



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**Evaluación de la estabilidad de expresión de los genes de referencia *ACTBL2*,
ACTB y *HPRT* en la línea celular McCoy ATCC CRL-1696 expuesta a
nanopartículas de plata cubiertas con doxiciclina**

Márquez Cadena, Milton Paúl

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Torres Arias, Marbel PhD

31 de agosto de 2022

Certificación Copyleaks



Paul Marquez Tesis para CopyLeaks.pdf

Scanned on: 20:29 August 31, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	36
Words with Minor Changes	4
Paraphrased Words	10
Omitted Words	0





Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: "**Evaluación de la estabilidad de expresión de los genes de referencia *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT* en la línea celular McCoy ATCC CRL-1696 expuesta a nanopartículas de plata cubiertas con doxiciclina.**" fue realizado por la señor **Márquez Cadena, Milton Paúl**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 31 de agosto de 2022



Firmado digitalmente por:

**MARBEL
TORRES**

.....
Marbel Torres Arias PhD.

C. C. 1802949154



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, **Márquez Cadena Milton Paúl**, con cédula de ciudadanía No. 1719885319, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **"Evaluación de la estabilidad de expresión de los genes de referencia *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT* en la línea celular McCoy ATCC CRL-1696 expuesta a nanopartículas de plata cubiertas con doxiciclina."** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 31 de agosto de 2022

Márquez Cadena, Milton Paúl.

C. C. 1719885319



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de publicación

Yo, **Márquez Cadena, Milton Paúl**, con cédula de ciudadanía No. 1719885319, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **“Evaluación de la estabilidad de expresión de los genes de referencia *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT* en la línea celular McCoy ATCC CRL-1696 expuesta a nanopartículas de plata cubiertas con doxiciclina.”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 31 de agosto de 2022

Márquez Cadena, Milton Paúl.

C. C. 1719885319

Dedicatoria

A mis padres, Milton y María Eugenia porque siempre me supieron ayudar y comprender todos los sacrificios que conlleva una carrera universitaria. Esta tesis va dedicada a todos sus esfuerzos que hicieron durante estos años para ayudarme a estar donde estoy hoy y que pueda culminar mi tesis. Desde ahora mis esfuerzos serán por y para ustedes.

A todos mis amigos y familia que confiaron en mí, sus palabras de aliento me ayudaron a no perder la confianza en mí mismo.

En especial, este trabajo va dedicado a ti, querido lector, mi trabajo no estaría completo sin un destinatario. Agradezco que fui lector (y seguiré siéndolo) muchas veces y gracias a ello, me nutrí de conocimientos para poder culminar mi carrera universitaria y mi trabajo de titulación.

Agradecimientos

A mis profesores de carrera que me enseñaron gran parte de lo que sé ahora e inculcarme la curiosidad científica. En especial a Francisco, Claudia y Rafael que sus conocimientos y su confianza en mí marcaron mis pasos en mi vida universitaria.

A mis padres, los cuales siempre me apoyaron a los largos de estos años y nunca me dejaron solo. Agradezco su ayuda incondicional en cualquier adversidad presentada. Su presencia en mi vida universitaria me permitió llegar al punto en el que estoy ahora.

A mi familia, Katherine, Deivis, Valentina, Katita y David por ser parte de toda mi formación académica y estar siempre pendientes de mi.

A las personas que me ayudaron durante mi tesis. Su compañía durante días y noches de experimentos dentro y fuera del laboratorio fueron muy importantes para mí: Carolina, Tatiana, Génesis, Oscar, Wendy, Belén y Nati. Sé que sin su ayuda esta tesis tendría otro sentido, mi agradecimiento eterno con ustedes.

A mis mascotas, Coco y Gary que acostados en mi regazo acompañaron mis largas noches de estudio que se volvían amaneceres.

A mis amigos, en especial, Sandra, Adrián, Lauren, Mateo, Pao, Cris, Gaby, Wendy, Anahí y Michu, por hacer de este trayecto Universitario algo inolvidable.

Al Dr. Marcelo Grijalva por abrirme las puertas para ingresar en el laboratorio, confiar en mi como profesional, instruirme y guiarme a lo largo de toda mi tesis.

A todos los que conforman el laboratorio de Inmunología y Virología de la ESPE, en especial a la Ing. Fernanda Toscano y a la Dra. Marbel Torres. Muchas gracias por ayudarme cuando más lo necesitaba y guiarme por el camino correcto.

A la Ing. Tatiana Lara por la paciencia y el tiempo que invertido en capacitarme para que tenga los conocimientos necesarios para realizar mi tesis.

Sobre todo, a mí. Por perseverar y aguantar noches sin dormir durante esta tesis.

Por tener la dedicación y motivación de hacer del laboratorio mi segundo hogar.

Por venir al laboratorio fines de semana. Manejar en altas horas de la noche, discutiendo conmigo mismo mis resultados y buscando posibles soluciones que podría usarlas al siguiente día. Por nunca dejar de confiar en que podría llegar culminar mi tesis, pese a las adversidades presentadas. Esto es un recordatorio que por más oscuro que se ponga el ambiente, mientras exista determinación, optimismo y método científico... ¡todo es posible! Pues, la ciencia es un acto de fe, en la que creo.

Paúl Márquez

Índice de Contenidos

Certificación Copyleaks	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice de Contenidos	9
Índice de Tablas	13
Índice de Figuras	14
Resumen	16
Abstract	17
Capítulo I: Introducción	18
Planteamiento del problema	18
Justificación del problema	19
Objetivos	21
Objetivo general.....	21
Objetivos específicos.....	21
Hipótesis	21
Capítulo II: Marco Teórico.....	22
Nanopartículas	22
Aplicaciones de las nanopartículas.....	22
Nanopartículas de plata	22
Nanopartículas recubiertas de fármacos.....	23

	10
Ag-NPs realizadas en la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE	23
Líneas Celulares	24
Usos y generalidades del mantenimiento.....	24
Pruebas de citotoxicidad	25
Reducción del MTT.....	25
LDH Citosólica.....	25
Ensayo de exclusión del azul de tripán	26
Por Expresión génica.....	26
Análisis de expresión génica	27
Cuantificación relativa	27
Método Livak	28
Método ΔCq usando un gen de referencia.....	28
Método Pfaffl	28
qPCR	29
Químicas de qPCR.....	29
Optimización de qPCR.....	30
Curva de amplificación.....	30
Curva de melting.....	31
Curva estándar	32
Coeficiente de determinación (R^2).....	33
Pendiente (m).....	33
Eficiencia de la reacción (E).....	34
Corrección de eficiencia.....	34

	11
Genes de referencia.....	35
Gen <i>ACTBL2</i>	35
Gen <i>ACTB</i>	36
Gen <i>HPRT</i>	36
Estabilidad genes de referencia.....	37
Capítulo III: Metodología.....	39
Participantes	39
Muestras	39
Período de tiempo de investigación.....	39
Mantenimiento de la línea celular McCoy ATCC CRL-1696	39
Extracción de RNA.....	40
Optimización de los protocolos de qPCR	40
Diseño experimental para optimizar la temperatura de annealing y concentración de primers.....	41
Ensayo de eficiencia de amplificación de los genes <i>ACTBL2</i> , <i>ACTB</i> y <i>HPRT</i>	45
Análisis de la estabilidad de los genes <i>ACTB</i> , <i>HPRT</i> y <i>ACTBL2</i>	46
Análisis de datos	47
Capítulo IV: Resultados	49
Mantenimiento de la línea celular McCoy ATCC CRL-1696	49
Extracción de RNA.....	50
Características de los primers	51
Condiciones óptimas de temperatura de annealing y concentración de primers.....	52
Ensayo de eficiencia de amplificación de los genes <i>ACTBL2</i> , <i>ACTB</i> y <i>HPRT</i>	56

Análisis de la estabilidad de los genes <i>ACTBL2</i> , <i>ACTB</i> y <i>HPRT</i>	61
Capítulo V: Discusión.....	65
Mantenimiento de la línea celular McCoy ATCC CRL-1696	65
Extracción de RNA.....	65
Características de los primers	66
Condiciones óptimas de temperatura de annealing y concentración de primers.....	67
Ensayo de eficiencia de amplificación de los genes <i>ACTBL2</i> , <i>ACTB</i> y <i>HPRT</i>	69
Análisis de la estabilidad de los genes <i>ACTBL2</i> , <i>ACTB</i> y <i>HPRT</i>	71
Capítulo VI: Conclusiones.....	75
Capítulo VII: Recomendaciones.....	77
Capítulo VIII: Referencias	78

Índice de Tablas

Tabla 1 Primers usados para amplificar el gen <i>ACTB</i> , <i>HPRT</i> y <i>ACTBL2</i>	41
Tabla 2 Master Mix para la reacción de qPCR de los genes <i>ACTB</i> y <i>HPRT</i> en la optimización de la temperatura de annealing	42
Tabla 3 Master Mix para la reacción de qPCR de los genes <i>ACTB</i> y <i>HPRT</i> en la optimización de la concentración de primers	43
Tabla 4 Programación de las reacciones de qPCR en el equipo LightCycler 96.....	44
Tabla 5 Concentraciones de material genético para el ensayo de sensibilidad analítica	45
Tabla 6 Condiciones experimentales usadas para realizar el análisis de estabilidad en los genes <i>ACTB</i> , <i>HPRT</i> y <i>ACTBL2</i>	46
Tabla 7 Calidad y concentración del RNA extraído usado en los ensayos de qPCR ..	50
Tabla 8 Características de los primers usados para amplificar el gen <i>ACTB</i> , <i>ACTBL2</i> y <i>HPRT</i>	51
Tabla 9 Valores de la temperatura de melting (T_m) de los productos de cada gen de referencia.....	58
Tabla 10 Valores de C_q promedio y concentración de RNA correspondientes al ensayo de eficiencia de amplificación de cada gen	59
Tabla 11 Valores de la pendiente, coeficiente de determinación (R^2) y % de eficiencia, obtenidos por la curva estándar de cada gen	61
Tabla 12 Valores de C_q promedio correspondientes a los ensayos de estabilidad de cada gen.....	61

Índice de Figuras

Figura 1 Ejemplo de curvas de amplificación	31
Figura 2 Ejemplo de curvas de melting	32
Figura 3 Esquema de las diluciones en serie del RNA con un factor de dilución 1:10	33
Figura 4 Línea celular McCoy observada bajo microscopio invertido (20x)	49
Figura 5 Línea celular McCoy observada bajo microscopio invertido (40x)	49
Figura 6 Resultado de la evaluación de la integridad del RNA extraído	50
Figura 7 Diagrama de barras de los Cq promedio de ensayos de gradiente de temperatura de annealing para los genes <i>ACTB</i> y <i>HPRT</i>	52
Figura 8 Diagrama de barras de los Cq promedio de ensayos de gradiente de concentración de primers para los genes <i>ACTB</i> y <i>HPRT</i>	53
Figura 9 Mapa de calor de los Cq promedio para el gen <i>ACTBL2</i>	53
Figura 10 Productos de qPCR para el gen <i>ACTB</i> , a 60°C en las 3 concentraciones de primers diferentes	54
Figura 11 Productos de qPCR para el gen <i>HPRT</i> , a 60°C en las 3 concentraciones de primers diferentes	55
Figura 12 Producto de qPCR para el gen <i>ACTBL2</i> , en sus condiciones óptimas	55
Figura 13 Curvas de amplificación y de melting para el gen <i>ACTBL2</i>	56
Figura 14 Curvas de amplificación y de melting para el gen <i>ACTB</i>	56
Figura 15 Curvas de amplificación y de melting para el gen <i>HPRT</i>	57
Figura 16 Curva estándar para el gen <i>ACTB</i>	59
Figura 17 Curva estándar para el gen <i>HPRT</i>	60
Figura 18 Curva estándar para el gen <i>ACTBL2</i>	60
Figura 19 Ranquin de estabilidad de los genes de referencia sin el uso de la corrección de eficiencia	62
Figura 20 Ranquin de estabilidad de los genes de referencia con el uso de la corrección de eficiencia	63

Figura 21 Comparación del valor de estabilidad de los genes sin y con corrección de eficiencia.....	64
--	----

Resumen

Los genes de referencia son genes que se expresan constantemente en las células, independientemente de su estado fisiológico y patológico. Por ello, son usados como controles comparativos en análisis de expresión génica. Estos genes pueden tener una expresión diferencial cuando son expuestos a diferentes condiciones experimentales. Por ello, se debe validar que gen o conjunto de genes de referencia son más estables ante una condición en particular. El objetivo del presente estudio es comparar la estabilidad de los genes *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT* en la línea celular McCoy ATCC CRL-1696 expuesta a nanopartículas de plata cubiertas con doxiciclina (Ag-Dox NPs). Para ello, se establecieron ensayos de qPCR utilizando ARN extraído previamente de células expuestas a Ag-Dox NPs y ARN recién extraído de células de control no expuestas. Se analizó la estabilidad de los genes de referencia usando la herramienta integral NormFinder. Los datos crudos de Cq fueron corregidos para que incluya la influencia de la eficiencia de amplificación de cada gen. Como resultado se obtuvo que el gen *ACTB* es el más estable dentro de los 3 genes estudiados. Los valores de estabilidad fueron los siguientes: 1,637 para *ACTBL2*, 0,556 para *HPRT* y 0,187 para *ACTB*; siendo el gen *ACTB* más estable. Los análisis de este estudio permitirán usar al gen *ACTB* como gen de referencia en posteriores análisis de expresión génica y en la búsqueda de posibles mecanismos de nanotoxicidad y vías de muerte celular regulada inducida por exposición a Ag-Dox NPs.

Palabras clave: Gen de referencia, Eficiencia de amplificación, Estabilidad génica

Abstract

Reference genes are genes that are constantly expressed in cells, independent of their physiological or pathological state. Therefore, they are used as comparative controls in gene expression analysis. These genes may have differential expression when exposed to different experimental conditions. Therefore, it is necessary to validate which gene or set of reference genes are more stable under a particular condition. The aim of the present study is to compare the stability of the genes *ACTBL2*, *ACTB* and *HPRT* in the McCoy ATCC CRL-1696 cell line exposed to silver nanoparticles coated with doxycycline (Ag-Dox NPs). For this, qPCR assays were set up using previously extracted RNA from Ag-Dox NPs exposed cells and RNA freshly extracted from non-exposure control cells. The stability of the reference genes was analysed using the comprehensive NormFinder tool. The raw Cq data were corrected to include the influence of the amplification efficiency of each gene. Stability values were as follows: 1.637 for *ACTBL2*, 0.556 for *HPRT* and 0.187 for *ACTB*; with *ACTB* gene being more stable. The results of this study will allow the *ACTB* gene to be used as a reference gene in subsequent gene expression analyses and in the study of possible mechanisms of nanotoxicity and regulated cell death induced by exposure to Ag-Dox NPs.

Keywords: Reference gene, Amplification efficiency, Stability gene

Capítulo I: Introducción

Planteamiento del problema

La formulación de nanopartículas que van a ser utilizados para diagnóstico o tratamiento requiere que los nanocompuestos sean seguros. Una de las estrategias de evaluación de nanotoxicidad es el estudio de la respuesta *in vitro* de líneas celulares específicas, a la exposición a nanoestructuras. Se conoce que las nanopartículas de plata (Ag-NPs) poseen propiedades antimicrobianas de utilidad en múltiples campos, incluyendo biomedicina. El laboratorio de Nanomedicina y Nanobiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE ha desarrollado Ag-NPs ligadas al antibiótico doxiciclina (Ag-NPs) que son capaces de inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos (datos no publicados). Es necesario analizar la citotoxicidad de estas nanoestructuras de tal manera que se pueda analizar su efecto en líneas celulares (T. Zhang et al., 2014).

Existen diferentes formas de evaluar la citotoxicidad debida a nanopartículas (NPs), siendo la más ampliamente utilizada el ensayo de MTT. Esta es una técnica colorimétrica que indica la viabilidad celular mediante el uso de bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio. Este reactivo cambia de color por acción de la deshidrogenasa mitocondrial lo que indica la presencia de células vivas (Moharamzadeh et al., 2009). Cuando se realiza un ensayo de citotoxicidad y se observan efectos sobre la viabilidad celular, se debe realizar un análisis posterior para saber con más detalles las rutas de muerte celular que están involucradas. Esto debido a que existe la posibilidad de subestimar la viabilidad celular usando métodos como el MTT, que usan la actividad enzimática como fundamento. Existen diferentes factores como la confluencia celular o el medio de cultivo que podrían alterar el resultado de estas pruebas (Méry et al., 2017). Adicionalmente, ensayos como MTT indican el efecto sobre la viabilidad celular pero no proveen información acerca del mecanismo de inhibición de crecimiento o muerte celular. Por lo tanto, para conocer más detalles sobre la citotoxicidad de NPs se debe realizar un análisis de las rutas de

muerte celular. Una forma de realizar esto es mediante PCR cuantitativa (qPCR), usando el RNAm de los reguladores o de proteínas asociadas a los diferentes mecanismos de muerte celular como la autofagia, necrosis o apoptosis (Hu et al., 2021).

