuvieron de sigma aldrich; EDTA, Tris HCl, se obtuvieron de Promega; DEPC (Armesco); Formamida y MOPS obtenidos de Calbiochem; Agarosa (Lonza); FICOLL (BIO RAD); Trisure (BIO LINE); TRizol LS (Invitrogen). Los equipos empleados fueron Microcentrifuga (Mikro 200R, Hettich Zentrifugen), NanoDrop (Thermo scientific), bloque seco (multi – block Heather, LabLine), cámara de electroforesis (powerpac HC, BIO RAD).

4.2 MÉTODOS EXPERIMENTALES

Para el desarrollo de la investigación se escogieron diversos procedimientos básicos y diferentes procedimientos mejorados, que se han implementado en los últimos años para las tres etapas de extracción (preparación de las muestras, extracción del RNA y precipitación y purificación del extracto), y se diseñaron 26 protocolos, combinando las diferentes metodologías escogidas. Se cuantificó y determinó la calidad del RNA obtenido. Se eligieron los tres protocolos que arrojan mejores resultados, teniendo en cuenta cantidad de RNA obtenido, calidad del RNA y tiempo total de extracción. Finalmente se realizó la electroforesis del RNA obtenido a los tres protocolos que mostraron mejores resultados y se determinó cual fue el mejor protocolo basado en la implementación de las mejores adaptaciones de los principios básicos. Se realizó una extracción utilizando el mejor protocolo y se añadió a esta un paso más (digestión con DNAsas), con el fin de asegurar la pureza del RNA obtenido.

Figura 13. Diagrama experimental



4.2.1 Preparación de la muestra

4.2.1.1 Separación de glóbulos blancos (Separación por gradientes de densidad, FICOLL – HYPAQUE). Se recolectó la sangre en tubos “tapa lila” (VACUETTE, 4mL, con EDTA; Greiner BIO-One, USA). La sangre recolectada se diluyó en proporción 1:1 con solución PBS 1X. Se agregaron 4 mL de Ficoll – Hypaque, en un tubo falcon de 15mL y se añadieron 11 mL de sangre diluida, de tal manera que no se mezclen los dos volúmenes. Se centrifugó a 2500 r.p.m. durante 20 min a temperatura ambiente. Se extrajo toda la banda de células mononucleares (CMSP: Células mononucleares de sangre periférica) a un tubo falcon nuevo. Se realizaron lavados con SSE para eliminar los glóbulos rojos aún presentes, para esto se resuspendió el pellet en 5mL de SSE y se centrifugó a 2500 r.p.m. durante 10 min a temperatura ambiente. Se transfirió el pellet a un tubo eppendorf de 1,5 mL y se realizó un lavado final con 1 mL de solución salina, centrifugando a 10.000 r.p.m. por 5 min. Finalmente se almacenó el pellet obtenido a -20°C para, posteriormente, iniciar la extracción del RNA.

4.2.1.2 Tampón de lisis. Se probó un tampón de lisis de glóbulos rojos, el cual está compuesto de sucrosa 0.32 M, Tris HCL 10 mM, MgCl₂ 5 mM, Triton X100 1% y agua libre de RNAsas. Se agregaron 500 y 700 µL de sangre total a viales de 1.5 mL y a cada vial se agregaron 700 µL de tampón de lisis, se centrifugó a 4000 r.p.m. durante 5 min a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante. El procedimiento se repitió tres veces y se realizó un lavado final del pellet con 1 mL de SSE, centrifugando 10.000 r.p.m. por 5 min. Finalmente se almaceno el pellet obtenido a -20°C para, posteriormente, iniciar la extracción del RNA con Trisure.

4.2.1.3 Sangre total. Se recolectó sangre periférica en tubos “tapa lila”. En un vial de 1.5 mL, luego se agregaron 125 μ L de sangre y se diluyó con SSE y PBS 1X (125 μ L de cada uno). Se invirtió repetidas veces el vial y se inició la extracción con Trizol LS.

4.2.1.4 Proteinasa K. Se realizaron dos procedimientos diferentes con una solución de proteinasa K (2 mg/mL en Tris 20 mM, pH 7.5, EDTA 10 mM, 0,1% SDS). (a) Se realizó una separación de glóbulos blancos mediante gradiente de densidad, al pellet obtenido se le agregaron 100 μ L de proteinasa k y la solución final se incubó a 65°C durante una hora agitando con vórtex cada 10 min, finalmente se realizó la extracción del RNA utilizando Trisure (se centrifugo y al pellet obtenido se le agrego Trisure) o TRizol LS (se completó el volumen de la muestra hasta 250 μ L y se agregó TRizol LS); (b) En viales de 1.5 mL se depositaron 50 μ L de sangre total, se agregaron volúmenes iguales de proteinasa K y la solución final se incubo a 45°C durante una hora agitando con vórtex cada 10 min, finalmente se completó el volumen de la muestra hasta 250 μ L y se realizó la extracción del RNA con TRizol LS.

4.2.2 Extracción del RNA

4.2.2.1 Trisure. Se adicionó 1 mL de Trisure a cada vial con CMSP y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos. Se adicionaron 0,2 mL de cloroformo, se agitó durante 15 segundos vigorosamente y se incubó durante 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó la muestra a 12000 r.p.m., por 15 minutos a 4°C. La muestra

se separó en una fase orgánica verde pálido, una interface y una fase acuosa superior incolora que contiene el RNA.⁸¹

4.2.2.2 Trisure modificado. Se adicionó 1 mL de Trisure a cada vial con CMSP y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos. Se adicionaron 0,2 mL de cloroformo frío, se agitó durante 15 segundos vigorosamente y se incubó durante 15 min en hielo. Se centrifugó la muestra a 12000 r.p.m., por 15 minutos a 4°C. La muestra se separa en una fase orgánica verde pálido, una interface y una fase acuosa superior incolora que contiene el RNA.

4.2.2.3 TRizol LS. A un vial de 1.5 mL se agregaron 0.25 mL de sangre diluida en proporción 1:1 (PBS 1X y SSE), se adicionó 0.75 mL de TRizol LS a cada vial y se homogenizó pipeteando la suspensión varias veces. La muestra homogenizada se incubó a temperatura ambiente durante 5 min para permitir la disociación completa de los complejos nucleoprotéicos. Se adicionaron 0,2 mL de cloroformo, se agitó durante 15 segundos vigorosamente y se incubó durante 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó la muestra a 12000 r.p.m., por 15 minutos a 4°C. La muestra se separa en una fase orgánica roja, una interface y una fase acuosa superior incolora que contiene el RNA.⁸²

4.2.2.4 TRizol LS modificado. A un vial de 1.5 mL se agregaron 0.25 mL de sangre diluida en proporción 1:1 (PBS 1X y SSE), se adicionó 0.75 mL de TRizol LS a cada vial y se homogenizó pipeteando la suspensión varias veces. La muestra homogenizada se incubó a temperatura ambiente durante 5 min para permitir la disociación completa de los complejos nucleoprotéicos. Se adicionaron 0,2 mL de

⁸¹ BIOLINE, Protocol for the Isolation of RNA using TRisure, 2000, catalog numbers BIO-38032, vol. 3, p. 60–61

⁸² LIFE TECHNOLOGIES, TRizol ® LS Reagent, 2012, Catalogo numbers 10296-028, p. 3-6

cloroformo frío, se agitó durante 15 segundos vigorosamente y se incubó durante 15 min en hielo. Se centrifugó la muestra a 12000 r.p.m., por 15 minutos a 4°C. La muestra se separa en una fase orgánica roja, una interface y una fase acuosa superior incolora que contiene el RNA.