La respuesta de muerte celular a nanopartículas (NPs) puede ser estudiada en base a la expresión genes de muerte celular regulada (X. Li et al., 2014). Los estudios de expresión génica permiten realizar un análisis de los niveles de expresión de un gen target en función de otro gen. Generalmente se usan genes de mantenimiento o housekeeping, cuando estos son validados y usados se los denominan genes de referencia. Para iniciar con los estudios de expresión génica se debe optimizar y validar la estabilidad de los mismos y determinar qué gen o conjunto de genes de los preseleccionados muestran menos variación de expresión en las condiciones experimentales de las muestras (Van Acker et al., 2019).

Con la obtención de un gen de referencia estable para el experimento se puede realizar la normalización con un gen de interés, es decir, comparar la expresión del gen validado con un gen como los que tienen relación con las rutas de muerte celular. Es importante el desarrollo de una prueba estandarizada que disminuya las perturbaciones que altere su resultado final y permite tener una conclusión sólida (Köhler et al., 2020).

El presente estudio tiene como propósito, la evaluación de la estabilidad de expresión de 3 genes de referencia: similar a beta-actina 2 (*ACTBL2*), beta-actina (*ACTB*) e hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (*HPRT*) en la línea celular McCoy ATCC CRL-1696 expuesta a nanopartículas de plata cubiertas con doxiciclina.

Justificación del problema

Con la validación de la estabilidad de genes de referencia se puede llegar a la producción de una prueba estandarizada que permite evaluar la citotoxicidad del uso de nanopartículas en líneas celulares de mamíferos. Esto es importante debido a que actualmente existe un apogeo por la aplicación de estas estructuras para diferentes

campos como la medicina, agricultura, remediación ambiental, generación de energía renovable, ciencia de materiales, biología, electrónica, entre otros (Khan et al., 2019).

Con el presente estudio se busca tener un gen de referencia (housekeeping) estable que permita la normalización para estudios de expresión génica relativa para genes relacionados con mecanismos de muerte celular en la línea celular McCoy. Los datos resultantes permitirán determinar mecanismos de nanotoxicidad y vías de muerte celular regulada inducida por exposición a Ag-Dox NPs.

La estabilidad de un gen de referencia permite encontrar un normalizador que presenta poca variación bajo condiciones experimentales específicas. Es importante seleccionar adecuadamente los genes candidatos a genes de referencia y definir el más estable de todos ellos. La validación para encontrar un gen de referencia estable es un análisis estadístico importante debido a que a la variación de este gen hace que la normalización ante el gen target no sea la correcta. Los posibles resultados de un análisis sin normalización pueden ser desde la presencia de ruido en los análisis de expresión génica, o a su vez, pueden generar resultados erróneos (Dheda et al., 2004).

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la estabilidad de expresión de los genes de referencia *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT* en la línea celular McCoy ATCC CRL-1696 expuesta a nanopartículas de plata cubiertas con doxiciclina.

Objetivos específicos

Extraer RNA de células McCoy ATCC CRL-1696 para la optimización de los protocolos de qPCR de los genes *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT*.

Optimizar un protocolo de PCR en tiempo real para el gen de referencia proteína similar a beta-actina 2 (*ACTBL2*).

Optimizar un protocolo de PCR en tiempo real para el gen de referencia beta-actina (*ACTB*).

Optimizar un protocolo de PCR en tiempo real para el gen de referencia hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (*HPRT*).

Comparar la estabilidad de los 3 genes de referencia estandarizados *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT* expuestas a diferentes concentraciones de Ag-Dox NPs en la línea celular McCoy ATCC CRL-1696.

Hipótesis

La expresión de los genes de referencia *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT* es constante en la línea celular McCoy ATCC CRL-1696 no expuesta y expuesta a nanopartículas de plata cubiertas con doxiciclina.

Capítulo II: Marco Teórico

Nanopartículas

Se denominan nanopartículas a los materiales que tienen un tamaño dentro de la escala de 1 a 100 nm. A estos materiales se les atribuyen varias aplicaciones en campos como el médico, el medioambiental, el farmacéutico, el energético, entre otros. Es posible encontrarlos en el ambiente y también es posible realizar una síntesis desde cero, por su presencia en diversos entornos es necesario conocer su citotoxicidad (Khan et al., 2019). La aplicación y la síntesis de nanopartículas ha estado en constante crecimiento durante los últimos años. Y consecuente de esto, los análisis de la toxicidad de estos materiales han entrado en aumento (Lewinski et al., 2008). Un análisis de citotoxicidad depende de varios factores desde la prueba usada, la línea celular estudiada, el tipo de nanopartícula, entre otros (Kong et al., 2011).

Aplicaciones de las nanopartículas

Por las propiedades físico químicas como su capacidad catalítica, magnetismo, radio área con volumen, conductividad son usados ampliamente en varios campos y aplicaciones. Dentro de las más estudiadas está la fabricación de materiales textiles, transporte para la administración de fármacos, bioimagen, lubricación, tratamiento de suelos o aguas contaminados, electrónica, entre otros (Moeinzadeh & Jabbari, 2017). Específicamente en el campo biológico, el estudio y desarrollo de las nanopartículas han estado en continuo crecimiento desde los últimos años. Los biomateriales tienen varias aplicaciones como administración de fármacos, detección de patógenos, ingeniería de tejidos, detección de material genético, transporte de genes, entre otros (Salata, 2004).

Nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata (AgNP) es uno de los biomateriales más estudiados debido a la variedad de aplicaciones médicas que se le puede dar. En los últimos años, los temas de interés estudiados en AgNP han sido la funcionalización de

las nanopartículas para el uso en diagnósticos, tratamiento de enfermedades tumorales, bioaplicativos para determinar su actividad en modelos biológicos, entre otros (X.-F. Zhang et al., 2016). Las nanopartículas de plata puede atravesar las paredes de las paredes de las bacterias donde puede desencadenar daños irreversibles e inclusive la muerte de la célula. Otro mecanismo molecular de las Ag-NPs se basa en que estas producen especies reactivas de oxígeno que inhiben el correcto funcionamiento de la replicación de DNA. Por ello se estudia a estas nanopartículas como agente antimicrobiano y como material transportador de otros compuestos como fármacos (I. X. Yin et al., 2020).

Nanopartículas recubiertas de fármacos

La relación área volumen de las nanopartículas permite que este material sea idóneo para poder transportar fármacos y administrarlos en el cuerpo humano. Estos nanomateriales son usados en la encapsulación de polipéptidos, drogas, ácidos nucleicos, aminoácidos, entre otros para que aumentar la eficiencia de administración del ligando (Fam et al., 2020). Las nanopartículas son usadas en el campo de la medicina, específicamente en las terapias de precisión. El diseño inteligente de estas juega un rol importante para obtener una alta eficiencia de administración de un fármaco. Su correcta funcionalización y uso de aditivos, previo al fármaco, pueden complementar en el transporte directo de una molécula a su destino principal (Mitchell et al., 2021).

Ag-NPs realizadas en la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE

Guerrero & Paredes (2017) elaboraron y caracterizaron Ag-NPs que son usadas posteriormente para producir un nanofluido imprimible que puedan ser usados como dispositivos con capacidad antibacteriana (Guerrero & Paredes, 2017). Se encontró que estas nanopartículas son buenos agentes antimicrobianos por su halo de inhibición presentado en cultivos de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Las características de las estas nanopartículas las hacen adecuadas para el uso en

campos como remediación ambiental, medicina, aplicaciones farmacéuticas e industriales.

Líneas Celulares

Las líneas celulares son cultivos puros de células pertenecientes a animales que permite su reproducción a largo plazo. Estos son ocupados como modelos para realizar investigaciones que pueden ser transvasadas al comportamiento en la vida real. Las aplicaciones de éstas son variadas como el testeado de vacunas, pruebas de la toxicidad celular de un compuesto, producción de un anticuerpo, análisis de la expresión génica, entre otras (Kaur & Dufour, 2012). Su manejo tiene limitantes que deben ser contraladas de manera adecuada como el uso adecuado de medios de cultivos y control de contaminantes del medio. Otro problema es la caracterización ineficiente del cultivo celular y la presencia de microorganismos, como bacterias o levaduras, que afectan al correcto uso de la línea celular (Geraghty et al., 2014).

Usos y generalidades del mantenimiento

Las líneas celulares crean deben ser congeladas a menos de -130°C para su correcto mantenimiento. Siempre debe ser en un medio de cultivo con un criopreservante que evite daños celulares en el proceso de congelamiento y descongelamiento. Los crioviales deben tener de 1 a 5 millones de células para garantizar el uso de la línea celular largo plazo. Es necesario el uso de medios de cultivos que garanticen el correcto crecimiento de las células. Dependiendo del tipo de línea celular, se usa diferentes suplementos. El correcto manejo de las líneas celulares permite su mantenimiento a largo plazo y con ello poder aplicarse en ensayos que permitan tener resultados confiables. Las guías de adquisición, identificación, autenticación, conservación, transporte, manejo, tratamiento, control de contaminación y caracterización son importantes para que la línea celular sea un modelo que pueda ser usado en ensayos del ámbito biológico (Geraghty et al., 2014).

Pruebas de citotoxicidad

Una prueba de citotoxicidad es una manera en la cual se puede observar como las células de una línea celular crecen o son afectadas en una condición experimental. Con esta es posible observar los efectos que tiene una condición o una molécula en la célula, la cual puede ser observada en función de la reproducción y crecimiento celular (W. Li et al., 2015). Mediante el análisis de la integridad de la membrana celular se puede evaluar la toxicidad, esta es una de las formas más usadas para distinguir entre células vivas y muertas. Este enfoque para analizar cambios de la célula se basa en la permeabilidad de la célula que permite el ingreso de ciertos colorantes cuando la membrana celular pierde su estructura normal. Otro enfoque es el análisis de componentes intracelulares que salen de la célula cuando esta se vuelve no viable (Riss et al., 2019).

Reducción del MTT

El ensayo del MTT es una técnica que permite medir la tasa de proliferación celular, en función la enzima reductasa mitocondrial. Usa al colorante MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio) que es de color amarillo y es hidrosoluble. Este sustrato cambia de color, a un formazán púrpura que es liposoluble, mediante la acción de la reductasa (Kumar et al., 2018). Esta prueba se realiza en células que ya fueron expuestas a las condiciones experimentales, primero se procede con la incubación de MTT. Posteriormente, se solubiliza el producto con DMSO para luego medir por densidad óptica la concentración del formazán producido. La cantidad del producto se correlaciona a la reducción intracelular de MTT (Ghasemi et al., 2021).

LDH Citosólica

La proteína lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima que permite el paso transformación a lactato, a partir, de un piruvato. El proceso enzimático tiene como resultado la formación de NADH. La LDH está presente dentro del citoplasma de la célula, cuando la membrana es fragmentada existe la liberación de esta enzima. El

NADH tiene una potente capacidad de reducción, este es el fundamento para que se usen sustratos no coloreados que cambie de color por la presencia de esta molécula. Cuando el sustrato está en contacto con el NADH y otra enzima, existe una producción de otra molécula que tiene color y permite determinar la presencia indirecta de la enzima lactato deshidrogenasa. El sustrato resazurina se puede convertir en resorufina con el NADH y permite tener una relación colorimétrica indirecta de la viabilidad celular (Riss et al., 2019).

Ensayo de exclusión del azul de tripán

Es un método que permite conocer la viabilidad celular mediante el conteo de directo de células viables para calcular un porcentaje que permite conocer la proporción de células afectadas por las condiciones experimentales. Su fundamento consiste en que el uso de la tinción azul de tripán permite teñir las células no viables debido a que estas perdieron su permeabilidad de membrana y existe el ingreso del colorante (Riss et al., 2019). El conteo es uno de los parámetros que es necesario hacerlo con precisión para evitar errores de conteo y de interpretación. Este ensayo usa la cámara de Neubauer, posterior a la tinción de las células, para el conteo celular y así obtener también la concentración de células presentes en una muestra (Avelar-Freitas et al., 2014).

Por Expresión génica

Otro ensayo que puede determinar la toxicidad en una célula es el de expresión génica. Existe genes proapoptosis y antiapoptosis que son usados como base para observa su nivel de cambio genético entre las condiciones experimentales y el tratamiento control. La citotoxicidad observada *in vitro* es relacionable y es concordante con la expresión diferencial de genes relacionados con la apoptosis (Vazanov et al., 2018). Genes como Bax o Fas son considerados como genes proapoptosis. Mientras que otros genes se consideran inhibidoras de la muerte celular, como lo es la survivina o el Bcl-2 (Mazoochi et al., 2009). Estos análisis consisten en

observar la expresión génica de los genes de muerte celular. Es necesario el uso de un gen de referencia o endógeno que permita realizar la cuantificación relativa de este tipo de genes. Los genes alterados pueden llegar a analizarse más a fondo y ser un punto de partida para estudiar los mecanismos de toxicidad en la célula (Jung et al., 2014).

Análisis de expresión génica

La expresión génica es el proceso en el cual se activa o inhibe la traducción de un determinado gen pasando desde DNA por RNA mensajero (RNAm) hasta proteína. Con la ayuda del análisis del patrón y composición del RNAm es posible realizar estudios de diagnóstico y análisis cuantitativos de la expresión de cierto grupo de genes (Clancy & Brown, 2008; Dundas & Ling, 2012; Ståhl et al., 2016). Organismos eucariotas tienen una expresión génica distinta dependiendo de la célula y el rol que esté cumpliendo. La variabilidad celular tiene que ver con algunos factores como etapa de desarrollo celular, cantidad de proteínas relacionadas con el dogma de la biología molecular (por ejemplo, la RNA polimerasa), tamaño y función celular (Fraser et al., 2021). El DNA genómico de una célula es estable durante la existencia de la célula. Por otro lado, el RNA mensajero varía en función de exposiciones a diversas condiciones en la célula. Precisamente, estas variaciones en diferentes condiciones experimentales son objeto de estudio para analizar la regulación y expresión génica (Balliu et al., 2019).

Cuantificación relativa

La cuantificación relativa es una técnica de PCR cuantitativa (qPCR) que permite encontrar la cantidad de RNA mensajero de un gen de interés que está presente en una muestra. Para realizar este ensayo es necesario hacer una comparación de la expresión génica que posee un gen de interés con otro gen que se expresa constantemente en la célula, es decir, necesita de un gen de referencia (Čikoš et al., 2007). Esta técnica se usa para la detección de alteraciones en los niveles

normales de expresión de un gen estudiado. En los inicios de los estudios de análisis de estabilidad se usaban genes de limpieza celular ya que eran conocidos por su estabilidad de expresión ante diversas condiciones. En la actualidad, es necesario validar la estabilidad de un gen de limpieza para que pueda ser usado como referencia en análisis de expresión génica (Regier & Frey, 2010).

Método Livak

El método de Livak, o también llamado $2^{\Delta\Delta Cq}$, es una forma para realizar el cálculo del nivel de expresión génicas. Un supuesto de esta fórmula es que las eficiencias de amplificación deben estar cerca al 100% en los dos genes. Es decir, la eficiencia de los genes de referencia y de los genes deben ser similares, con una máxima diferencia del 5%. En este método se usa un calibrador para normalizar con el gen de interés y de referencia. Este método indica el cambio de expresión y su resultado es el valor de variación entre los dos genes. Esta ecuación también permite hacer una corrección de eficiencia usando los valores reales obtenidos de cada gen en particular (Bio-Rad, s. f.; Livak & Schmittgen, 2001).

Método ΔCq usando un gen de referencia

Es una variante del método de Livak, en este se asume la simplificación del calibrador. Es decir, realiza una comparación directa entre el gen de interés con el gen referencia. Esta fórmula usa esencialmente la normalización directa de los dos genes. Los supuestos de eficiencia deben ser los mismos que en el método de Livak, ya que es una variación de este. Los resultados de este análisis es el cambio de expresión del gen de interés en función del gen de referencia (Bio-Rad, s. f.; Haimes & Kelley, 2018; Hasler et al., 2020).

Método Pfaffl

Este método se usa para realizar análisis de expresión de genes con cuantificación relativa. Esta fórmula usa como base al método de Livak. Este método se usa cuando difieren las eficiencias de amplificación entre el gen de referencia y el

gen de interés. También es llamado el método de Ct de comparación corregido por eficiencia. La respuesta de este enfoque es el nivel del cambio de expresión del gen interés (Bio-Rad, s. f.; Brankatschk et al., 2012).

qPCR

La qPCR o PCR cuantitativa es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual permite la amplificación de una secuencia específica de material genético de doble cadena. También es llamada PCR en tiempo real y es un método que tiene varias funciones como cuantificar material genético, detectar la presencia de un gen o identificar un organismo (Kralik & Ricchi, 2017). La introducción de la técnica de qPCR ha permitido realizar análisis de varios transcritos en simultáneo con una alta sensibilidad. Una de las diferencias entre la PCR convencional o punto final y la qPCR es la existencia de curvas de amplificación que detectan en tiempo real la reacción de la polimerasa. La curva de amplificación tiene algunas etapas donde la más destacada es la fase exponencial, en la cual la acumulación de fluorescencia permite observar un aumento de detección al superar un umbral. Los datos que se obtienen de esta prueba son Ct (threshold cycle) que permiten saber en qué ciclo de la reacción del ensayo existe la señal que supera el umbral de detección (Peirson & Butler, 2007).

Químicas de qPCR

Las químicas de la qPCR son los métodos que permiten detectar el ciclo en el cual se presenta, por primera vez, la acumulación del amplicon. Se pueden ocupar colorantes como el SYBR Green, este compuesto se intercala con el DNA de doble cadena y trabaja independientemente del experimento. Uno de las desventajas de estos colorantes es que son inespecíficos debido a que se unen a cualquier DNA de doble cadena presente en la reacción, como productos inespecíficos o primer-dimers. Otra química de qPCR es la sonda de hibridación, esta se une de forma específica a una secuencia objetivo. Con esta química se puede realizar ensayos tipo múltiplex, un

ejemplo de uso de esta química es en la sonda TaqMan. También existe la sonda de hidrólisis que tiene una molécula de fluoróforo y un extintor, esta emite fluorescencia cuando se da la reacción de la polimerasa ya que el extintor es escindido y por lo tanto no inhibe la fluorescencia emitida. Una variación de la anterior química es la denominada baliza molecular, este método funciona de forma parecida a la tecnología TaqMan. La principal diferencia es que el fluoróforo y el extintor están separados por una horquilla que extiende su distancia y su inhibición a medida de la amplificación. Las sondas FRET es una química que se basa en un fluoróforo aceptor y otro donante que están diseñadas para unirse de forma específica a la secuencia de interés. Otras químicas que también se usan son sondas de micro RNA (miRNA), sondas de ácido nucleico bloqueado (LNA), sondas fluorogénicas LUX, entre otras (Buh Gašparič et al., 2008; Bustin, 2002; Elvidge, 2005).

Optimización de qPCR

Es necesario realizar una optimización de las condiciones a la que una qPCR se efectúa, debido a que en función de esta optimización se observaran resultados en la sensibilidad, especificidad y eficiencia de amplificación del ensayo. Y en función de esta optimización de las pruebas de qPCR es posible realizar ensayos posteriores como de validación de la estabilidad o normalización (Zhao et al., 2021). Existen varios factores en una qPCR que pueden probarse en distintos rangos para poder encontrar un valor preciso que permita tener una eficiencia de amplificación cercana al 100%. Los factores que son materia de optimización en un ensayo de qPCR son la temperatura de annealing, la velocidad de rampa de cada paso del protocolo de qPCR, la concentración de cada primer, cantidad de material genético usado, la concentración de sales, entre otros (Lorenz, 2012).

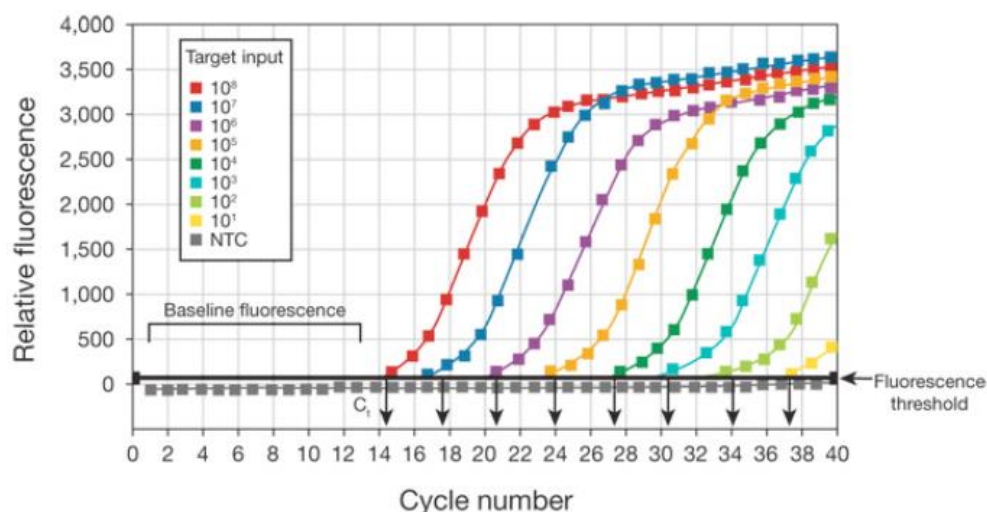
Curva de amplificación

La curva de amplificación es el gráfico que se obtiene cuando se dibuja el avance de la señal de fluorescencia a lo largo de todo el tiempo que se ejecuta el

ensayo. En la Figura 1 se observan las típicas curvas de amplificación de un ensayo de qPCR, en el eje x se muestra los ciclos de amplificación que son interpretados como el tiempo que se está corriendo un ensayo. Por otra parte, en el eje y se indica la fluorescencia relativa mostrada conforme avanza la prueba. La curva de amplificación tiene 4 fases consecutivas: fase de referencia (baseline), fase exponencial, fase lineal y fase de meseta. Cuando la acumulación de la fluorescencia supera este umbral se obtiene un ciclo, conocido como Cq o Ct (Life Technologies, 2012; Y. Zhang et al., 2020).

Figura 1

Ejemplo de curvas de amplificación



Nota. Recuperado de (Life Technologies, 2012)

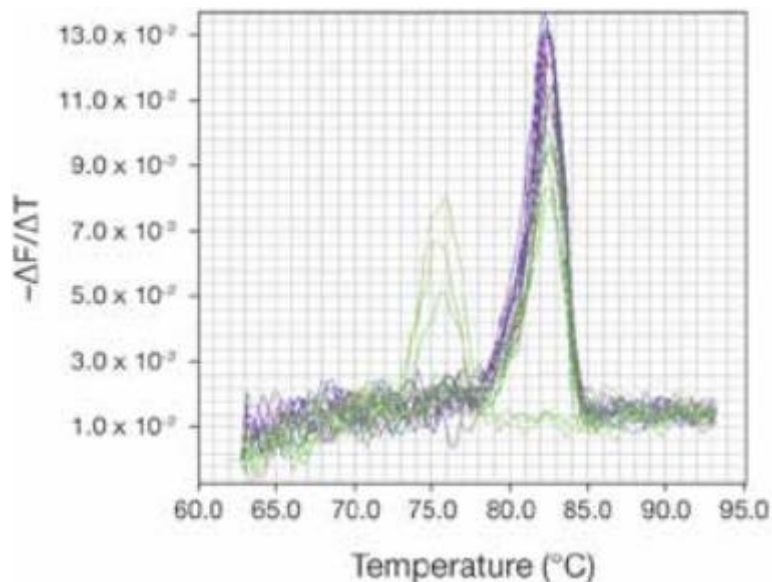
Curva de melting

La curva de melting o de fusión es un gráfico obtenido de los ensayos de qPCR, la cual tiene como objetivo indicar que la temperatura a la que el producto amplificado es disociado (Figura 2). El análisis tiene su fundamento en que a la temperatura de melting (T_m) existe una disminución de la fluorescencia (Life Technologies, 2012). Los análisis de las curvas de melting permiten distinguir si en un

ensayo de qPCR se encuentran productos únicos o existe una contaminación del ensayo como productos no específicos o primer-dimers (Thompson, 2010).

Figura 2

Ejemplo de curvas de melting



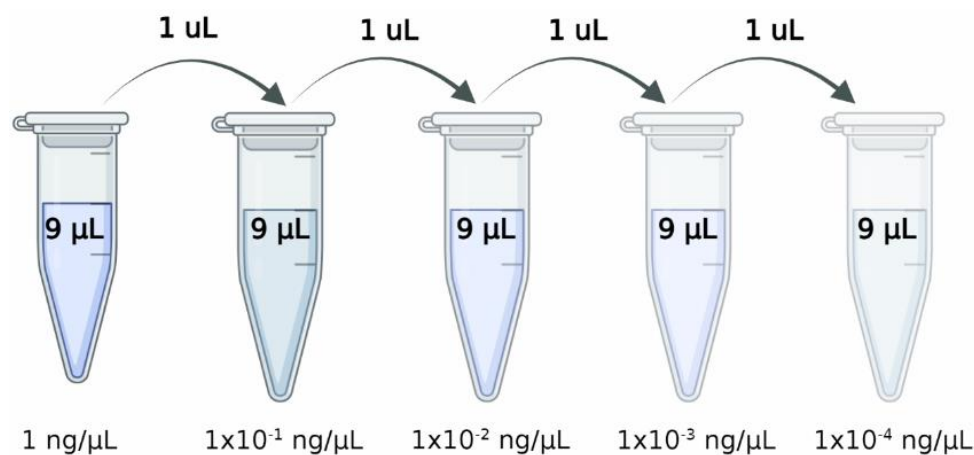
Nota. Recuperado de (Life Technologies, 2012)

Curva estándar

La curva estándar es un método gráfico que permite obtener la eficiencia de amplificación de un ensayo de qPCR en un gen específico. Para realizar esta línea es necesario correr ensayos a diferentes concentraciones de material genético, generalmente se recurre a una dilución en serie para obtener concentraciones diluidas en función de un factor fijo (el más común es 1:10, se ilustra en la Figura 3). La curva estándar se realiza mediante una regresión lineal de los Cq obtenidos de la curva de amplificación de cada concentración vs el logaritmo de la concentración respectiva. Con el modelo de regresión es posible obtener el coeficiente de correlación (R^2) y la pendiente (m) de la recta. Con la ayuda de la curva estándar es posible calcular la eficiencia de amplificación de una reacción (Life Technologies, 2012; Svec et al., 2015).

Figura 3

Esquema de diluciones en serie usando RNA, con un factor de dilución 1:10



Nota. Imagen diseñada en el Software BioRender

Coefficiente de determinación (R^2)

El coeficiente de determinación del ajuste de la curva estándar permite observar la relación que se tiene entre los puntos graficados. Se necesitan mínimo 5 puntos para realizar la curva estándar (Agilent Technologies, Inc, 2012). Todos los puntos usados para graficar la curva estándar deben guardar una estrecha relación entre sí, para tener una eficiencia del 100% es necesario tener una diferencia de 3.2 entre cada valor de Cq. El valor del coeficiente de determinación (R^2) debe ser superior a 0.9. Se recomienda que los valores de R^2 sean superiores a 0.98 para que se demuestre una mejor precisión en el ensayo (Bivins et al., 2021; Eurogentec, 2004; Life Technologies, 2012).

Pendiente (m)

La pendiente de una curva estándar permite obtener la eficiencia de amplificación en un ensayo de qPCR, la curva estándar debe presentar una pendiente de -3.32 para que la eficiencia sea del 100% (Life Technologies, 2012). El rango recomendable de eficiencia de amplificación está en el rango de 90-110% (Bivins et al., 2021). Si el valor de la eficiencia de amplificación sale del rango esperado, es

necesario hacer una optimización de las condiciones del ensayo de qPCR. Obtener valores superiores al 110% puede deberse a situaciones como tener contaminación, errores de pipeteo de soluciones, tener activadores de la polimerasa en los reactivos, formación de primer-dimers, concentración baja de material genético, entre otras. Por otro lado, cuando se obtiene valores inferiores al 90% se puede deber a que la master mix no tiene la concentración de reactivos óptima, mal diseño de los primers, condiciones no óptimas para la corrida de la qPCR, entre otros (Čepin, 2017).

Eficiencia de la reacción (E)

Para realizar el cálculo de la eficiencia se ocupa una fórmula que usa la pendiente (m) de la curva estándar (Ginzinger, 2002). La fórmula se detalla a continuación:

Ecuación 1

$$\text{Eficiencia de amplificación (\%)} = \left(10^{\left(\frac{-1}{m}\right)} - 1\right) \times 100 \%$$

También se usa el valor de eficiencia en función de la curva estándar (E_{stc}), con este valor es posible realizar cálculo usando correcciones de eficiencia (Ruijter et al., 2021).

$$E_{stc} = \left(10^{\left(\frac{-1}{m}\right)}\right)$$

Corrección de eficiencia

En los análisis de estabilidad se usan Cq como datos crudos para observar la variabilidad genética de un gen (Ginzinger, 2002). Varios programas, como RefFinder, usan directamente los datos de Cq como entrada para el análisis (De Spiegelaere et al., 2015). Por otro lado, otras herramientas (como NormFinder) usan una transformación de los Cq mediante el método del delta Ct (Andersen et al., 2004). Siguiendo el método del delta Ct, se usa la siguiente ecuación como dato procesado para el análisis de estabilidad en NormFinder:

Ecuación 2

$$2^{-Ct}$$

Sin embargo, lo aconsejable para realizar un análisis de estabilidad es usar la eficiencia de la curva estándar (E_{stc}) como dato corrector de los Cq (Ruijter et al., 2021). Siguiendo el método del delta Ct y usando E_{stc} , se usa la siguiente ecuación como dato procesado para el análisis de estabilidad con corrección de eficiencia en NormFinder:

Ecuación 3

$$E_{stc}^{-Ct}$$

Genes de referencia

Los genes de referencia conocidos también como genes de control o domésticos, son genes cuya expresión es estable en cualquier condición estudiada y tendrán exactamente el mismo nivel de expresión en todas las muestras; en la práctica se espera tener una variabilidad muy baja en cada condición probada y de preferencia se espera que no existan ningún tipo de variabilidad, por esa razón estos genes se usa como estándar para medir y comparar los niveles de expresión relativos de los genes diana en la misma muestra biológica. Solo los genes de referencia que se expresan de manera estable en todas las condiciones del experimento pueden considerarse ideales y pueden ser utilizados para el análisis preciso de los resultados de la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) (Curis et al., 2019; Tian et al., 2022). Estos genes deben ser seleccionados de diferentes vías biológicas y que su expresión se regule de forma independiente (W.-Z. Yin et al., 2019).

Gen *ACTBL2*

La ACTBL2 (proteína 2 similar a la β -actina), es una proteína descrita desde el 2006, en el trabajo de (Chang et al., 2006) titulado Identificación de una nueva isoforma de actina en el carcinoma hepatocelular, el gen que codifica esta proteína lleva el

nombre de ACTBL2, es un gen retrotranspuesto que no contiene intrones y se ubica en el cromosoma 5 (5q11.2), se transcribe y se traduce su ARNm (Malek et al., 2021). Se sabe que TonEBP/NFAT5 regula la expresión de ACTBL2 en células de músculo liso, en análisis *in silico* centrados en la secuencia promotora de ACTBL2 mostraron varios sitios de unión putativos para el factor nuclear de células T activadas 5 (NFAT5). La eliminación del gen de NFAT5 en las células del músculo liso vascular dio como resultado una expresión significativamente menor de ACTBL2, lo que demuestra su interacción directa (Hödebeck et al., 2014).

Gen ACTB

Las actinas son proteínas cruciales para la motilidad celular, el mantenimiento de la forma celular, la migración de quimio atrayentes, tráfico de orgánulos celulares y cromosomas, mitosis, contracción muscular, transcripción y reparación del ADN, de las cuales existen siete isoformas divididas en dos clases, la clase I conocida como actina no muscular a la que pertenecen ACTB (β -actina no muscular), ACTG1 (γ -actina no muscular) y ACTBL2 (proteína 2 similar a la β -actina), y la clase II conocida como actina muscular a la que pertenecen la ACTA2 (α -actina de músculo liso), ACTA1 (α -actina del músculo esquelético), ACTC1 (α -actina del músculo cardíaco), ACTG2 (γ -actina del músculo liso) (Malek et al., 2021).