4.2.3 Precipitación y purificación del extracto

4.2.3.1 Protocolo tradicional. La fase acuosa obtenida luego de la extracción con Trisure y TRIzol LS se transfirió a un nuevo vial de 1,5 mL y se le adicionaron 0,5 mL de isopropanol, luego se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 r.p.m. por 10 minutos a 4° C. Se descartó cuidadosamente el sobrenadante, y el pellet de RNA se lavó con 1mL de etanol al 75% (El etanol se diluyó con agua ultra pura estéril tratada con DEPC). Se mezcló con vórtex y se centrifugó a 7500 r.p.m. por 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante. Se dejó secar el pellet de RNA al aire durante 5 minutos. Finalmente se resuspendió el pellet de RNA en 40 µL de agua libre de RNAsas y se almacenó a -70°C para posteriores análisis.⁸³

4.2.3.2 Protocolo tradicional modificado. La fase acuosa obtenida luego de la extracción con Trisure y TRIzol LS se transfirió a un nuevo vial de 1,5 mL y se le adicionaron 0,5 mL de isopropanol frío, luego se incubó durante 10 min en hielo. Se centrifugó a 12000 r.p.m. por 10 minutos a 4° C. Se descartó cuidadosamente el sobrenadante, y el pellet de RNA se lavó con 1mL de etanol al 75% (El etanol se diluyó con agua ultra pura estéril tratada con DEPC) y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Se mezcló con vórtex y se centrifugó a 1000 r.p.m. por 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se repitió el lavado con etanol. Se dejó secar el pellet de RNA al aire durante 5 minutos y se incubó por 3 min a 56 °C.

⁸³ BIOLINE, Protocol for the Isolation of RNA using TRIsure, Op. Cit., p. 60

Finalmente se resuspendió el pellet de RNA en 40 μ L de agua libre de RNAsas y se almacenó a -70°C para posteriores análisis.

4.2.3.3 Protocolo utilizando columnas de sílice. Se transfirió la fase acuosa obtenida luego de la extracción con Trisure y TRIzol LS a un nuevo vial de 1,5 mL y se le adicionó etanol al 96% en relación 1:1 con el sobrenadante. Se agitó vigorosamente con vórtex y luego se cargó en la columna de sílice genérica. Se montó la columna de extracción en un tubo de microcentrífuga y se centrifugó a 8.000 g durante 45 s. Se desechó el líquido y se lavó la columna dos veces, primero con 450 μ L de acetato de sodio 3M, para eliminar polisacáridos, proteínas y pigmentos; y luego con 320 μ L de etanol al 70% para eliminar las sales. Entre y después de los lavados, la columna se centrifugó a 8.000 g durante 45 s y se descartó los líquidos. La columna se secó por centrifugación a velocidad máxima durante 2 min. Para la elución del RNA de la columna, se añadió 40 μ L de agua tratada con DEPC a 60°C directamente a la membrana de la columna y se incubó durante 2 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 8000 g durante 2 min y se repitió el procedimiento para aumentar el rendimiento de la extracción de RNA.⁸⁴

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1 Cuantificación del RNA. La cuantificación del RNA se realizó mediante espectroscopia UV. Se incubó el RNA obtenido durante 10 min a 56°C en un bloque seco. Se agitó vigorosamente con vórtex y se realizó la medición de concentración y de absorbancias (A_{260} , A_{280} y A_{230}) del RNA obtenido utilizando el NanoDrop.

⁸⁴ YAFFE, Hila, et al. LogSpin: a simple, economical and fast method for RNA isolation from infected or healthy plants and other eukaryotic tissues. *BioMed Center research notes*, 2012, vol. 5, no 45, p. 7

4.3.2 Electroforesis. Se realizaron electroforesis de los RNAs obtenidos con los tres mejores protocolos, con el fin de observar las bandas características de los diferentes tipos de RNAs. Primero se preparó el gel de agarosa al 1,5 % utilizando buffer MEN 1X (a 43,5 mL de agua, tratada con DEPC, se añaden 5 mL de tampón MEN 10X y 0,75 g de agarosa, se calienta hasta que se disuelva toda la agarosa, se deja enfriar hasta 55°C, se agregan 2,05 mL de formaldehído al 37%, se mezcla suavemente, se vierte el contenido en el molde y se deja solidificar el gel entre 20 y 30 min), se colocó el gel en la cámara de electroforesis y se agregó MEN 1X hasta cubrir el gel. Para las muestras, se incubó el RNA obtenido durante 10 min a 56°C en un bloque seco, se adicionó a un vial el volumen correspondiente a 1 µg de RNA, y por cada volumen de la muestra se añadieron 5 volúmenes de buffer de carga, se calentó el vial a 65 °C durante 10 minutos, posterior a esto se colocó en hielo y se agregó bromuro de etidio (1mg/mL) y finalmente se cargaron las muestras en el gel. Para el marcador de peso se adicionaron 4 uL de agua libre de RNAsas, 1 uL de loading y 1 uL de marcador de peso molecular gen ruler de 1 kb; se mezclaron y se sirvieron en el gel. Se dio inicio a la electroforesis (90 voltios por 45 minutos).

Después de obtenidos las electroforesis de los tres protocolos que dieron mejores resultados, se realizó una nueva extracción utilizando el procedimiento para eliminar DNA genómico (DNAsas). Se adicionaron a un vial libre de RNAsas 1 µg de RNA, 1 µL de 10X reaction buffer con MgCl₂, 1 µL de DNAsas y 1 µL de Agua tratada con DEPC. Se incubó el vial que contiene el RNA a 37°C durante 30 minutos. Luego de transcurridos los 30 min se adicionó al vial 1 µL de EDTA 50mM y se incubó a 65°C durante 10 minutos, se cuantificó el RNA y finalmente se realizó una nueva electroforesis.

5. RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados de los veintiséis métodos de extracción de RNA de sangre periférica, evaluados en términos de la cantidad y calidad del RNA total aislado, incluyendo el rendimiento, pureza e integridad del RNA.

En primer lugar, se determinaron los rendimientos promedio del RNA total extraído de las muestras, utilizando los 26 protocolos definidos. A continuación, se midió la calidad, la cual fue una medida indirecta de la presencia de contaminantes proteicos, fenol, sales, entre otros, que se estableció por espectrofotometría, mediante la medición de las proporciones de A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} . Se ha establecido previamente que las muestras de RNA con una relación A_{260}/A_{280} en el intervalo de 1,8 – 2,0 y una relación A_{260}/A_{230} mayor que 2 se identifican como de alta pureza.

Por último se evaluó la integridad, de los tres protocolos que arrojaron mejores resultados en términos de calidad, a partir de geles denaturantes de agarosa 1% con formaldehído, observando las bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S; posteriormente se determinó el mejor protocolo de extracción y se realizó nuevamente el procedimiento añadiendo al protocolo una digestión con DNAsas, con el propósito de asegurar que la muestra se encuentre libre de contaminación con DNA, el cual puede alterar los resultados de procedimientos posteriores

5.1 SEPARACIÓN POR GRADIENTES DE DENSIDAD, FICOLL – HYPAQUE

Inicialmente se realizaron extracciones de RNA a partir de CMSP obtenidas de muestras de sangre total, separadas mediante centrifugación en gradientes de densidad y utilizando el reactivo Trisure para la obtención de RNA. El procedimiento se llevó a cabo siguiendo el protocolo propuesto por la casa comercial (BIOLINE), y realizando la precipitación y purificación mediante el protocolo tradicional (Protocolo 1). Se puede observar (Tabla 2) valores que se encuentran por debajo de los rangos

establecidos para muestras de RNA de alta pureza (**Rendimiento:** $117,95 \pm 23,07$; **A260/280:** $1,59 \pm 0,07$; **A260/230:** $0,25 \pm 0,07$).