Gen HPRT

El gen HPRT1, es el encargado de traducir la proteína hipoxantina fosforribosiltransferasa 1, que es una transferasa encargada de realizar la transformación de la hipoxantina en el monofosfato de inosina mediante de la entrega del grupo 5-fosforribosil del 5-fosforribosil 1-pirofosfato, proceso que se conoce como vía de restauración de purinas, esta enzima permite la generación de nucleótidos de purina, a partir del reciclaje de estas moléculas, proceso que es más eficiente y toma menos energía y tiempo que la creación desde cero (Guo et al., 2022). El gen HPRT

tiene una longitud de aproximadamente 44 kb y contiene 9 exones, que se encuentra ubicada en el cromosoma Xq26.2-q26.3.

Estabilidad genes de referencia

Para realizar la elección de genes de referencia para los estudios de expresión génica mediante PCR cuantitativa, se debe probar el gen de referencia en todos los análisis que también va a exponerse el gen que se va a cuantificar. Por ello, el gen de referencia idóneo debe transcribirse de forma constante en todos los tipos de células y tejidos, y su grado de transcripción de ARN no debe ser cambiado ya sea por influencias internas o externas (Xu et al., 2022).

Para hallar un gen estable, se debe realizar un paso preliminar, que es hacer la caracterización de la secuencia de los genes candidatos. Esto es para que el diseño de los primers ayude en la amplificación de productos específicos del gen de interés, y así se podrá relacionar a la cantidad real de ARNm existente. A tal efecto, los primers no deben tener como objetivo la amplificación de algún polimorfismo génico. También es necesario realizar otras consideraciones como la presencia de splicing en los organismos eucariotas, por ello, se deben diseñar primers específicos para el ARNm presente en el organismo. Para usar la técnica de qPCR también es necesario probar si el amplicon es específico y de la longitud esperada, es decir, que esté dentro del rango de 80 a 200 pb (Thornton & Basu, 2011). El contenido de Guanina-Citosina (GC) en los primers también juegan un rol importante en la termodinámica del mismo, este parámetro debe estar cerca del 50 % con una longitud de aproximadamente 20 pb como el valor óptimo (Kozera & Rapacz, 2013).

A menudo, se selecciona un conjunto de genes para la validación con el uso de herramientas que permiten el análisis global de las transcripciones, como chips y micromatrices. Muchas técnicas solo pueden realizar un análisis cualitativo, debido a que no permiten relacionar la intensidad de la señal recibida con la cantidad de transcrito existente en la muestra. Sin embargo, si el gen analizado exhibe un alto nivel

de expresión en el análisis de micromatrices, podría ser similar para el ensayo de qPCR. Debido a que los microarreglos son de carácter cualitativos, se usan alternativas como qPCR o la técnica de SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) (Radonić et al., 2004).

En preferencia el gen de referencia debe mostrar un ciclo de umbral (Ct) similar con el gen de interés para que la variación que se requiere analizar sea comparable. Se pueden utilizar diferentes enfoques, técnicas y algoritmos estadísticos para la elección óptima de un par o más de genes de referencia. Algunos programas permiten obtener el orden de estabilidad de los genes de referencia por la medida de estabilidad M (definida como la desviación estándar de los valores de expresión transformados logarítmicamente de los genes comparados). Este índice de estabilidad, junto con su valor decreciente, resulta en la estabilidad del gen. Esta medida de estabilidad compara en grupo de dos genes contra todos los demás genes candidatos. Se recomienda utilizar al menos dos genes de referencia, ya que el uso de uno solo puede no ajustarse a las condiciones experimentales del experimento, lo que lleva a errores en los resultados (Kozera & Rapacz, 2013).

Para cada reacción se debe determinar la eficiencia de amplificación (E) para tener una medida en la cual los parámetros del ensayo son los correctos. Utilizando los valores de Cq, obtenidos como datos crudos de las corridas de qPCR, se realizan análisis de estabilidad para poder validar si un gen de referencia es estable (X. Wang et al., 2016). Usando correcciones de eficiencia se puede establecer de manera más confiable que gen de referencia es más estable (Ruijter et al., 2021).

Capítulo III: Metodología

Participantes

El presente proyecto “Evaluación de la estabilidad de expresión de los genes de referencia *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT* en la línea celular McCoy ATCC CRL-1696 expuesta a nanopartículas de plata cubiertas con doxiciclina” fue realizado en colaboración con el Laboratorio de Biotecnología Humana, perteneciente a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, ubicado en Sangolquí, en la Av. General Rumiñahui s/n y Ambato. La tutora del proyecto fue Marbel Torres, Ph.D., docente de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología. Y el cotutor del proyecto fue el Dr. Grijalva Marcelo M.D. PhD., jefe del Laboratorio de Biotecnología Humana. Adicionalmente, la Ing. Tatiana Lara, técnica del Laboratorio de Biotecnología Humana, participó en la instrucción de las técnicas moleculares del presente proyecto.

Muestras

La línea celular McCoy ATCC CRL-1696 y el RNA extraído de la línea celular McCoy ATCC CRL-1696 expuesta a diferentes concentraciones de nanopartículas de plata cubiertas con doxiciclina fueron proporcionados por el Laboratorio de Biotecnología Humana de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Período de tiempo de investigación

La investigación inició en el mes de mayo de 2022 y finalizó en el mes de agosto de 2022, teniendo una duración de 3 meses.

Mantenimiento de la línea celular McCoy ATCC CRL-1696

Se realizó el mantenimiento de la línea celular McCoy ATCC CRL-1696, la cual está formada por células tipo fibroblasto con adherencia. Se realizó pases de esta línea con la finalidad de obtener el material genético de partida para las posteriores optimizaciones de los protocolos de qPCR.

Para el cultivo y mantenimiento de esta línea celular se utilizó medio de cultivo MEM (Minimum Essential Media) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino y 1% de antibiótico (Penicilina y Estreptomina). Se incubó la línea celular en una incubadora a 37°C con 5% CO₂. Posteriormente, cada pase o subcultivo se realizó tras obtener una confluencia desde 70% hasta 80%. El procedimiento de congelamiento se realizó en crioviales con DMSO y medio de cultivo MEM sin suplementar. La cantidad de células que se colocó en cada criovial fue de 1.5×10^6 células.

Extracción de RNA

Se realizó la extracción de RNA de la línea celular McCoy ATCC CRL-1696 sin ningún tratamiento para ser usado en la estandarización de los genes de referencia y como control sin exposición en la determinación de la estabilidad de los genes de referencia. Las muestras de RNA tratadas con diferentes concentraciones de Ag-Dox NPs (50, 6.75 y 1.68 µg/mL) fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología Humana de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Todas las extracciones de RNA se llevaron a cabo con el kit "PureLink RNA Mini Kit" partiendo de una cantidad aproximada de 2×10^6 células. Se eliminó el DNA genómico residual usando un tratamiento con TURBO DNase (Invitrogen). La verificación de la cantidad y calidad de la muestra se realizaron en el equipo NanoDrop 2000, perteneciente al laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Se evaluó la calidad del RNA mediante una electroforesis en gel de agarosa (1%) usando 0.075µL/ml de SYBR Safe. Las condiciones de este ensayo fueron a 90 voltios (V) por 75 minutos.

Optimización de los protocolos de qPCR

Las optimizaciones de qPCR se realizaron partiendo de material genético RNA de las muestras sin exposición a nanopartículas. El kit usado para estos ensayos fue "SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit".

Diseño experimental para optimizar la temperatura de annealing y concentración de primers

Para determinar la estabilidad de expresión de los genes de referencia *ACTB*, *HPRT* y *ACTBL2* se planteó encontrar las condiciones óptimas para las corridas de PCR en tiempo real. Se probaron 2 factores determinantes en la técnica de la PCR: temperatura de annealing y concentración de primers. Se consideraron las temperaturas de melting de cada juego de primers para escoger las temperaturas de annealing a utilizarse (54°C, 57°C y 60°C). Por otro lado, se probaron concentraciones de primers de 0.1 µM, 0.3 µM y 0.5 µM, de acuerdo al rango óptimo que recomienda el kit de qPCR usado. Todo esto con el fin de encontrar las mejores condiciones para realizar el análisis de estabilidad de los genes de referencia. Los primers usados se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1

Primers usados para amplificar el gen ACTB, HPRT y ACTBL2

Gen	Secuencias de los Primers Forward / Reverse	NCBI Reference Sequence	Longitud del producto (bp)
<i>ACTB</i> (beta-actina)	TGCTCTAGACTTCGAGCA	NM_007393.5	124
	GGAGATG / AGCCTCAGGGCATCGGAA		
<i>HPRT</i> (hipoxantina guanina fosforribosiltrans- ferasa)	TCAGTCAACGGGGGACAT	NM_013556.2	131
	AAAAG / GCTTAACCAGGGAAAGCA AAG		

Gen	Secuencias de los Primers Forward / Reverse	NCBI Reference Sequence	Longitud del producto (bp)
<i>ACTBL2</i> (proteína similar a beta-actina 2)	ATGGTTGACGATGAGCTG ACT / GACTCCGTGTTCAATGGG ATAC	NM_175497.3	228

Para el análisis de los genes *ACTB* y *HPRT* se realizó un diseño experimental dividido en dos partes. En primer lugar, se realizaron ensayos de gradiente de temperatura de Annealing siguiendo las concentraciones y volúmenes de reacción que se observa en la Tabla 2.

Tabla 2

Master Mix para la reacción de qPCR de los genes ACTB y HPRT en la optimización de la temperatura de annealing

Componente	$C_{Inicial}$	C_{Final}	Volumen Final
SuperScript III RT / Platinum Taq Mix*	50X	1X	0.4 μ L
2X SYBR® Green Reaction Mix	2X	1X	10 μ L
BSA	1000 ng/ μ L	250 ng/ μ L	5 μ L
Primer Forward	10 μ M	0.5 μ M	1 μ L
Primer Reverse	10 μ M	0.5 μ M	1 μ L
RNA**	20 ng/ μ L	1 ng/ μ L	1 μ L
Agua DEPC	-	-	1.6 μ L
Volumen Final Total por unidad Reacción			20 μL

Notas. *En el control negativo de retrotranscripción se reemplaza el SuperScript III RT / Platinum Taq Mix por dos unidades Platinum Taq (0.16 μL de polimerasa para 20 μL de reacción) ** En el control negativo de RNA se sustituye el RNA por Agua DEPC

Posteriormente, en la temperatura de annealing más eficiente (probando con 54°C, 57°C y 60°C) se probaron las diferentes concentraciones equimolares de primers (0.1 μM , 0.3 μM y 0.5 μM), siguiendo las concentraciones de master mix mostradas en la Tabla 3.

Tabla 3

Master Mix para la reacción de qPCR de los genes ACTB y HPRT en la optimización de la concentración de primers

Componente	$C_{Inicial}$	C_{Final}	Volumen Final
SuperScript III RT / Platinum Taq Mix*	50X	1X	0.4 μL
2X SYBR® Green Reaction Mix	2X	1X	10 μL
BSA	1000 ng/ μL	250 ng/ μL	5 μL
Primer Forward	10 μM	P***	Z μL
Primer Reverse	10 μM	P***	Z μL
RNA**	20 ng/ μL	1 ng/ μL	1 μL
Agua DEPC	-	-	W**** μL
Volumen Final Total por unidad Reacción			20 μL

Notas. *En el control negativo de retrotranscripción se reemplaza el SuperScript III RT / Platinum Taq Mix por dos unidades polimerasa. ** En el control negativo de RNA se sustituye el RNA por Agua DEPC. *** P es sustituido para 0.1, 0.3 y 0.5 μM , con ello Z también cambia para cada concentración. **** W es la cantidad de agua para completar los 20 μL de cada reacción.

Por otro lado, en el gen *ACTBL2* se realizó un diseño factorial 3 x 3 con las diferentes condiciones de primers y temperatura, con el cual se generó un mapa de calor de los valores de Cq (ciclo de cuantificación).

Cada punto experimental se corrió en el equipo LightCycler 96 en dupletas y por triplicado con la programación que se indica en la Tabla 4, la cual se ilustra a continuación.

Tabla 4

Programación de las reacciones de qPCR en el equipo LightCycler 96

Proceso	Temperatura	Tiempo	Modo de adquisición	Ciclos
Síntesis de cDNA	50 °C	180 segundos	Ninguna	1
Denaturación Inicial	95 °C	300 segundos	Ninguna	1
Denaturación	95 °C	15 segundos	Ninguna	35
Annealing	T*	30 segundos	Simple	
Extensión Final	40 °C	60 segundos	Ninguna	1
Melting	95 °C	5 segundos	Ninguna	1
	65 °C	60 segundos	Ninguna	
	97 °C	-	5 lecturas continuas / °C	
Cooling	37 °C	30 segundos	Ninguna	1

Nota. T es reemplazado por las temperaturas (54, 57 y 60 °C) que se desea correr el ensayo

Se realizaron corridas electroforéticas en agarosa usando los productos de los ensayos de optimización de qPCR para comprobar el tamaño del producto esperado.

Las condiciones de las electroforesis de agarosa (1.5%) fueron a 100 voltios (V) por 60 minutos y con una concentración de 0.075 μ L/ml de SYBR Safe.

Ensayo de eficiencia de amplificación de los genes *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT*

Con las condiciones optimizadas para cada gen de referencia, se procedió a realizar los ensayos de eficiencia y sensibilidad analítica, utilizando diluciones en serie de la muestra de RNA. Para los genes *ACTB* y *HPRT*, se partió de una concentración de 1ng/ μ L de RNA y se realizaron diluciones en serie 1:10 hasta llegar a una concentración de 1×10^{-4} ng/ μ L. Para el gen *ACTBL2*, las concentraciones de RNA que se usaron para el análisis de sensibilidad analítica fueron 2, 1.2, 0.8, 0.6 y 0.5 ng/uL. En la Tabla 5 se muestra las concentraciones de muestras y diluciones usadas.

Tabla 5

Concentraciones de material genético para el ensayo de sensibilidad analítica

Punto	<i>ACTB</i>	<i>HPRT</i>	<i>ACTBL2</i>
1	1 ng/uL	1 ng/uL	2 ng/uL
2	1×10^{-1} ng/uL	1×10^{-1} ng/uL	1 ng/uL
3	1×10^{-2} ng/uL	1×10^{-2} ng/uL	0.8 ng/uL
4	1×10^{-3} ng/uL	1×10^{-3} ng/uL	0.6 ng/uL
5	1×10^{-4} ng/uL	1×10^{-4} ng/uL	0.5 ng/uL

Se corrieron ensayos de qPCR con las diluciones en serie de RNA y con dos controles negativos. El primer control (control negativo de RNA) consistió en no adicionar RNA y sustituirlo por agua DEPC. El segundo control (control negativo de retrotranscripción) se añadió la polimerasa "GoTaq® G2 Hot Start Taq Polymerase" en lugar del mix de retrotranscriptasa y polimerasa (SuperScript III RT / Platinum Taq Mix). Los ensayos para cada gen se realizaron por duplicado.

Para cada gen se obtuvieron los valores de eficiencia de amplificación, coeficiente de determinación y pendiente, que permitió observar la eficiencia individual del ensayo en cada gen.

Además, se realizó una predicción de las temperaturas de melting esperadas de los productos amplificados de qPCR con la herramienta online “OligoCalc”, tomando en cuenta las concentraciones de primers y la secuencia del producto esperado de cada gen usando el método “Nearest Neighbor” de la herramienta.

Análisis de la estabilidad de los genes *ACTB*, *HPRT* y *ACTBL2*

Una vez optimizados los protocolos de qPCR de los tres genes, se llevó a cabo el análisis de su estabilidad en condiciones experimentales. Para ello se emplearon las muestras de RNA de las células McCoy expuestas a diferentes concentraciones de Ag-Dox NPs (50, 6.75 y 1.68 $\mu\text{g/mL}$) durante 24H y 48H, y la muestra de RNA control (sin exposición). En Tabla 6 se muestran detalles de las muestras de RNA expuestas a las diversas concentraciones.