Tabla 2. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 1.

Muestra	Concentración [ng/μL]	A260/280	A260/230
1-1	103,8	1,65	0,22
1-2	98,7	1,55	0,16
1-3	123,2	1,62	0,33
1-4	137,0	1,68	0,34
1-5	167,7	1,63	0,25
1-6	135,4	1,49	0,17
1-7	96,5	1,52	0,35
1-8	102,3	1,50	0,18
1-9	99,6	1,63	0,27
1-10	115,3	1,66	0,20
Promedios	117,95 ± 23,07	1,59 ± 0,07	0,25 ± 0,07

Debido a que los resultados obtenidos con el protocolo 1 no fueron adecuados, se realizó una nueva extracción, modificando el protocolo del Trisure, aumentando los tiempos de incubación y realizando el procedimiento a bajas temperaturas. La precipitación y purificación se realizó mediante el protocolo tradicional (Protocolo 2). Se puede observar (Tabla 3) que los valores de los rangos establecidos para muestras de RNA de alta pureza mejoraron, sin embargo aún no son aceptables para procedimientos posteriores (**Rendimiento:** $203,41 \pm 40,75$; **A260/280:** $1,69 \pm 0,09$; **A260/230:** $0,58 \pm 0,09$).

Tabla 3. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 2.

Muestra	Concentración [ng/μL]	A260/280	A260/230
2-1	146,2	1,79	0,65
2-2	248,2	1,80	0,51
2-3	197,5	1,61	0,46
2-4	237,3	1,70	0,49
2-5	249,4	1,77	0,62
2-6	187,3	1,64	0,65
2-7	239,7	1,75	0,47
2-8	145,3	1,60	0,63
2-9	167,8	1,56	0,70
2-10	215,4	1,69	0,67
Promedios	203,41 \pm 40,75	1,69 \pm 0,09	0,58 \pm 0,09

Posteriormente se modificó el procedimiento de precipitación y purificación tradicional (aumentando tiempo de incubación, incubación a bajas temperaturas y realizando dos lavados con etanol) y se realizaron dos extracciones aplicando dicha modificación. Para estas extracciones se separaron CMSP por gradientes de densidad y se utilizó el reactivo Trisure, siguiendo el protocolo tradicional (protocolo 3) y el protocolo modificado para el uso del mismo (protocolo 4). Con el protocolo 3 (Tabla 4) mejoraron los valores de A260/230, sin embargo aún no se encuentran en el rango aceptado. (**Rendimiento:** 181,54 \pm 21,15; **A260/280:** 1,68 \pm 0,03; **A260/230:** 0,88 \pm 0,06). Por otra parte, el RNA obtenido al utilizar el protocolo 4 (Tabla 5) muestra mejores resultados. Los valores de A260/280, A260/230 para dicho protocolo se encuentran entre los rangos establecidos para muestras de RNA

de alta pureza (**Rendimiento:** $281,01 \pm 43,97$; **A260/280:** $1,92 \pm 0,07$; **A260/230:** $2,00 \pm 0,05$). Este tipo de RNA sería adecuado para posteriores procedimientos.

Tabla 4. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 3.

Muestra	Concentración [ng/μL]	A260/280	A260/230
3-1	193,3	1,67	0,85
3-2	178,4	1,65	0,83
3-3	177,5	1,72	0,90
3-4	167,7	1,70	0,96
3-5	189,4	1,66	0,86
3-6	205,3	1,73	0,92
3-7	134,5	1,69	0,84
3-8	197,3	1,68	0,93
3-9	169,5	1,70	0,95
3-10	202,5	1,63	0,79
Promedios	181,54 ± 21,15	1,68 ± 0,03	0,88 ± 0,06

Tabla 5. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 4.

Muestra	Concentración [ng/μL]	A260/280	A260/230
4-1	214,2	2,00	1,93
4-2	319,9	1,96	2,00
4-3	226,5	1,98	2,01
4-4	306,7	1,89	1,99

Continuación Tabla 5.

4-5	315,9	1,86	2,05
4-6	229,0	1,93	1,98
4-7	267,5	1,80	2,01
4-8	335,2	1,84	1,94
4-9	307,6	1,99	2,10
4-10	287,6	1,93	1,98
Promedios	281,01 ± 43,97	1,92 ± 0,07	2,00 ± 0,05

Con el objetivo de aumentar la cantidad de RNA obtenido, se realizaron dos extracciones más, separando las CMSP por gradientes de densidad, utilizando los protocolos tradicional (protocolo 5) y modificado (protocolo 6) para el uso del reactivo Trisure y utilizando para la precipitación y purificación columnas genéricas de sílice. Si bien los dos protocolos mejoran el rendimiento y los valores de A260/280 y A260/230, el aumento más significativo se observa en la relación A260/230, lo cual indica que el método de columna es más eficiente en la eliminación de contaminantes que puedan estar presentes en la fase acuosa que se obtiene como resultado del proceso de extracción. Así mismo, se logró evidenciar que al seguir el procedimiento recomendado por la casa comercial para la extracción con Trisure los valores de A260/280 y A260/230 (**Rendimiento:** 220,7 ± 14,52; **A260/280:** 1,72 ± 0,02; **A260/230:** 1,25 ± 0,09) son menores que cuando se realiza la extracción con el procedimiento modificado para Trisure (**Rendimiento:** 312,26 ± 17,51; **A260/280:** 1,83 ± 0,03; **A260/230:** 2,00 ± 0,03).

Tabla 6. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 5.

Muestra	Concentración [ng/μL]	A260/280	A260/230
5-1	224,3	1,72	1,15
5-2	198,7	1,70	1,23
5-3	235,7	1,76	1,18
5-4	214,8	1,71	1,32
5-5	230,0	1,72	1,36
Promedios	220,7 \pm 14,52	1,72 \pm 0,02	1,25 \pm 0,09

Tabla 7. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 6.

Muestra	Concentración [ng/μL]	A260/280	A260/230
6-1	320,41	1,82	2,00
6-2	317,39	1,85	2,02
6-3	298,76	1,81	1,98
6-4	334,17	1,88	2,05
6-5	290,56	1,80	1,97
Promedios	312,26 \pm 17,51	1,83 \pm 0,03	2,00 \pm 0,03

Al comparar todos los resultados obtenidos para los protocolos que utilizan el método de separación de glóbulos blancos por gradientes de densidad de FICOLL – HYPAQUE, se puede determinar que los protocolos que arrojaron mejores resultados fueron los protocolos 4 y 6.

5.2 TAMPÓN DE LISIS

Se realizaron extracciones de RNA, utilizando como método de separación de los glóbulos blancos de a partir de sangre total lisis de glóbulos los rojos, con una solución tampón hiperosmolar (buffer de lisis). Para este protocolo se utilizó el procedimiento modificado del reactivo Trisure y se realizó la precipitación y purificación del RNA mediante la metodología tradicional modificada (protocolo 7) o con columnas genéricas de sílice (protocolo 8). En general, la calidad del RNA obtenido mediante estos dos protocolos de extracción no es buena; los rendimientos son bajos y los valores que determinan la pureza del RNA obtenidos se encuentran por debajo de los límites aceptados. Sin embargo, el protocolo 8 muestra mejores resultados (**Rendimiento:** $135,44 \pm 15,29$; **A260/280:** $1,53 \pm 0,07$; **A260/230:** $0,83 \pm 0,06$) que el protocolo 7 (**Rendimiento:** $69,10 \pm 12,17$; **A260/280:** $1,30 \pm 0,07$; **A260/230:** $0,40 \pm 0,14$), corroborando lo observado en los protocolos 5 y 6, que el uso de columnas como metodología de precipitación y purificación mejora, no solo, los rendimientos de la muestra, sino también los valores de A260/280 y A260/230.

Tabla 8. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 7.

Muestra	Concentración [ng/ μ L]	A260/280	A260/230
7-1	62,7	1,20	0,36
7-2	99,6	1,32	0,25
7-3	64,8	1,28	0,32
7-4	54,6	1,37	0,59
7-5	61,1	1,19	0,30
7-6	62,9	1,38	0,65

Continuación Tabla 8.

7-7	73,8	1,37	0,22
7-8	69,3	1,22	0,39
7-9	71,4	1,30	0,35
7-10	70,8	1,36	0,50
Promedios	69,10 ± 12,17	1,30 ± 0,07	0,40 ± 0,14

Tabla 9. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 8.

Muestra	Concentración [ng/μL]	A260/280	A260/230
8-1	132,3	1,53	0,85
8-2	118,9	1,44	0,87
8-3	145,7	1,59	0,79
8-4	156,0	1,61	0,90
8-5	124,3	1,48	0,76
Promedios	135,44 ± 15,29	1,53 ± 0,07	0,83 ± 0,06

La mala calidad de los resultados obtenidos con el buffer de lisis se pueden atribuir presumiblemente a un límite muy estrecho entre las condiciones requeridas para la lisis de glóbulos rojos y el menor daño posible para las células nucleadas (glóbulos blancos). Es probable que mediante este procedimiento se lisaran también los glóbulos blancos. Otra razón que puede explicar los resultados es la lisis incompleta de glóbulos rojos, lo cual implica que el proceso de extracción se realizó en presencia de una gran cantidad de hemoglobina proveniente de los glóbulos rojos, lo cual, se sabe, no permite la obtención de un RNA de buena calidad.

5.3 SANGRE TOTAL

Uno de los principales objetivos de este trabajo de grado era disminuir los pasos y el tiempo requerido para el proceso de extracción de RNA, así como la cantidad de sangre utilizada. Por esta razón se optimizó el uso del reactivo TRIzol LS como metodología de extracción, ya que este no requiere hacer un tratamiento previo a muestras líquidas (en este caso sangre total diluida en PBS 1X y SSE) y la cantidad de muestra a utilizar es mínima (125 μ l de sangre). Inicialmente se siguió el procedimiento recomendado por la casa comercial (Invitrogen), utilizando la metodología tradicional, diluyendo sangre con PBS 1X (protocolo 9) o con SSE protocolo 10) y la metodología tradicional modificada y sangre diluida con PBS 1X (protocolo 11), o con SSE (protocolo 12) para la precipitación y purificación del RNA obtenido.

Al comparar los resultados obtenidos con la metodología tradicional para la precipitación y purificación con los obtenidos al utilizar la metodología modificada, podemos observar, que a diferencia con los resultados obtenidos cuando se realizó separación de glóbulos blancos por gradiente de densidad y el reactivo Trisure, la metodología de purificación y precipitación tradicional presenta mejores resultados que cuando se utiliza el protocolo modificado. (Tabla 10. **Protocolo 9: Rendimiento:** $351,74 \pm 29,85$; **A260/280:** $1,62 \pm 0,04$; **A260/230:** $0,52 \pm 0,05$; Tabla 11. **Protocolo 10: Rendimiento:** $373,22 \pm 32,55$; **A260/280:** $1,63 \pm 0,06$; **A260/230:** $0,52 \pm 0,05$). Aunque un segundo lavado con etanol en el procedimiento con TRIzol LS mejora la relación A260/230, disminuye significativamente el rendimiento y la relación A260/280 (Tabla 12. **Protocolo 11: Rendimiento:** $52,66 \pm 15,13$; **A260/280:** $1,59 \pm 0,06$; **A260/230:** $1,15 \pm 0,14$; Tabla 13. **Protocolo 12: Rendimiento:** $53,41 \pm 14,53$; **A260/280:** $1,56 \pm 0,07$; **A260/230:** $1,28 \pm 0,09$). Por otra parte los rendimientos obtenidos con los protocolos 9 y 10 son mayores que los obtenidos con los protocolos 1 – 4 (protocolos que realizan tratamiento previo a las muestras mediante separación de glóbulos blancos).

Tabla 10. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 9.

Muestra	Concentración [ng/μL]	A260/280	A260/230
9-1	334,4	1,69	0,50
9-2	358,3	1,63	0,54
9-3	404,8	1,59	0,62
9-4	335,4	1,64	0,50
9-5	330,4	1,65	0,47
9-6	357,5	1,58	0,52
9-7	324,5	1,57	0,47
9-8	316,2	1,60	0,53
9-9	358,9	1,64	0,48
9-10	397,0	1,62	0,60
Promedios	351,74 \pm 29,85	1,62 \pm 0,04	0,52 \pm 0,05

Tabla 11. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 10.

Muestra	Concentración [ng/μL]	A260/280	A260/230
10-1	336,4	1,66	0,50
10-2	437,0	1,70	0,69
10-3	375,6	1,68	0,40
10-4	350,2	1,52	0,33
10-5	353,5	1,67	0,56
10-6	347,5	1,58	0,49
10-7	364,7	1,68	0,58

Continuación Tabla 11.

10-8	356,5	1,57	0,49
10-9	398,3	1,63	0,57
10-10	412,5	1,61	0,55
Promedios	373,22 ± 32,55	1,63 ± 0,06	0,516 ± 0,10

Tabla 12. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 11.

Muestra	Concentración [ng/μL]	A260/280	A260/230
11-1	70,0	1,68	1,20
11-2	62,0	1,58	1,34
11-3	30,1	1,66	1,15
11-4	55,4	1,53	1,10
11-5	67,0	1,57	1,06
11-6	45,6	1,60	1,14
11-7	73,6	1,64	1,43
11-8	37,9	1,58	1,03
11-9	46,9	1,49	0,98
11-10	38,1	1,56	1,11
Promedios	52,66 ± 15,13	1,59 ± 0,06	1,15 ± 0,14

Tabla 13. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 12.

Muestra	Concentración [ng/μL]	A260/280	A260/230
12-1	73,3	1,64	1,42
12-2	30,9	1,67	1,34
12-3	44,2	1,63	1,35
12-4	39,8	1,50	1,20
12-5	45,9	1,58	1,17
12-6	55,9	1,55	1,28
12-7	70,1	1,60	1,33
12-8	68,3	1,51	1,35
12-9	61,9	1,47	1,13
12-10	43,8	1,49	1,27
Promedios	53,41 \pm 14,53	1,56 \pm 0,07	1,28 \pm 0,09

Debido a que los valores de A260/280 no son óptimos, se realizaron extracciones probando para el reactivo TRIzol LS, las condiciones con las que se obtuvieron los mejores resultados con el Trisure, debido a que los componentes básicos y los protocolos de los dos reactivos son similares. Las extracciones se realizaron disolviendo la sangre en PBS 1X y SSE, y utilizando el procedimiento tradicional y el tradicional modificado como métodos de precipitación y purificación.