Tabla 6

*Condiciones experimentales usadas para realizar el análisis de estabilidad en los genes *ACTB*, *HPRT* y *ACTBL2**

N° de condición	Condición a 24 horas de exposición	N° de condición	Condición a 48 horas de exposición
1	Control	8	Control
2	50 $\mu\text{g/mL}$ de Ag-Dox NPs	9	50 $\mu\text{g/mL}$ de Ag-Dox NPs
3	6.75 $\mu\text{g/mL}$ de Ag-Dox NPs	10	6.75 $\mu\text{g/mL}$ de Ag-Dox NPs
4*	1.68 $\mu\text{g/mL}$ de Ag-Dox NPs	11	1.68 $\mu\text{g/mL}$ de Ag-Dox NPs
5	50 $\mu\text{g/mL}$ de Doxiciclina	12	50 $\mu\text{g/mL}$ de Doxiciclina
6	6.75 $\mu\text{g/mL}$ de Doxiciclina	13	6.75 $\mu\text{g/mL}$ de Doxiciclina
7	1.68 $\mu\text{g/mL}$ de Doxiciclina	14	1.68 $\mu\text{g/mL}$ de Doxiciclina

Nota. * La condición experimental número 4 fue excluida de todos los análisis de estabilidad debido a que la calidad del RNA usado no era la óptima

En un ensayo inicial, se corrió un total de 30 ensayos, con las 14 condiciones experimentales para cada gen en dupletas, con sus respectivos 2 controles negativos. Tras una evaluación preliminar, se descartó el uso del gen *ACTBL2* por la falta de especificidad para amplificar el producto, ya que las curvas de melting y amplificación no presentaron el comportamiento esperado, a pesar de realizar previamente la optimización de las condiciones de corrida de qPCR. Los ensayos se continuaron con los genes *ACTB* y *HPRT*, con dos repeticiones adicionales del ensayo, con dupletas para cada punto experimental y un total de tres repeticiones del ensayo para cada gen.

Para conocer el gen más estable se procesaron los valores de Cq obtenidos en los ensayos experimentales usando la herramienta integral avanzada NormFinder. Este software permitió posicionar los genes de referencia desde el más estable hasta el menos estable bajo las condiciones experimentales evaluadas, por medio de un valor de estabilidad arrojado directamente por el software.

Análisis de datos

Las curvas de amplificación, curvas de melting y Cq para los ensayos de optimización, eficiencia y sensibilidad fueron obtenidas mediante corridas de qPCR realizadas en el equipo LightCycler 96 (Roche). Los datos de Cq crudos de los ensayos de estabilidad y porcentajes de eficiencia fueron introducidos en el algoritmo NormFinder v. 0.953 para realizar los análisis de estabilidad. Posteriormente, tanto los datos crudos de los ensayos de optimización y eficiencia, como los datos obtenidos en NormFinder fueron analizados en el programa GraphPad Prism v. 9.4.1.681. Las gráficas estadísticas mostradas en el presente proyecto fueron obtenidas en el mismo programa.

Con el fin de evaluar cómo afecta la eficiencia de amplificación en la determinación de la estabilidad de un gen, se realizaron dos gráficas de los valores de estabilidad. En la primera sin tomar en cuenta los valores de eficiencia de amplificación de cada gen y en la segunda realizando una corrección en base a esta eficiencia.

Capítulo IV: Resultados

Mantenimiento de la línea celular McCoy ATCC CRL-1696

Se obtuvieron pases de la línea McCoy ATCC CRL-1696 con una confluencia del 80% para su posterior extracción de RNA y almacenamiento. La Figura 4 y 5 muestra cómo se observan este tipo de células adherentes bajo un microscopio invertido, en diferentes niveles de confluencia y bajo diferentes aumentos.

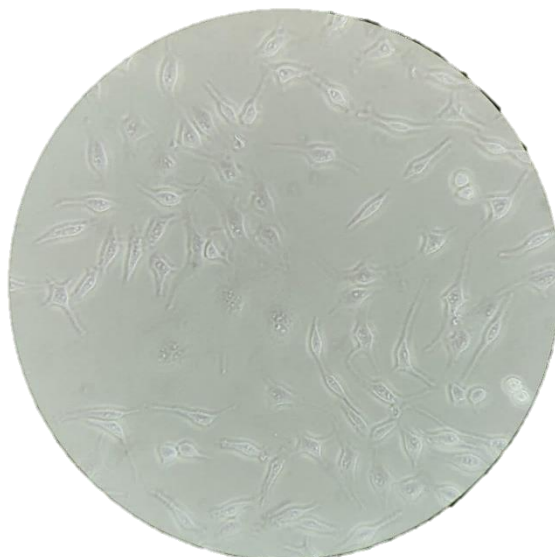
Figura 4

Línea celular McCoy observada bajo microscopio invertido (20x)



Figura 5

Línea celular McCoy observada bajo microscopio invertido (40x)



Extracción de RNA

Se obtuvieron 2 muestras de RNA de la línea McCoy ATCC CRL-1696 con la calidad y concentraciones que se muestran en la Tabla 7. La integridad del RNA se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa. Como se evidencia en la Figura 6, el tratamiento con TURBO DNase permitió eliminar el DNA genómico de las muestras. Las 2 bandas más prominentes superiores corresponden al RNAr eucariota, específicamente, las subunidades ribosomales 18S y 28S.

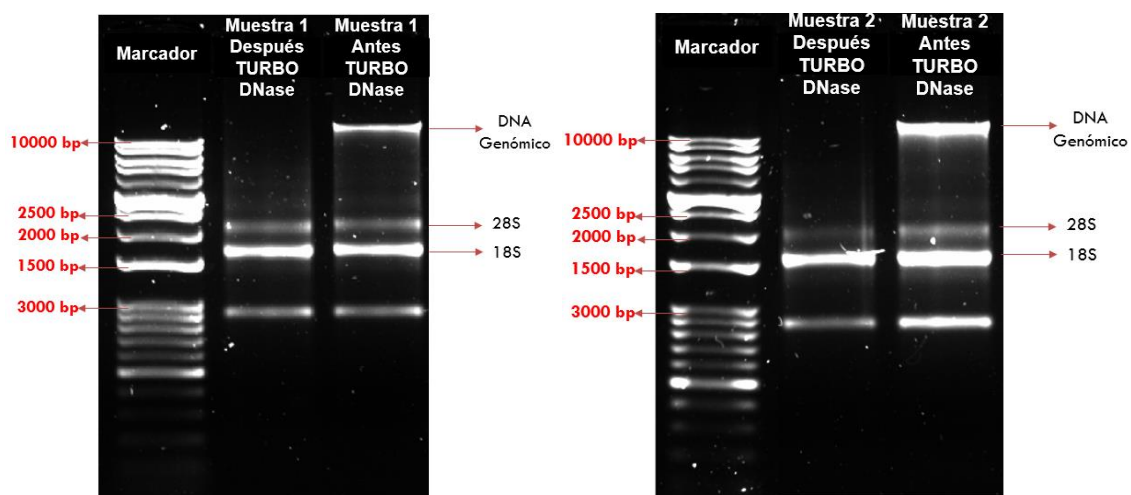
Tabla 7

Calidad y concentración del RNA extraído usado en los ensayos de qPCR

Muestra	Concentración (ng/ μ L)			Radio	Radio
	1er Medición	2da Medición	Promedio	260/280	260/230
Muestra 1	194.1	196.6	195.35	2.02	1.68
Muestra 2	352.5	386.7	369.6	2.01	1.88

Figura 6

Resultado de la evaluación de la integridad del RNA extraído



Nota. Se usó el marcador “1kb Opti-DNA Marker”.

Características de los primers

Mediante la herramienta online “Primer-BLAST”, se obtuvo la temperatura de melting de los primers y con ella se calculó la temperatura de annealing de partida para los ensayos de qPCR de los tres genes (Tabla 8).

Tabla 8

Características de los primers usados para amplificar el gen ACTB, ACTBL2 y HPRT

Gen	Primer	Secuencias	Temperatura de melting (°C)	% GC
ACTBL2	F	ATGGTTGACGATGAGCTGACT	59.4	47.62
	R	GACTCCGTGTTCAATGGGATAC	58.8	50.00
ACTB	F	TGCTCTAGACTTCGAGCAGGAGATG	63.66	52.00
	R	AGCCTCAGGGCATCGGAA	60.69	61.11
HPRT	F	TCAGTCAACGGGGGACATAAAAG	60.56	47.83
	R	GCTTAACCAGGGAAAGCAAAG	57.70	47.62

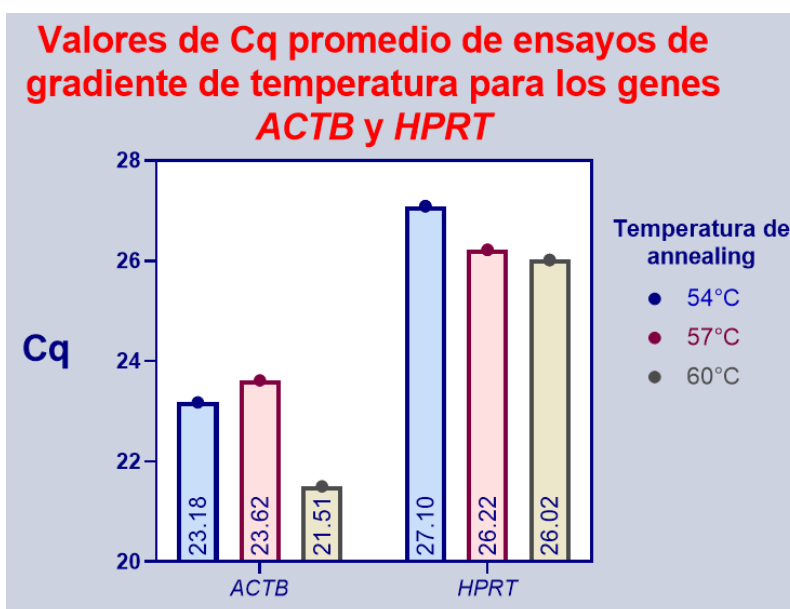
Nota. F - Primer Forward y R - Primer Reverse. Obtenido de: Primer-BLAST

Condiciones óptimas de temperatura de annealing y concentración de primers

Se utilizó el Cq como parámetro en el análisis de las condiciones óptimas de las corridas de qPCR bajo las diferentes condiciones. Para los genes *ACTB* y *HPRT* se realizaron ensayos de dupletas de reacciones a las diferentes temperaturas de annealing (54°C, 57°C y 60°C). Se generó un diagrama de barras de los Cq promedio (Figura 7).

Figura 7

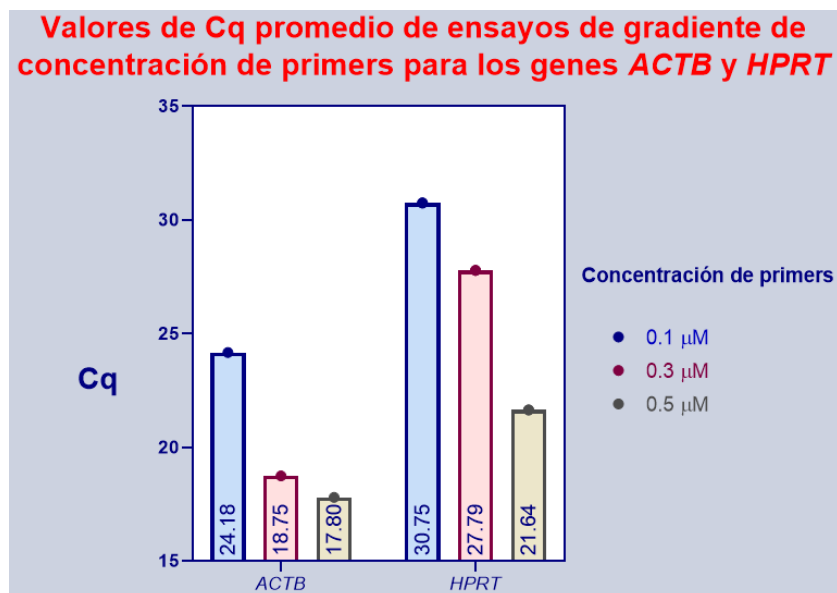
Diagrama de barras de los Cq promedio de ensayos de gradiente de temperatura de annealing para los genes *ACTB* y *HPRT*



Para cada gen se escogió la temperatura de annealing con la que se obtuvo un Cq más temprano y con esta se procedió a realizar ensayos a las diferentes concentraciones de primers (0.1 μ M, 0.3 μ M y 0.5 μ M). Se obtuvo un diagrama de barras de los Cq promedio (Figura 8). Se observó que las mejores condiciones para los genes *ACTB* y *HPRT* son: 60°C como temperatura de annealing y 0.5 μ M de concentración de primers.

Figura 8

Diagrama de barras de los C_q promedio de ensayos de gradiente de concentración de primers para los genes *ACTB* y *HPRT*

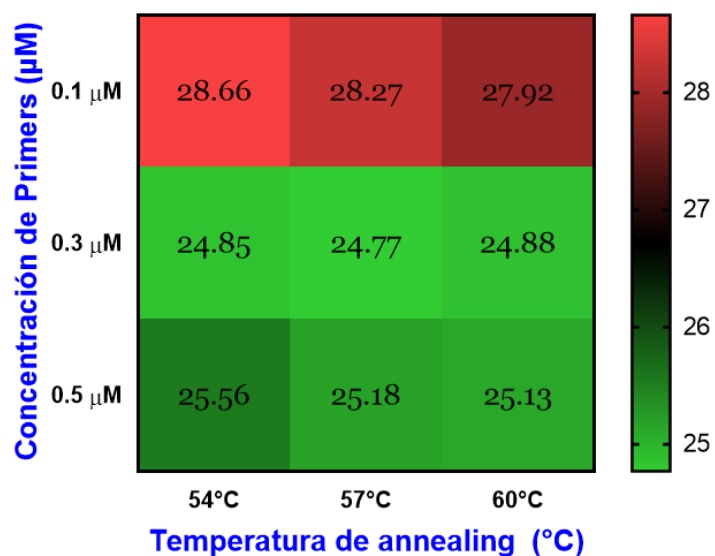


Para el gen *ACTBL2* se realizó un diseño factorial 3x3 (temperatura vs concentración de primers) y se obtuvo el mapa de calor con los C_q promedio de cada interacción de las condiciones (Figura 9).

Figura 9

Mapa de calor de los C_q promedio para el gen *ACTBL2*

Valores de C_q promedio para el gen *ACTBL2*

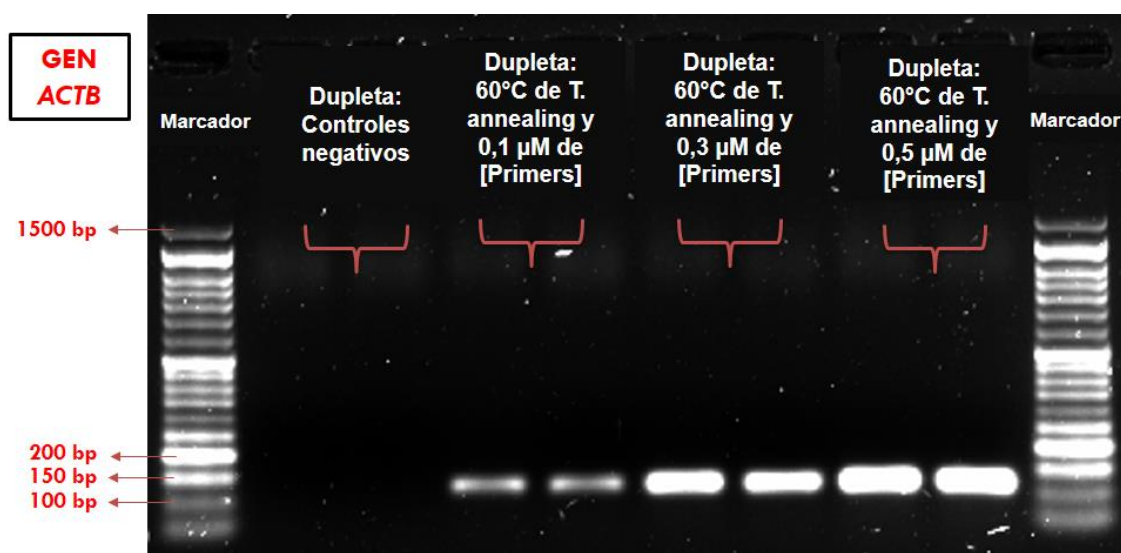


Este mapa de calor muestra que los mejores valores de Cq promedio son aquellos que tienen un verde más claro, ya que está representando valores de Cq más tempranos. Por otro lado, los valores más tardíos de Cq se representa con el color rojo. Por lo antes expuesto, las mejores condiciones para el gen *ACTBL2* son 57°C como temperatura de annealing y 0.3 μM de concentración de primers.

En las corridas electroforéticas se obtuvo el tamaño esperado de los fragmentos de DNA obtenidos por qPCR. Se observa en las Figuras 10, 11 y 12 los productos de amplificación de los genes *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT* con un tamaño de 228, 124 y 131 bp, respectivamente. Para los genes *ACTB* y *HPRT* se realizó una corrida de electroforesis a la temperatura óptima de 60°C con las 3 concentraciones de primers diferentes. Mientras que para el gen *ACTBL2* se realizó una corrida única para las mejores condiciones implementadas para observar la presencia del producto específico de amplificación.