Con estos procedimientos se observó que los valores de rendimiento y A260/230 tienen un comportamiento similar al que mostraron en los cuatro protocolos anteriores, es decir, que al realizar dos lavados se mejora la relación A260/230, pero disminuye el rendimiento. Sin embargo la relación A260/280 mejora al utilizar el protocolo de TRIzol LS modificado.

A continuación se describen los resultados obtenidos para los protocolos que utilizan el procedimiento modificado para el reactivo TRIzol LS. **Protocolo 13** (Tabla 14): (Sangre diluida en PBS 1X y protocolo tradicional como método de precipitación y purificación) **Rendimiento:** $442,89 \pm 24,30$; **A260/280:** $1,87 \pm 0,05$; **A260/230:** $0,83 \pm 0,06$. **Protocolo 14** (Tabla 15): (Sangre diluida en SSE y protocolo tradicional como método de precipitación y purificación) **Rendimiento:** $447,42 \pm 35,72$; **A260/280:** $1,89 \pm 0,06$; **A260/230:** $0,86 \pm 0,07$. **Protocolo 15** (Tabla 16): (Sangre diluida en PBS 1X y protocolo tradicional modificado como método de precipitación y purificación) **Rendimiento:** $57,36 \pm 15,05$; **A260/280:** $1,60 \pm 0,09$; **A260/230:** $1,53 \pm 0,12$. **Protocolo 16** (Tabla 17): (Sangre diluida en SSE y protocolo tradicional modificado como método de precipitación y purificación) **Rendimiento:** $61,09 \pm 15,16$; **A260/280:** $1,59 \pm 0,08$; **A260/230:** $1,57 \pm 0,11$.

Tabla 14. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 13.

Muestra	Concentración [ng/ μ L]	A260/280	A260/230
13-1	436,0	1,95	0,76
13-2	444,2	1,93	0,85
13-3	417,5	1,88	0,89
13-4	465,4	1,80	0,79
13-5	440,4	1,86	0,85
13-6	427,5	1,83	0,80
13-7	479,8	1,90	0,93
13-8	399,0	1,81	0,75
13-9	463,1	1,87	0,83
13-10	456,0	1,85	0,88
Promedios	442,89 \pm 24,30	1,87 \pm 0,05	0,83 \pm 0,06

Tabla 15. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 14.

Muestra	Concentración [ng/μL]	A260/280	A260/230
14-1	455,4	1,95	0,84
14-2	442,4	1,95	0,81
14-3	464,5	1,86	0,88
14-4	482,1	1,98	0,95
14-5	466,6	1,87	0,89
14-6	396,5	1,81	0,87
14-7	427,6	1,86	0,79
14-8	455,9	1,90	0,85
14-9	498,2	1,93	0,98
14-10	385,0	1,84	0,74
Promedios	447,42 \pm 35,72	1,89 \pm 0,06	0,86 \pm 0,07

Tabla 16. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 15.

Muestra	Concentración [ng/μL]	A260/280	A260/230
15-1	43,3	1,54	1,47
15-2	60,4	1,69	1,50
15-3	74,6	1,70	1,45
15-4	49,6	1,68	1,60
15-5	75,9	1,56	1,49
15-6	35,8	1,45	1,68
15-7	60,7	1,63	1,37

Continuación Tabla 16.

15-8	78,6	1,61	1,75
15-9	45,9	1,49	1,44
15-10	48,8	1,69	1,57
Promedios	57,36 ± 15,05	1,60 ± 0,09	1,53 ± 0,12

Tabla 17. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 16.

Muestra	Concentración [ng/μL]	A260/280	A260/230
16-1	73,3	1,55	1,36
16-2	82,4	1,59	1,48
16-3	84,6	1,63	1,55
16-4	43,6	1,70	1,57
16-5	65,4	1,66	1,48
16-6	41,8	1,49	1,59
16-7	58,2	1,54	1,61
16-8	48,3	1,49	1,69
16-9	55,0	1,59	1,72
16-10	58,3	1,70	1,63
Promedios	61,09 ± 15,16	1,59 ± 0,08	1,57 ± 0,11

Posteriormente, se realizaron extracciones diluyendo la sangre en PBS 1X y SSE, utilizando los dos protocolos mencionados anteriormente para el reactivo TRIzol LS y realizando la precipitación y purificación del RNA con columnas de sílice (protocolos 17, 18, 19 y 20), con el fin de mejorar los resultados obtenidos en los protocolos anteriores.

Los resultados obtenidos para estos cuatro protocolos sigue la tendencia observada en los protocolos anteriores para los cuales se utilizan columnas de sílice genéricas como método de precipitación y purificación. Los rendimientos aumentan considerablemente, así como los valores de las relaciones A260/280 y A260/230. Sin embargo, que dichos valores sean óptimos para futuras investigaciones depende, en gran manera, de los procedimientos utilizados en la preparación de la muestra y la extracción.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para los protocolos 17 – 20. **Protocolo 17** (Tabla 18): (Sangre diluida con PBS 1X y protocolo tradicional para TRIzol LS) **Rendimiento:** $533,16 \pm 39,46$; **A260/280:** $1,72 \pm 0,03$; **A260/230:** $1,56 \pm 0,04$. **Protocolo 18** (Tabla 19): (Sangre diluida con SSE y protocolo tradicional para TRIzol LS) **Rendimiento:** $524,74 \pm 33,03$; **A260/280:** $1,72 \pm 0,03$; **A260/230:** $1,54 \pm 0,05$. **Protocolo 19** (Tabla 20): (Sangre diluida con PBS 1X y protocolo modificado para TRIzol LS) **Rendimiento:** $546,88 \pm 20,14$; **A260/280:** $1,81 \pm 0,02$; **A260/230:** $2,00 \pm 0,03$. **Protocolo 20** (Tabla 21): (Sangre diluida con SSE y protocolo modificado para TRIzol LS) **Rendimiento:** $555,28 \pm 15,97$; **A260/280:** $1,82 \pm 0,04$; **A260/230:** $2,00 \pm 0,03$.

Tabla 18. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 17.

Muestra	Concentración [ng/ μ L]	A260/280	A260/230
17-1	495,3	1,70	1,53
17-2	554,7	1,72	1,51
17-3	498,7	1,69	1,57
17-4	589,0	1,76	1,60
17-5	528,1	1,74	1,58
Promedios	533,16 \pm 39,46	1,72 \pm 0,03	1,56 \pm 0,04

Tabla 19. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 18.

Muestra	Concentración [ng/μL]	A260/280	A260/230
18-1	547,3	1,75	1,54
18-2	487,9	1,68	1,49
18-3	567,0	1,73	1,56
18-4	498,1	1,70	1,49
18-5	523,4	1,74	1,60
Promedios	524,74 ± 33,03	1,72 ± 0,03	1,54 ± 0,05

Tabla 20. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 19.

Muestra	Concentración [ng/μL]	A260/280	A260/230
19-1	569,0	1,83	2,00
19-2	545,3	1,80	1,98
19-3	521,7	1,79	1,95
19-4	564,8	1,84	1,99
19-5	533,6	1,80	2,02
Promedios	546,88 ± 20,14	1,81 ± 0,02	2,00 ± 0,03

Tabla 21. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 20.

Muestra	Concentración [ng/μL]	A260/280	A260/230
20-1	557,0	1,84	2,03
20-2	578,3	1,80	2,00
20-3	541,5	1,78	1,98
20-4	538,9	1,85	1,96
20-5	560,7	1,87	2,01
Promedios	555,28 \pm 15,97	1,82 \pm 0,04	2,00 \pm 0,03

Se puede observar que el uso de PBS 1X o SSE como disolvente para la sangre no afecta de manera significativa el procedimiento, y que los resultados son similares para los dos disolventes, la decisión de cual utilizar dependerá de la facilidad del investigador de obtener uno de los dos disolventes. Los métodos 19 y 20 son los que presentan mejores resultados en términos de rendimiento, A 260/280 y A260/230. Por otra parte, se pueden considerar como los métodos más eficientes, ya que utilizan una pequeña cantidad de sangre y el tiempo total de extracción es mucho menor que el empleado cuando es necesario un tratamiento previo a la muestra.

5.4 PROTEINASA K

Finalmente se realizaron extracciones utilizando proteinasa k, siguiendo tres procedimientos diferentes.

Para el primer y segundo procedimiento se realiza una separación previa de glóbulos blancos mediante gradiente de densidad y el pellet obtenido es tratado con proteinasa k. En caso del primer procedimiento se realiza una centrifugación y

posterior a esto se extrae el RNA utilizando el protocolo modificado para Trisure, finalizando con una precipitación y purificación mediante el protocolo tradicional modificado (protocolo 21) y columnas genéricas de sílice (protocolo 22).

Por otra parte, para el segundo procedimiento, luego del tratamiento del pellet con proteinasa K, se procede a realizar la extracción con TRIzol LS utilizando el protocolo modificado, y una precipitación y purificación con el protocolo tradicional (protocolo 23) y con columnas genéricas de sílice (protocolo 24).

El tercer y último procedimiento consta de un tratamiento directo de la sangre total con la proteinasa k, seguido de una extracción con TRIzol LS, utilizando el protocolo modificado, y una precipitación y purificación con el protocolo tradicional (protocolo 25) y con columnas genéricas de sílice (protocolo 26).

Los resultados obtenidos para los protocolos con proteinasa K son similares en rendimiento y A260/280, sin embargo la relación A260/230 varía, dependiendo de la metodología de precipitación y purificación, obteniendo mejores resultados con los protocolos que utilizan columnas genéricas de sílice.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para los protocolos 21 – 26. **Protocolo 21** (Tabla 22): **Rendimiento:** 416,79 ± 44,55; **A260/280:** 1,76 ± 0,02; **A260/230:** 0,71 ± 0,06. **Protocolo 22** (Tabla 23): **Rendimiento:** 505,62 ± 20,47; **A260/280:** 1,81 ± 0,03; **A260/230:** 1,89 ± 0,03. **Protocolo 23** (Tabla 24): **Rendimiento:** 438,49 ± 31,88; **A260/280:** 1,76 ± 0,03; **A260/230:** 0,68 ± 0,04. **Protocolo 24** (Tabla 25): **Rendimiento:** 512,30 ± 24,13; **A260/280:** 1,86 ± 0,02; **A260/230:** 1,96 ± 0,04. **Protocolo 25** (Tabla 26): **Rendimiento:** 437,79 ± 35,80; **A260/280:** 1,78 ± 0,04; **A260/230:** 0,77 ± 0,07. **Protocolo 26** (Tabla 27): **Rendimiento:** 599,20 ± 38,15; **A260/280:** 1,88 ± 0,03; **A260/230:** 2,01 ± 0,05.

Tabla 22. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 21.

Muestra	Concentración [ng/μL]	A260/280	A260/230
21-1	428,5	1,78	0,74
21-2	390,5	1,75	0,63
21-3	433,0	1,80	0,78
21-4	387,6	1,78	0,63
21-5	326,7	1,76	0,70
21-6	410,6	1,73	0,66
21-7	479,9	1,77	0,81
21-8	442,0	1,74	0,74
21-9	399,1	1,78	0,69
21-10	470,0	1,75	0,70
Promedios	416,79 \pm 44,55	1,76 \pm 0,02	0,71 \pm 0,06

Tabla 23. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 22.

Muestra	Concentración [ng/μL]	A260/280	A260/230
22-1	534,6	1,83	1,87
22-2	498,1	1,79	1,89
22-3	510,9	1,85	1,93
22-4	506,3	1,77	1,86
22-5	478,2	1,80	1,92
Promedios	505, 62 \pm 20,47	1,81 \pm 0,03	1,89 \pm 0,03

Tabla 24. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 23.

Muestra	Concentración [ng/μL]	A260/280	A260/230
23-1	414,9	1,73	0,62
23-2	459,7	1,75	0,70
23-3	418,7	1,73	0,63
23-4	465,3	1,77	0,72
23-5	475,9	1,79	0,66
23-6	442,0	1,76	0,73
23-7	398,9	1,72	0,69
23-8	402,7	1,80	0,70
23-9	487,5	1,74	0,65
23-10	419,3	1,81	0,67
Promedios	438,49 \pm 31,88	1,76 \pm 0,03	0,68 \pm 0,04

Tabla 25. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 24.

Muestra	Concentración [ng/μL]	A260/280	A260/230
24-1	547,2	1,87	1,98
24-2	489,3	1,86	1,96
24-3	496,6	1,88	1,89
24-4	527,0	1,88	2,01
24-5	501,4	1,83	1,97
Promedios	512,30 \pm 24,13	1,86 \pm 0,02	1,96 \pm 0,04

Tabla 26. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 25.

Muestra	Concentración [ng/μL]	A260/280	A260/230
25-1	380,4	1,75	0,78
25-2	408,6	1,78	0,74
25-3	441,3	1,79	0,78
25-4	492,1	1,74	0,89
25-5	417,8	1,77	0,73
25-6	417,3	1,77	0,72
25-7	443,2	1,72	0,68
25-8	445,8	1,77	0,72
25-9	497,0	1,85	0,90
25-10	434,4	1,82	0,79
Promedios	437,79 \pm 35,80	1,78 \pm 0,04	0,77 \pm 0,07

Tabla 27. Resultados obtenidos con el protocolo de extracción 26.

Muestra	Concentración [ng/μL]	A260/280	A260/230
26-1	645,3	1,87	1,98
26-2	599,8	1,89	2,01
26-3	580,1	1,84	2,10
26-4	623,8	1,91	1,96
26-5	547,0	1,87	2,00
Promedios	599,20 \pm 38,15	1,88 \pm 0,03	2,01 \pm 0,05

5.5 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Se compararon los resultados de los protocolos que muestran valores de A260/280 y A260/230 dentro de los rangos establecidos para muestras de RNA de alta calidad y se escogieron los protocolos 4, 20 y 26 (considerando el rendimiento, calidad y tiempo del proceso de extracción), para realizarles una digestión del DNA, que pudo haber quedado presente después de la extracción, utilizando DNAsas. Previo y posterior a dicha digestión se realizaron electroforesis con el fin de corroborar la presencia y la calidad del RNA en las muestras obtenidas.

Tabla 28. Protocolos de extracción de RNA que mostraron mejores resultados

Protocolo	Concentración [ng/μL]	A260/280	A260/230
4	281,01 ± 43,97	1,92 ± 0,07	2,00 ± 0,05
6	312,26 ± 17,51	1,83 ± 0,03	2,00 ± 0,03
19	546,88 ± 20,14	1,81 ± 0,02	2,00 ± 0,03
20	555,28 ± 15,97	1,82 ± 0,04	2,00 ± 0,03
22	505,62 ± 20,47	1,81 ± 0,03	1,89 ± 0,03
24	512,30 ± 24,13	1,86 ± 0,02	1,96 ± 0,04
26	599,20 ± 38,15	1,88 ± 0,03	2,01 ± 0,05

Se puede observar que al realizar el procedimiento de DNAsas, mejora la electroforesis (se definen más las bandas de los diferentes tipos de RNA que se logran visualizar), es decir que mejora la calidad del RNA obtenido.