Figura 10

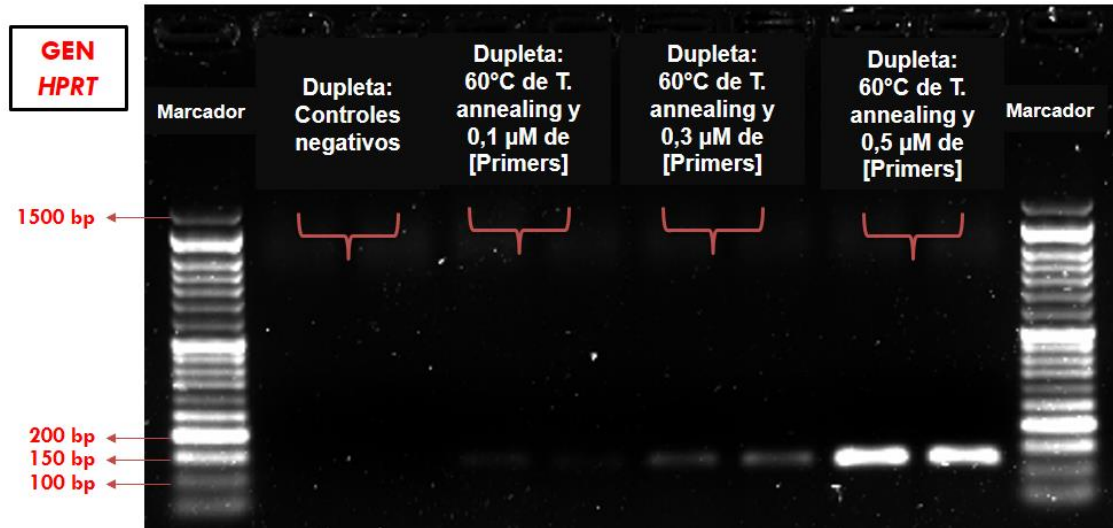
Productos de qPCR para el gen ACTB, a 60°C en las 3 concentraciones de primers diferentes



Nota. Se usó el marcador "100bp Opti-DNA Marker".

Figura 11

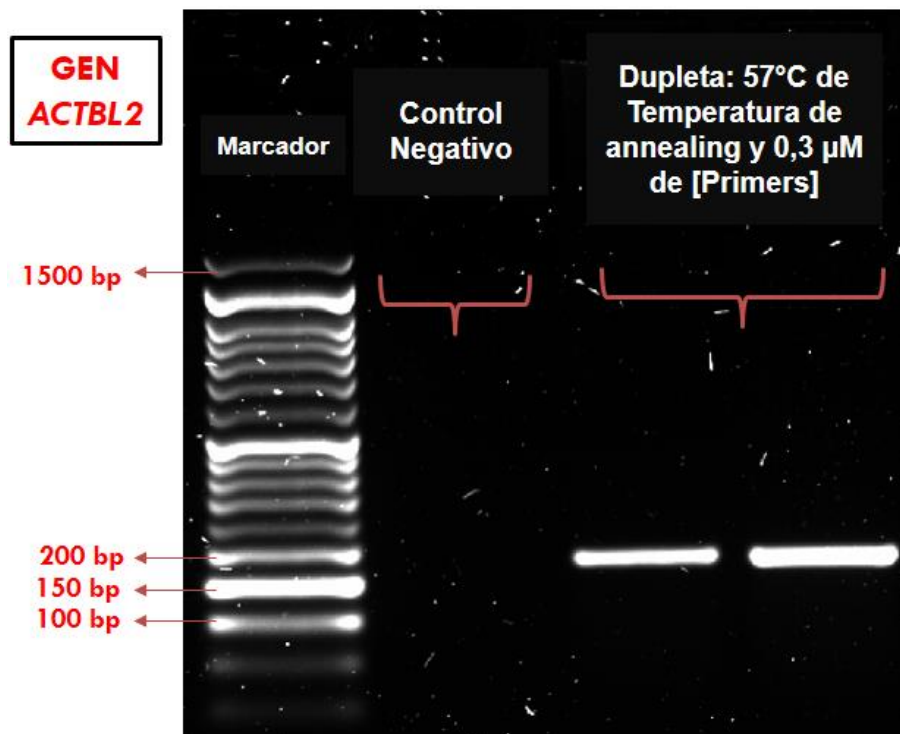
Productos de qPCR para el gen *HPRT*, a 60°C en las 3 concentraciones de primers diferentes



Nota. Se usó el marcador "100bp Opti-DNA Marker".

Figura 12

Producto de qPCR para el gen *ACTBL2*, en sus condiciones óptimas



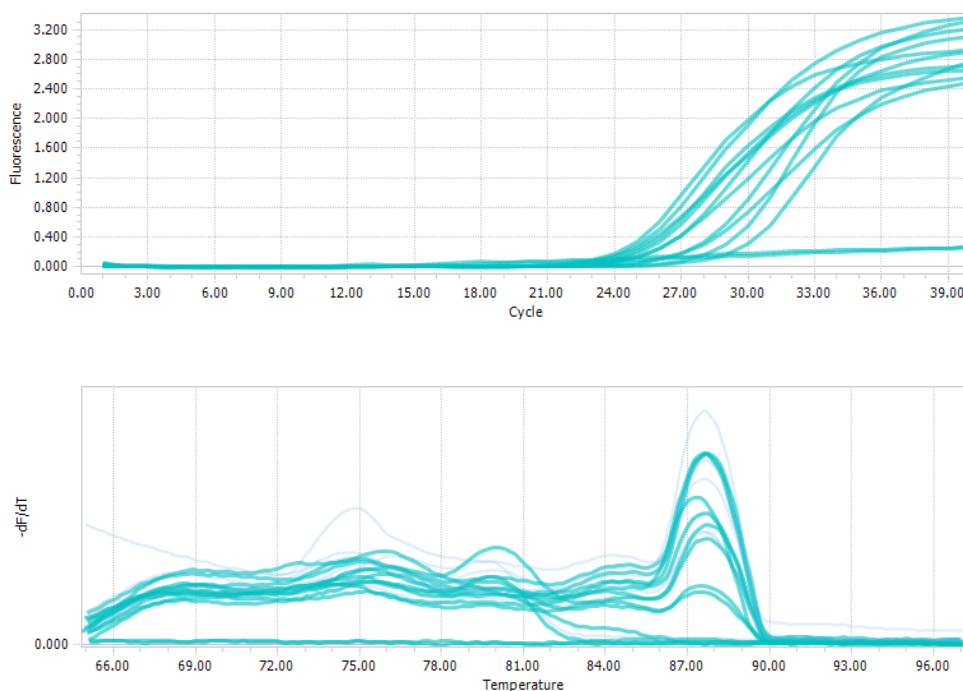
Nota. Se usó el marcador "100bp Opti-DNA Marker".

Ensayo de eficiencia de amplificación de los genes *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT*

En los ensayos de eficiencia de amplificación, se obtuvieron curvas de amplificación y curvas de melting para cada gen (Figuras 13, 14 y 15). Se observó que en todos los ensayos de eficiencia no existe la amplificación de los controles negativos y no arrojan Cq tardíos.

Figura 13

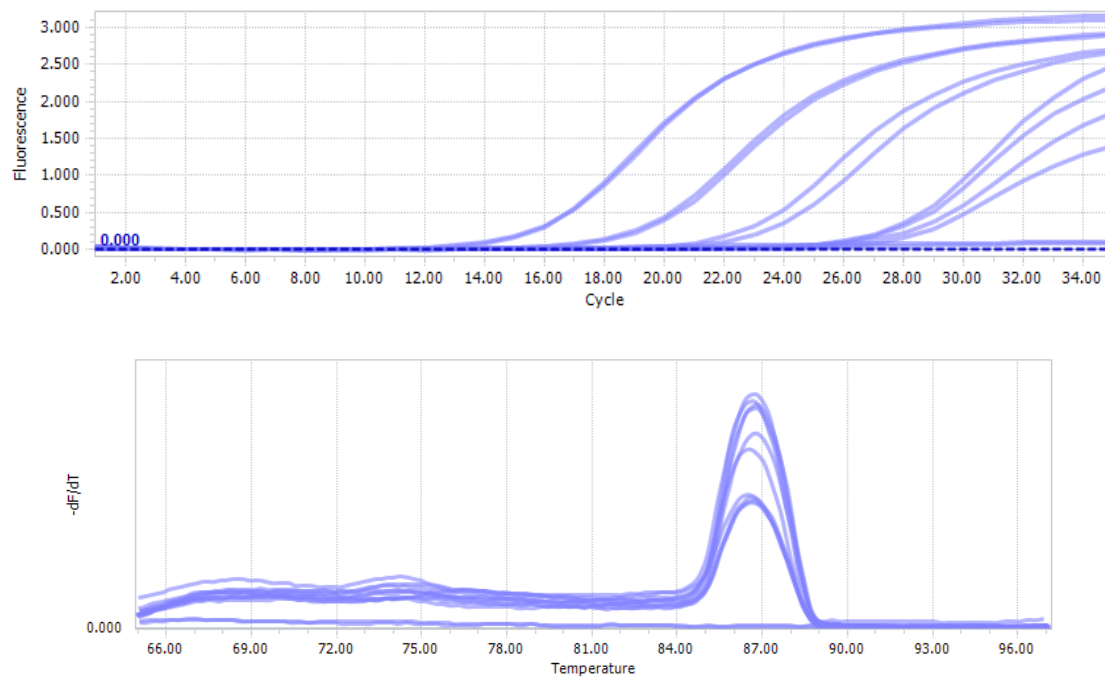
Curvas de amplificación y de melting para el gen *ACTBL2*



Nota. La primera curva corresponde a las curvas de amplificación del ensayo de eficiencia de amplificación, la segunda corresponde a las curvas de melting del mismo ensayo. Ambas curvas corresponden al ensayo en el gen *ACTBL2*.

Figura 14

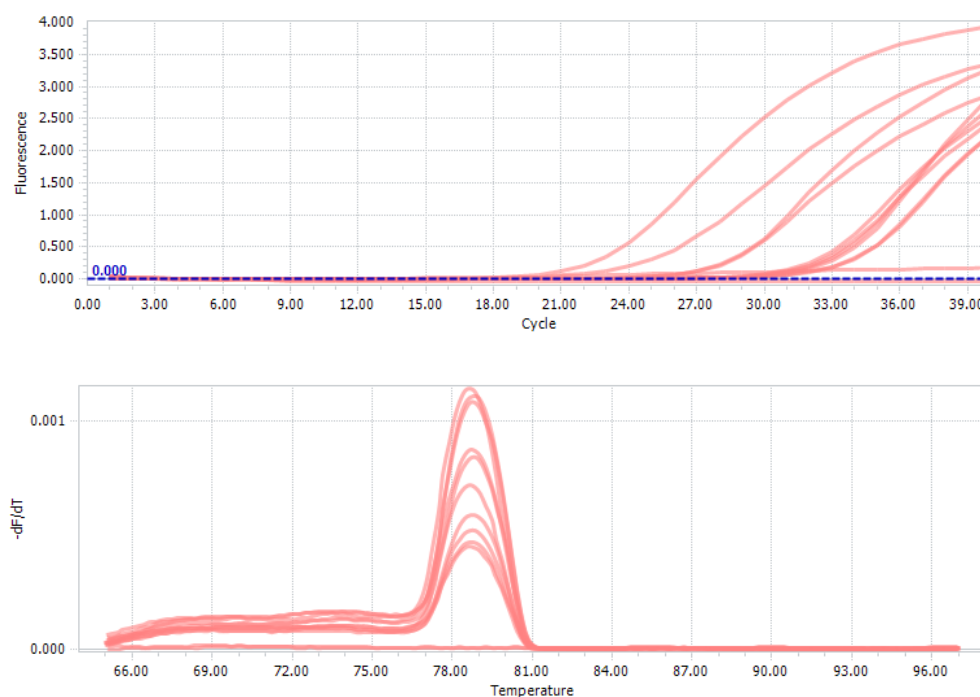
Curvas de amplificación y de melting para el gen *ACTB*



Nota. La primera curva corresponde a las curvas de amplificación del ensayo de eficiencia de amplificación, la segunda corresponde a las curvas de melting del mismo ensayo. Ambas curvas corresponden al ensayo en el gen *ACTB*.

Figura 15

Curvas de amplificación y de melting para el gen HPRT



Nota. La primera curva corresponde a las curvas de amplificación del ensayo de eficiencia de amplificación, la segunda corresponde a las curvas de melting del mismo ensayo. Ambas curvas corresponden al ensayo en el gen *HPRT*.

La herramienta online “OligoCalc” calculó las temperaturas de melting predichas de los productos amplificados resultantes de qPCR para cada gen. En la Tabla 9 se indica las temperaturas de melting obtenidas con esta herramienta y las obtenidas por el equipo LightCycler 96, usando la opción de análisis “Tm calling”. Se observa una concordancia en valores predichos y los obtenidos en los ensayos.

Tabla 9

Valores de la temperatura de melting (Tm) de los productos de cada gen de referencia

Gen	Longitud del producto (bp)	Tm calculada por OligoCalc* (°C)	Tm calculada por LightCycler 96 (°C)
<i>ACTBL2</i>	228	86.32	88.071
<i>ACTB</i>	124	87.7	86.783
<i>HPRT</i>	131	79.08	79.102

Nota. *Herramienta online desarrollada por Kibbe (2007)

La Tabla 10 indica los valores de Cq promedio y el logaritmo de las concentraciones de RNA usadas en las regresiones lineales para los ensayos de eficiencia de amplificación.

Las Figuras 16, 17 y 18 muestran las curvas estándar para cada gen, obtenidas mediante regresión lineal. Se realizaron 5 diluciones en serie del material genético de partida para cada gen. El factor de dilución para los genes *ACTB* y *HPRT* fue 1:10, mientras que para el *ACTBL2* se realizó diluciones desde 2 ng/μL hasta 0.5 ng/μL. Resultados preliminares (no abordados con detalles en este estudio) muestran que bajo 0.1 ng/μL existe baja especificidad en la amplificación del producto del gen

ACTBL2 con los primers usados. Los detalles de estas diluciones se muestran en la Tabla 5.

Tabla 10

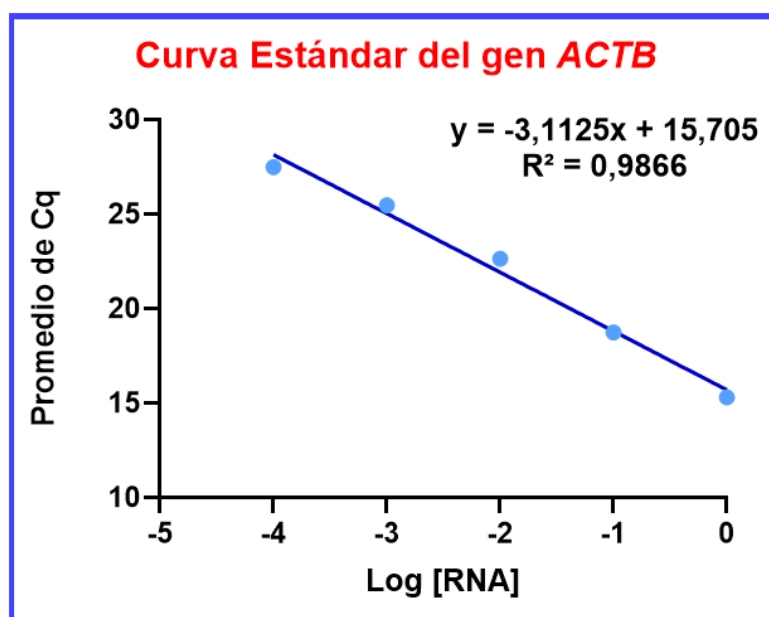
Valores de *Cq* promedio y concentración de RNA correspondientes al ensayo de eficiencia de amplificación de cada gen

ACTB		HPRT		ACTBL2	
Log[RNA]	Cq	Log[RNA]	Cq	Log [RNA]	Cq
0	15.30	0	21.83	0.301	23.91
-1	18.74	-1	25.40	0.079	24.79
-2	22.65	-2	31.80	-0.097	25.49
-3	25.48	-3	32.94	-0.222	25.53
-4	27.49	-4	35.51	-0.301	25.60

Nota. Los valores de *Cq* son promedio de las dupletas realizadas

Figura 16

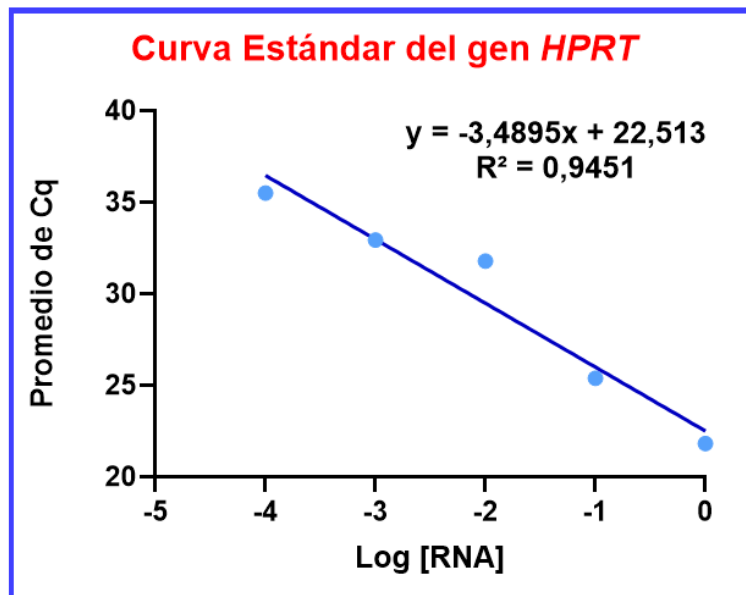
Curva estándar para el gen *ACTB*



Nota. Se realizó una regresión lineal con el *Cq* promedio y el Log[RNA] mostrado en la Tabla 10, con ello se construye la curva estándar para el gen *ACTB*.