Figura 14. Electroforesis de RNA obtenido mediante los protocolos 4,20 y 26 antes de digestión con DNAsas

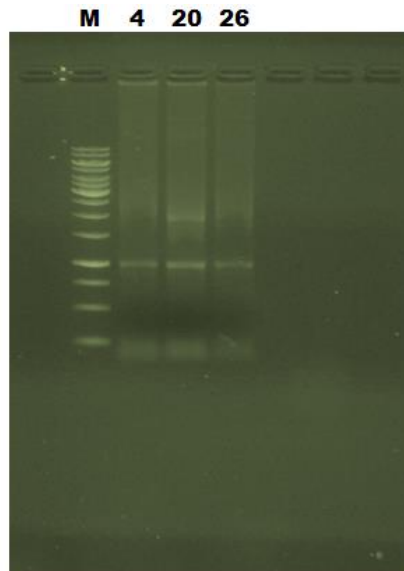
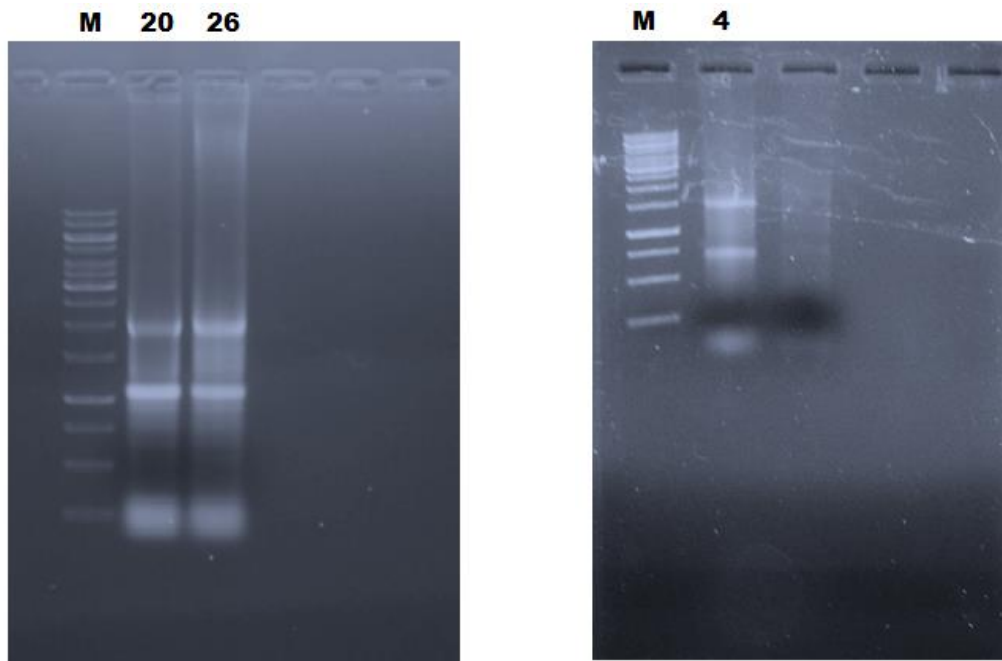


Figura 15. Electroforesis de RNA obtenido mediante los protocolos 4,20 y 26 despues de digestión con DNAsas



6. CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluaron y optimizaron diferentes condiciones y procedimientos de los pasos requeridos para llevar a cabo la extracción de RNA (preparación de la muestra, extracción y precipitación) a partir de muestras de sangre periférica, utilizando los principios básicos del método clásico, de un solo paso, propuesto por Chomczynski y Sacchi, optimizados en tiempo e procesamiento y calidad, lo cual permite su implementación, utilizando reactivos y materiales genéricos, a bajo costo.

La técnica de separación de glóbulos blancos mediante gradiente de densidad complementada con una extracción de RNA utilizando un protocolo optimizado para el reactivo Trisure, permite obtener RNA de buena calidad. Sin embargo, este procedimiento requiere un reactivo comercial costoso, pasos sensibles de centrifugación, una cantidad grande de muestra de sangre y el tiempo total del procedimiento es relativamente largo.

Se obtuvo RNA de buena calidad y con alto rendimiento mediante la implementación de TRIZOL LS para la extracción de RNA, partiendo de pequeñas cantidades de sangre total, la cual puede tener, o no, un tratamiento previo. Este reactivo está propuesto por la casa comercial para la precipitación de RNA de muestras líquidas, tales como el plasma sanguíneo, sin embargo, con la combinación de los protocolos alternativos tiene un muy buen funcionamiento con pequeñas muestras de sangre total. Esto reduce notoriamente la cantidad de la muestra, así como los costos de la utilización del reactivo Ficoll, y reduce los tiempos de procesamiento.

La implementación de columnas de sílice genéricas como metodología de precipitación y purificación, mejora la cantidad y calidad del RNA obtenido y reduce los tiempos de precipitación. Esta es una alternativa que puede ser introducida a cualquier procedimiento de extracción y la obtención de columnas de sílice genéricas es relativamente asequible y de bajo costo.

Mediante la técnica de preparación de la muestra con una solución de proteinasa K, seguida de una extracción con los protocolos modificados para Trisure o TRIzol LS y una precipitación y purificación con columnas genéricas de sílice, se obtuvo RNA que tiene valores de las relaciones A 260/280 y A 260/230 dentro del rango establecido para muestras de alta pureza. Estas técnicas reducen la cantidad de la muestra y el costo aunque el tiempo de digestión con proteinasa K es relativamente prolongado (1h).

En este trabajo se diseñaron tres metodologías de extracción de RNA, combinando las mejoras realizadas en las diferentes etapas del proceso de extracción, mediante las cuales se obtuvieron cantidades altas de RNA de buena calidad. A partir de estos resultados sería posible la implementación de un protocolo optimizado con la utilización de los reactivos clásicos de la técnica básica, tiocianato de guanidina, cloroformo y fenol.

Se encontró que el protocolo más eficiente para la extracción de RNA de buena calidad, debido a la pequeña cantidad de sangre utilizada y el tiempo que dura el proceso de extracción, es aquel que emplea una metodología optimizada para el reactivo TRIzol LS, seguido de una precipitación y purificación con columnas de sílice, partiendo de sangre total diluida con PBS 1X o SSE.

7. RECOMENDACIONES

Es recomendable para los diferentes laboratorios implementar los pasos mejorados realizados en este trabajo en las diferentes etapas de extracción cuando se requiera la extracción de RNA de muestras de sangre total. Cada uno de los pasos mejorados puede ser utilizado para su combinación con los otros pasos dependiendo de los recursos que posea cada laboratorio.

La implementación de los procedimientos que utilizan 150 μ l de sangre total y la precipitación y purificación con columnas de sílice genéricas, permite la manipulación de grandes números de muestras y la automatización. Las columnas genéricas pueden obtenerse de casas comerciales a bajo costo, pueden ser excedentes de estuches comerciales de extracción de DNA plasmídico o purificación, e incluso con algunos procedimientos pueden ser reutilizables.

Los mejores métodos establecidos pueden evaluarse con diversos tipos de muestras (p. e., tejidos animal y vegetal) con el fin de desarrollar una metodología funcional para cada una de ellas.

Se propone para un próximo trabajo utilizar los resultados encontrados para diseñar un reactivo monofásico, basados en las mejores combinaciones de los componentes de los reactivos comerciales, que sea económico y de fácil acceso para la comunidad científica de nuestra región.