Figura 17

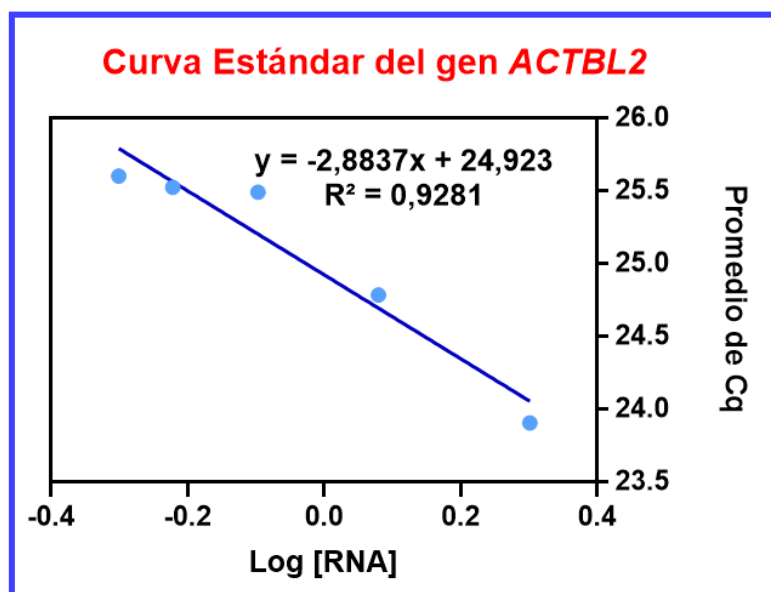
Curva estándar para el gen *HPRT*



Nota. Se realizó una regresión lineal con el Cq promedio y el Log[RNA] mostrado en la Tabla 10, con ello se construye la curva estándar para el gen *HPRT*.

Figura 18

Curva estándar para el gen *ACTBL2*



Nota. Se realizó una regresión lineal con el Cq promedio y el Log[RNA] mostrado en la Tabla 10, con ello se construye la curva estándar para el gen *ACTBL2*.

La curva estándar proporcionó una ecuación para cada gen, de donde se tomaron los valores de pendiente (m) y el coeficiente de determinación (R^2), para calcular los valores de eficiencia de amplificación para los genes *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT* (Tabla 11).

Tabla 11

Valores de la pendiente, coeficiente de determinación (R^2) y % de eficiencia, obtenidos por la curva estándar de cada gen

Gen	Pendiente	R^2	% de Eficiencia
<i>ACTBL2</i>	-2.8837	0.9281	122.2 %
<i>ACTB</i>	-3.1125	0.9866	109.5 %
<i>HPRT</i>	-3.4895	0.9451	93.5 %

Nota. El porcentaje de eficiencia de amplificación fue calculado usando la Ecuación 1

Análisis de la estabilidad de los genes *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT*

Se realizó un análisis de la estabilidad de los genes de la línea celular McCoy ATCC CRL-1696 expuesta a diferentes concentraciones de Ag-Dox NPs (50, 6.75 y 1.68 $\mu\text{g/mL}$) y en dos tiempos de exposición (durante 24 y 48 horas de exposición) ATCC CRL-1696. Se excluyó a la muestra de RNA expuesta por 24 horas a una concentración de 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ debido a que la calidad del material genético no fue óptima.

Se determinaron los valores de estabilidad de los genes de referencia usando el software NormFinder. Los resultados iniciales se realizaron únicamente con los Cq crudos de los ensayos de estabilidad (Tabla 12). Se obtuvieron los valores de estabilidad que se muestran en la Figura 19, donde se evidencia que el gen de referencia más estable es *ACTB*, seguido de *HPRT* y por último *ACTBL2*.

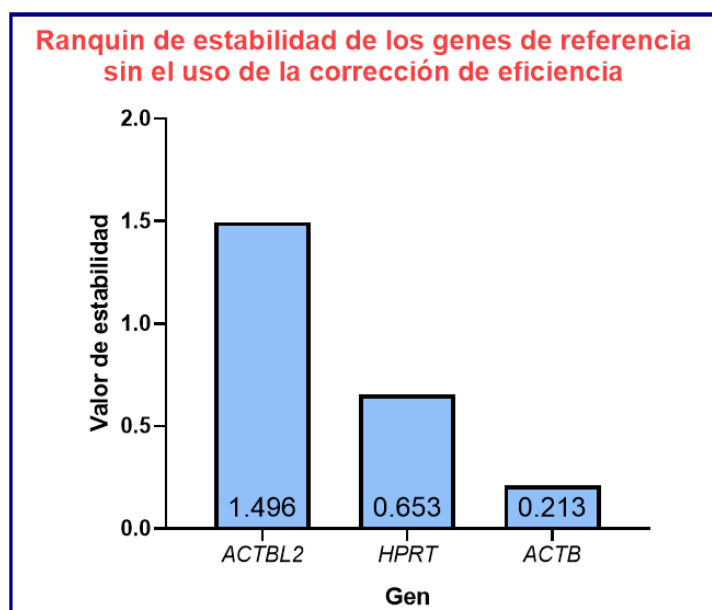
Tabla 12

Valores de Cq promedio correspondientes a los ensayos de estabilidad de cada gen

Condición	<i>ACTB</i>	<i>HPRT</i>	<i>ACTBL2</i>
Control 24 horas	16.42	21.46	27.83
Control 48 horas	15.97	20.62	28.16
1.68 µg/mL de Ag-Dox NPs-24h	19.12	23.85	33.01
1.68 µg/mL de Ag-Dox NPs-48h	18.37	22.83	29.44
6.75 µg/mL de Ag-Dox NPs-24h	18.79	25.03	31.33
6.75 µg/mL de Ag-Dox NPs-48h	16.36	21.01	31.99
50 µg/mL de Ag-Dox NPs-48h	16.15	20.88	32.90
1.68 µg/mL de Doxiciclina-24h	20.07	25.53	31.54
1.68 µg/mL de Doxiciclina-48h	17.03	21.34	32.89
6.75 µg/mL de Doxiciclina-24h	17.23	21.76	32.80
6.75 µg/mL de Doxiciclina-48h	17.01	21.13	32.88
50 µg/mL de Doxiciclina-48h	20.18	25.01	32.12
50 µg/mL de Doxiciclina-48h	17.35	21.11	31.02

Figura 19

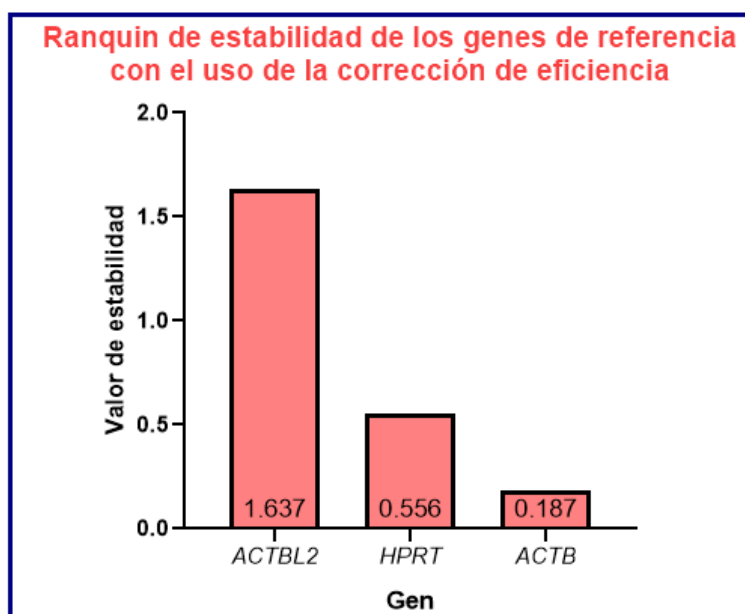
Ranquin de estabilidad de los genes de referencia sin el uso de la corrección de eficiencia



También se obtuvieron los valores de estabilidad de los genes de referencia realizando una corrección de los Cq usando los porcentajes de eficiencia obtenidos de los ensayos de sensibilidad. En la Figura 20 se evidencia que los valores de estabilidad difieren de los observados cuando se asume una eficiencia del 100%, pero no se altera el orden de estabilidad de los genes. Se obtuvo que el gen candidato de referencia más estable luego de la corrección por eficiencia es *ACTB*, seguido de *HPRT* y por último *ACTBL2*.

Figura 20

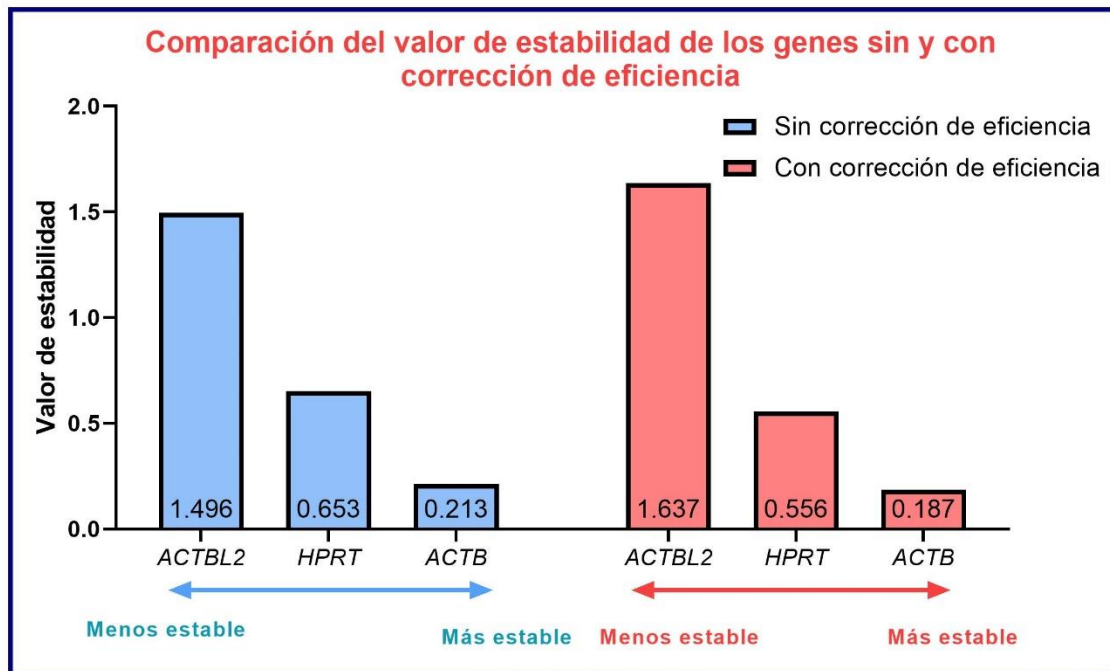
Ranquin de estabilidad de los genes de referencia con el uso de la corrección de eficiencia



Se realizó una comparación de los ránquines de estabilidad de los genes de referencia obtenidos con y sin ajuste por eficiencia como corrección de los Cq. La Figura 21 muestra la diferencia de los resultados cuando se usa la corrección de eficiencia. El gen de referencia más estable en los dos casos de análisis (sin y con corrección de eficiencia) fue *ACTB*, seguido de *HPRT* y por último *ACTBL2*.

Figura 21

Comparación del valor de estabilidad de los genes sin y con corrección de eficiencia



Capítulo V: Discusión

Mantenimiento de la línea celular McCoy ATCC CRL-1696

Para mantener una línea celular es necesario realizar pases o congelar las células antes de que exista confluencia cercana al 100%. Cuando no se realiza un subcultivo de células confluentes se produce reducción del índice mitótico, lo cual lleva a la muerte celular (K. Phelan & May, 2015). En el cultivo celular, es necesario tener una confluencia al menos del 75% como valor óptimo para realizar pases celulares (M. C. Phelan, 2007). La confluencia se considera como un parámetro de calidad cuando se hace ensayos basados en cultivo celular, donde se pueden ver parámetros relacionados a la salud y estabilidad de la línea celular usada (Haenel & Garbow, 2014).

Se obtuvo confluencias entre 70 y 80% de todos los pases usados para realizar la extracción del RNA total. La confluencia es un factor importante a la hora de realizar un análisis de expresión génica. Cuando se usa una línea celular con una confluencia menor a la recomendada existe una diferente regulación individual de los genes lo cual puede afectar los análisis posteriores (Ruutu et al., 2004). Una alta confluencia, cercana al 100%, también exhibe una expresión génica diferente, inclusive en genes relacionados a la actina (Pavel et al., 2018). Por ello es importante el correcto manejo de líneas celulares para determinar la estabilidad de un gen y posteriormente para el análisis de expresión génica.

Extracción de RNA

La extracción del RNA es un paso muy importante para realizar qPCR debido a que la baja calidad puede alterar los resultados. El rendimiento de una qPCR es afectado de manera directa por las impurezas encontradas en la extracción de RNA (Fleige & Pfaffl, 2006). Por ello, la medición de la calidad y el análisis de integridad son el primer paso para llevar a cabo análisis de expresión génica (Vermeulen et al., 2011).

En el análisis de la integridad del RNA, después de haber eliminado el DNA genómico, se obtuvo dos bandas correspondientes al RNA ribosomal 28S y 18S. Las bandas encontradas muestran que no existe degradación, ya que se encuentran íntegras.

La cuantificación del RNA usando mediciones de la absorbancia UV a 230, 260 y 280 nm permite cuantificar y detectar contaminantes presentes en el RNA. Las relaciones entre las distintas longitudes de ondas se expresan como ratios, el ratio 260/280 debe tener un valor cercano a 2, mientras que el valor del ratio 260/230 tiene que ser superior a 1.4 (Shen, 2019). Los promedios de los ratios 260/280 y 260/230 de las muestras fueron 2.01 y 1.78, respectivamente, esto indica que estuvieron dentro del rango óptimo. Se obtuvo una concentración de 195.35 y 369.6 ng/ μ L, respectivamente para cada muestra.

Características de los primers

El diseño de los primers es uno de los factores más importantes en los distintos tipos de PCR, debido a que influyen directamente en la amplificación de una secuencia genética (Guha, 2019). Cuando los primers no han sido diseñados de manera eficiente pueden llegar a generarse primer-dimers producto de la PCR (El-Fahmawi, 2013). En qPCR, para realizar una distinción entre primer-dimers y el producto amplificado se realizan los análisis de las curvas de melting (Pfaffl, 2004). Para qPCR se recomienda que los primers sean diseñados de tal forma que su producto de amplificación esté entre 80 y 200 pb (Thornton & Basu, 2011). Se ha encontrado que la longitud del amplicon de qPCR puede llegar a medir hasta 250 pb sin afectar la eficiencia del ensayo (Flaga et al., 2021). Todos los productos de amplificación usados en el presente proyecto están en el rango de longitud que pueden ser usados para qPCR, ya que los amplicones de los genes *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT* tuvieron un tamaño de 228, 124 y 131 bp, respectivamente.