BIBLIOGRAFÍA

BATEY, R. T.; RAMBO, R. P.; DOUDNA, J. A. Tertiary motifs in RNA structure and folding, 1999, vol. 38, issue, 16, p. 2326–2343

BERGALLO, M. et al., Comparison of Two Available RNA Extraction Protocols for microRNA Amplification in Serum Samples, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2015, vol. 30, p. 277–283, doi: 10.1002/jcla.21848

BHAGAVAN, N. V. & Ha, C.-E. Structure and Properties of DNA. En: *Essentials of Medical Biochemistry with Clinical Cases Modifications*. 2011, p. 275-286. doi:10.1016/B978-0-12-095461-2.00021-7

BIOLINE, Protocol for the Isolation of RNA using TRIsure, 2000, catalog numbers BIO-38032, vol. 3, p. 60–61

BURNETT, John C.; ROSSI, John J. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chemistry & biology*, 2012, vol. 19, no 1, p. 60-71.

CHIRGWIN, John M., et al. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 1979, vol. 18, no 24, p. 5294-5299.

CHOI, Yong C.; RO-CHOI, Tae-Suk, Basic Characteristics of Different Classes of Cellular RNA's: A Directory. EN: *A Comprehensive Treatise. Gene Expression: The Production of RNAs, Cell Biology*, 1980, vol. 3, editado por David M. Prescott, p. 609-667, ISBN: 978-0-12-289503-6

CHOMCZYNSKI, Piotr; SACCHI, Nicoletta. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature protocols*, 2006, vol. 1, no 2, p. 581-585

CHOUDHURI, Supratim. Bioinformatics for Beginners: Genes, Genomes, Molecular Evolution, Databases and Analytical Tools. Elsevier, 2014, capítulo 1, vol. 17, p. 1–25. ISBN-13: 978-0124104716

COOPER, G. M., HAUSMAN, Robert. E., The Cell A Molecular Approach. Capítulo 4. Fundamentals of molecular biology, 4 ed. Washington DC. (editorial). 2007 p. 103-137

DE PAULA, Vanessa S.; VILLAR, Livia M.; COIMBRA GASPAR, Ana M. Comparison of four extraction methods to detect hepatitis A virus RNA in serum and stool samples. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2003, vol 7, no 2, p. 135–141

DESJARDINS, Philippe, CONKLIN, Deborah, NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids, Journal of Visualized Experiments and Thermo Fisher Scientific,, 2010, vol 45, p. 1–4, doi: 10.3791/2565

DUTTAGUPTA, R., et al., Genome – Wide Maps of Circulating miRNA Biomarkers for Ulcerative Colitis. PLoS ONE, 2012, vol. 7, issue 2, p. 1-13, doi:10.1371/journal.pone.0031241

FALCÓN, Luisa I.; VALERA, A., Quinta parte: Las herramientas moleculares capítulo 16: Extracción de Ácidos nucleicos, EN: EGUIARTE, Luis E.; SOUZA, Valeria; AGUIRRE, Xitlaly, Ecología Molecular, Secretaria del medio ambiente y recursos naturales, instituto nacional de ecología, universidad nacional autónoma de México, 2008, comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. Pag, 499–516

GOSS, D. J.; DOMASHEVSKIY, A. V., Messenger RNA (mRNA): The Link between DNA and Protein, EN: BRADSHAW, Ralph A.; STAHL, Philip D., Encyclopedia of cell biolog, Waltham, MA: Academic Press, 2001, vol 1, p. 341-345, doi:10.1016/B978-0-12-394447-4.10040-9 341

GRIFFITHS JONES, S., MiRBase: MicroRNA sequences and annotation, *Current Protocols in Bioinformatics*, 2010, Suplemento 29, p. 1–10, doi:10.1002/0471250953.bi1209s29

KINGSTON, Robert E.; CHOMCZYNSKI, Piotr; SACCHI, Nicoletta, Guanidine Methods for Total RNA, *Current Protocols in Molecular Biology*, 1996, suplemento 36, p. 1-9

LEHMAN, Niles. RNA in evolution. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2010, vol. 1, no 2, p. 202-213.

LIFE TECHNOLOGIES, TRIzol ® Reagent, 2012, Catalogo numbers 15596-018, p. 18-21.

LIFE TECHNOLOGIES, PureLink miRNA Isolation Kit, 2005, Catalogo numbers k1570-1, revisión 2.0, p. 1-19.

LIFE TECHNOLOGIES, TRIzol ® LS Reagent, 2012, Catalogo numbers 10296-028, p. 3-6

LIU, Xiaopan, et al. Comparison of Six Different Pretreatment Methods for Blood RNA Extraction. *Biopreservation and biobanking*, 2015, vol. 13, no 1, p. 56-60.

LILJAS, A., Messenger RNA (mRNA). *Encyclopedia of Genetics*, 2001, p. 1184–1185, doi:10.1006/rwgn.2001.0821

LILJAS, A., Ribosomal RNA, EN: LAFONTAINE, D. L. J.; TOLLERVEY, D., *Encyclopedia of Life Sciences*, 2001, p. 1719-1723, doi:10.1038/npg.els.0003832

LILJAS, A., Transfer RNA (tRNA), *Encyclopedia of Genetics*, 2001, p. 1986–1989, doi:10.1006/rwgn.2001.1302

MACHEREY-NAGEL. RNA isolation User manual, 2014, revisión 16, p. 1-79,

MARTINS, R.; QUEIROZ, J. A.; SOUSA, F. Ribonucleic acid purification. *Journal of Chromatography A*, 2014, vol. 1355, p. 1-14.

NELSON, David L.; COX, Michael M., LEHNINGER Principios De Bioquímica, Quinta edición, Editorial OMEGA, 2009, p. 271-302, ISBN 978-282-1486-5.

NIELSEN, Henri, Working with RNA, EN: WALKER, John M.; NIELSEN, Henri, RNA Methods an Protocols, Springer Protocols. Humana press, 2011, p. 15-29, ISBN 978-1-58829-913-0

NILSEN, Timothy W. The Fundamentals of RNA Purification. Cold Spring Harbor Protocols, 2013, vol. 8, p. 618–624, doi: 10.1101/pdb.top075838

QUIAGEN, RNeasy® Mini Handbook, cuarta edición, 2012, p. 1-80

SHARMA, Vivek; MISTELI, Tom, Non-coding RNAs in DNA damage and repair. *FEBS Letters*, 2013, vol. 587, issue 13, p. 1832–1839, doi: 10.1016/j.febslet.2013.05.006

SHARP, Phillip A. The centrality of RNA. *Cell*, 2009, vol. 136, no 4, p. 577-580

SIMIC, Damir, et al. An alternative method for high throughput RNA isolation from whole blood. *Journal of Medical Genetics and Genomics*, 2011, vol. 3, no 4, p. 74-76

THERMO SCIENTIFIC, Nucleic Acid Purity Ratios, Technical Bulletin, 1975, vol. 17, p. 8–9

WINK, M. An Introduction to Biotechnology The Science, Technology and Medical Applications Chapter 4. Genes: The Blueprints for Proteins. Elsevier Ltd., 1999. p. 65-105 doi:10.1016/B978-1-907568-28-2.00004-6

YAFFE, Hila, et al. LogSpin: a simple, economical and fast method for RNA isolation from infected or healthy plants and other eukaryotic tissues. BioMed Center research notes, 2012, vol. 5, no 45, p. 1-8

YAN, Biao; WANG, Zen-Hua; GUO, Jin-Tao, The research strategies for probing the function of long noncoding RNAs. Genomics, 2011, vol. 99, issue 2, p. 76–80, doi: 10.1016/j.ygeno.2011.12