Una de las características importantes de los primers es el porcentaje de guanina-citosina (GC) presente, el valor debe ser estar entre 20 y 80% (Guha, 2019). Los primers tuvieron un porcentaje GC entre 47.62 y 61.11%, lo cual indica que está dentro del rango recomendable. Usando este parámetro es posible calcular la temperatura de melting de cada primer, posteriormente se realiza promedio de estas temperaturas y restando 5°C se puede estimar la temperatura teórica de annealing para las corridas de qPCR (Lorenz, 2012).

Condiciones óptimas de temperatura de annealing y concentración de primers

La qPCR tiene varios parámetros que pueden ser optimizados con la finalidad de obtener mejores eficiencias. Dentro de estos factores se encuentra la concentración de primers, la temperatura de annealing, la concentración de sales, velocidad de rampa, cantidad de material genético usado, entre otros (Lorenz, 2012). Se realizó un análisis de las condiciones óptimas para los ensayos de qPCR, los factores analizados fueron la temperatura de annealing y concentración de primers. La cantidad de material genético también fue un factor analizado preliminarmente pero no optimizado. En este se observó que usar una concentración final de 1ng/μL permite realizar adecuadamente los análisis de eficiencia de amplificación.

Mubarak et al., (2020) señala que la temperatura de annealing de una PCR óptimas son entre 50 y 65 °C. Las temperaturas de annealing que se probaron en los tres genes fueron a 54, 57 y 60°C, todas dentro del rango recomendado. Por otro lado, la concentración de primers para una PCR está entre 0.1 y 1 μM (Mubarak et al., 2020). Sin embargo, el kit de qPCR utilizado (SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit) recomienda concentraciones de primers entre 0.1 y 0.5 μM, por lo que se evaluó la qPCR en las concentraciones de 0.1, 0.3 y 0.5 μM.

Para los genes *ACTB* y *HPRT*, el primer factor analizado fue la temperatura de annealing a 54, 57 y 60°C, como se indica en los diagramas de barras de la Figura 7. Se puede observar que la temperatura de annealing en la cual el Cq es más temprano

es 60°C para los dos genes. Posteriormente, se realizó el análisis para encontrar la mejor concentración de primers a 60°C, en los dos genes. Como se evidencia en la Figura 8, el Cq más temprano para el gen *ACTB* fue a 17.80 y para el gen *HPRT* fue 21.64, ambos a una concentración de 0.5 µM. Los valores de Cq bajos indican la presencia de mayor cantidad de material genético (Rabaan et al., 2021). El valor de Cq no debe superar 40, debido a que estos valores exhiben implícitamente una eficiencia disminuida (Bustin et al., 2009). Los resultados indicaron que no se encontró ningún valor de Cq mayor a 40 para ningún gen, en caso de encontrarse debería ser descartado en primera instancia por ser considerado un Cq tardío.

Para el gen *ACTBL2*, se realizó un primer análisis en PCR punto final, bajo temperaturas de annealing preliminares (51°C, 54°C y 57°C) y concentración de primers preliminares (0.3, 0.5 y 0.7 µM). Este análisis preliminar se realizó por partes, como en los genes *ACTB* y *HPRT*, pero no se encontró un punto óptimo de amplificación del producto deseado. Por ello se procedió a realizar un análisis de los dos factores al mismo tiempo (Figura 9), donde se observó un valor de Cq de 24.77 bajo la temperatura de annealing de 57°C y concentración de primers de 0.3 µM. Para los análisis de eficiencia de amplificación es necesario eludir el uso de Cq altos, es decir, se debe trabajar con el Cq más temprano (Ruiz-Villalba et al., 2021, p.).

Las corridas de electroforesis permiten ver el tamaño y la cantidad de producto examinado, en función de la intensidad del brillo de las bandas resultantes (Wittmeier & Hummel, 2022). Para los genes *ACTB* y *HPRT*, se realizó una corrida electroforética para verificar el tamaño de los respectivos amplicones (Figuras 10 y 11). En este gel de agarosa se usaron las muestras resultantes del ensayo mostrado en la Figura 8, es decir, las condiciones fueron a 60°C de temperatura de annealing con diferentes concentraciones de primers. De acuerdo a la intensidad de las bandas se observa que la mejor condición en relación a concentración de primers es 0.5 µM. Con ello se

confirma que las condiciones óptimas en estos genes son 60°C de temperatura de annealing y 0.5 μ M de concentración de primers.

Mediante un gel de agarosa se corrieron los productos de qPCR obtenidos en los ensayos de optimización de qPCR para todos los genes, esto con el fin de comprobar su integridad y tamaño (Wittmeier & Hummel, 2022). Además, un gel de electroforesis permite visualizar si existen productos no específicos o primer-dimers (Johnston et al., 2019). En las corridas de electroforesis mostradas en las Figuras 10, 11 y 12 se evidencia que no existe la presencia de productos no específicos o primer-dimers en ninguna banda.

Ensayo de eficiencia de amplificación de los genes *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT*

Las curvas de amplificación indican el aumento de la señal de fluorescencia detectada a lo largo de un ensayo de qPCR. Esta gráfica presenta 4 fases consecutivas: fase de referencia, fase exponencial, fase lineal y fase de meseta (Y. Zhang et al., 2020). Las curvas de amplificación para los tres genes muestran las 3 primeras fases de la curva (Figuras 13, 14 y 15). Algunas diluciones no muestran la fase de meseta, esto indica que el tiempo de duración del ensayo no es lo suficientemente largo y que debería extenderse para visualizar todas las fases de la curva. Sin embargo, es un comportamiento típico de las diluciones más bajas de los ensayos de eficiencia de amplificación (Scholtes et al., 2012).

Los análisis de las curvas de melting permiten distinguir si en un ensayo de qPCR se encuentran productos únicos o existe una contaminación del ensayo como productos no específicos o primer-dimers (Thompson, 2010). Las curvas de melting permiten obtener una temperatura a la cual un amplicón específico se disocia totalmente. El programa OligoCal realiza una predicción de la temperatura de melting de un producto de qPCR mediante el método del Nearest Neighbor. Este método genera una temperatura de melting teórica en función de cada par de bases y las que se encuentran adyacentes a estas (SantaLucia, 1998). Las temperaturas de melting

predichas por OligoCalc fueron de 87.7°C para *ACTB*, 79.08°C para *HPRT* y 86.32°C para *ACTBL2*. Estos valores son similares a los valores obtenidos en el análisis de melting realizado por el software Lightcycler 96 Sw del Sistema LightCycler 96, las cuales fueron 88.071°C para *ACTBL2*, 86.783°C para *ACTB* y 79.102°C.

La presencia de productos amplificados específicos se distingue cuando en el análisis de curvas de melting solo se presenta un pico estrecho (Pfaffl, 2004), es decir solo se devela una temperatura de melting. Si se obtiene más de una temperatura puede inferirse la presencia de productos inespecíficos o primer-dimers (Ruijter et al., 2019), (Ruiz-Villalba et al., 2017). En las curvas de melting de los genes *ACTB* y *HPRT*, se encontró un solo pico estrecho que corresponde a su amplicón respectivo. Por otro lado, el ensayo con el gen *ACTBL2* muestra la existencia del pico esperado del amplicón, antecedido por varios picos amplios. En *ACTBL2*, las concentraciones superiores a 1 ng/μL muestran picos estrechos en las temperaturas esperadas en sus curvas de melting. Por ello, se plantea que la sensibilidad de este ensayo, con las condiciones analizadas, comienza a partir de 1 ng/μL de RNA como concentración final de la reacción.

La curva estándar es un método que permite calcular la eficiencia de amplificación que tiene un ensayo de qPCR en un gen específico (Svec et al., 2015). Para los genes *ACTB* y *HPRT*, se obtuvieron valores de Cq que no superaron los 30 ciclos. Por otro lado, el gen *ACTBL2* presentó valores de Cq de hasta 33. El uso de valores de Cq tardíos presentan resultados menos confiables, el ciclo máximo recomendable es de 35 (Q. Zhang et al., 2015). Todos los valores de Cq obtenidos estuvieron dentro del rango que se puede usar para obtener una curva estándar, aunque los Cq de *ACTBL2* presentaron Cq cercanos al límite recomendable de uso, es decir, 35 ciclos.

Para obtener una eficiencia de amplificación del 100% en un ensayo de qPCR, la curva estándar tiene una pendiente de -3.32 (Biosystems, 2004). No obstante, el

rango recomendable de eficiencia es de 90-110%, donde corresponden los valores de pendientes de -3.58 y -3.10, respectivamente (Bivins et al., 2021). Si la eficiencia no se ajusta al intervalo esperado, es necesario realizar una optimización de las condiciones experimentales del ensayo de qPCR (Rogers-Broadway & Karteris, 2015). En la Tabla 11 se observa que los genes *ACTB* y *HPRT* presentaron eficiencias de amplificación que están dentro del rango óptimo. El gen *ACTB* tuvo una eficiencia de amplificación de 109.5% debido a su pendiente de -3.1125. El gen *HPRT* presentó una eficiencia de 93.5% por su pendiente de -3.4895.

Por otro lado, el gen *ACTBL2* presentó un valor de pendiente fuera del rango óptimo. Este gen tuvo una eficiencia de amplificación de 122.2%, en función de su pendiente que presentó un valor de -2.8837. Un valor de eficiencia de amplificación que sobrepasa el rango recomendado puede deberse a la presencia de primer-dimers (El-Fahmawi, 2013). Es posible que la presencia de primer-dimers provocaron que la eficiencia de amplificación encontrada supere al 110%, por ello es importante el diseño de los primers para evitar la formación de estas estructuras.

Se necesitan mínimo 5 puntos para realizar la curva estándar (Agilent Technologies, Inc, 2012). Los puntos usados para graficar la curva estándar deben estar relacionados entre sí, por ello el valor del coeficiente de determinación (R^2) debe ser superior a 0.9. Se recomienda que los valores de R^2 sean superiores a 0.98 para que se demuestre una mejor precisión en el ensayo (Bivins et al., 2021; Eurogentec, 2004). En los tres genes se encontraron valores superiores a 0.9, lo que indica que existe relación entre los puntos de las tres curvas estándar. En el caso de la curva del gen *ACTB*, se obtuvo un R^2 superior a 0.98.

Análisis de la estabilidad de los genes *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT*

La expresión génica depende de varios factores como la calidad e integridad del material genético usado, el diseño de primers, la eficiencia de amplificación del ensayo de qPCR, las sondas usadas en la detección de fluorescencia, la estabilidad

de los genes de referencia usados, entre otros (Rocha et al., 2016). Los genes de referencia son usados como controles comparativos para realizar análisis de cuantificación relativa cuando se analiza expresión de genes en condiciones experimentales (Schaefer et al., 2010). Es importante realizar una adecuada identificación de un gen o grupo de genes estables bajo las diferentes condiciones experimentales (Dheda et al., 2004; X. Wang et al., 2016). La estabilidad de los genes se evalúa mediante ensayos de qPCR en las muestras sometidas a todos los tratamientos, una vez optimizados los protocolos y obtenida la eficiencia para cada gen (Wan et al., 2017).

NormFinder mide la variabilidad de la expresión génica usando un análisis de la varianza del Cq, el resultado de esta herramienta indica que el gen más estable exhibe un valor de estabilidad más pequeño. Además, esta herramienta integral permite obtener un valor numérico llamado valor de estabilidad, este valor es calculado en función de la varianza intra y extragrupo (Andersen et al., 2004). Para que NormFinder realice un correcto análisis de estabilidad es necesario usar 3 genes como mínimo y al menos 8 condiciones experimentales distintas (Andersen et al., 2004). En el presente trabajo se realizó el análisis en 3 genes (*ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT*) y en 13 condiciones experimentales, cumpliendo así los requerimientos mínimos del software utilizado.

Los análisis en NormFinder se realizaron con y sin tomar en cuenta la eficiencia de amplificación de cada gen. Sin el ajuste por eficiencia en el cálculo, se obtuvieron valores de estabilidad de 1.496 para *ACTBL2*, 0.653 para *HPRT* y 0.213 para *ACTB*. Por otro lado, usando la eficiencia para el cálculo, los valores de estabilidad fueron 1.637 para *ACTBL2*, 0.556 para *HPRT* y 0.187 para *ACTB*. La eficiencia de amplificación de un ensayo de qPCR es un valor importante para calcular los valores de estabilidad debido a que los Cq son dependientes de la eficiencia obtenida (Ruijter et al., 2021). Los valores de estabilidad que arroja NormFinder

indican la variabilidad genética que existe en un gen ante las condiciones experimentales, por lo tanto, cifras bajas corresponden al gen más estable (Andersen et al., 2004). El gen más estable fue *ACTB* en los análisis sin y con corrección por eficiencia. Mientras que el gen *HPRT* fue el segundo, de igual forma, para los dos tipos de análisis. Estos dos genes presentaron un perfil de variabilidad genética menor con la corrección por eficiencia, debido a que sus eficiencias de amplificación están dentro del rango deseado. Por el contrario, el gen *ACTBL2* mostró ser el menos estable en los dos análisis y aumento su variabilidad genética cuando se usó la corrección por eficiencia.

Los valores de estabilidad que maneja NormFinder son datos que indican la variabilidad de la expresión génica presente en distintos genes candidatos a ser el más estable. Para realizar el análisis, el modelo necesita al menos 3 genes para poder comparar entre ellos la estabilidad. Por ello, los valores que presenta la herramienta se basa únicamente en la condición experimental analizada (Andersen et al., 2004). Un alto valor de estabilidad indica que la variabilidad en las condiciones es también elevada, por ello el gen *ACTBL2* es un gen que exhibe una alta variabilidad y su uso como gen de referencia en las condiciones experimentales del estudio no se recomienda.

Köhler y colaboradores (2020) realizaron un análisis de la estabilidad de genes de referencia para validar cual es el más estable utilizando NormFinder. Esta herramienta indicó que el gen más estable en sus condiciones experimentales presentó un valor de estabilidad de 0.34, por otro lado, el gen menos estable tuvo un valor de 0.76 (Köhler et al., 2020). Otro estudio, utilizando el mismo algoritmo encontró que el gen más estable mostró un valor de estabilidad de 0.19, mientras que el menos estable arrojó un valor de 1.51 (Y. Zhang et al., 2018). Wang y colaboradores (2022) realizaron un ensayo de estabilidad de genes de referencia con NormFinder, con valores de estabilidad en el rango de 0.134 a 0.825 (G.-H. Wang et al., 2022). Otro

estudio mostró que, en sus condiciones experimentales, el gen más estable presentó un valor de estabilidad de 0.147, mientras que el menos estable tuvo un valor de 0.713 (Modesto et al., 2013). Estos resultados indican que mientras el valor de estabilidad sea más bajo, indicará el gen más estable dentro de un conjunto de genes candidato. No se puede tener un valor límite que permita indicar si existe o no estabilidad en un gen determinado, más bien, se debe realizar una comparación única de cada gen en la condición experimental mostrada.

La hipótesis del presente proyecto fue demostrar que la expresión de los genes *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT* es constante en la línea celular McCoy ATCC CRL-1696 no expuesta y expuesta a nanopartículas de plata cubiertas con doxiciclina. Sin embargo, en función de los resultados indicados, no se pudo demostrar que la eficiencia de amplificación del gen *ACTBL2* está dentro del rango adecuado. De forma similar, el valor de estabilidad (el cual indica variabilidad) de este gen es 3 y 8.75 veces superior que los valores de estabilidad de los genes *HPRT* y *ACTB*. Con esto se indica que el gen *ACTBL2* no muestra estabilidad de su expresión en las condiciones experimentales del presente proyecto. Por otro lado, los genes *ACTB* y *HPRT* muestran un valor de estabilidad pequeño, cercano a cero. Ante esto, se concluye que estos genes presentan estabilidad constante en la línea celular McCoy ATCC CRL-1696 no expuesta y expuesta a nanopartículas de plata cubiertas con doxiciclina. Por lo tanto, la hipótesis del proyecto se rechaza.

Capítulo VI: Conclusiones

El manejo adecuado de la línea celular McCoy ATCC CRL-1696 permitió obtener el número de células suficientes para extraer RNA de óptima calidad y concentración, lo que propició el estudio de la eficiencia de amplificación de los genes *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT*.

La optimización de los ensayos de qPCR permitió encontrar los valores óptimos de temperatura de annealing y de concentración de primers de cada ensayo, lo que posibilitó la corrida de ensayos de eficiencia y estabilidad en los genes *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT*.

Las curvas de melting de los genes *ACTB* y *HPRT* permitieron demostrar que existe un solo pico correspondiente al amplicon esperado por gen, cercano a los valores predichos por OligoCalc. Lo que se corroboró en las corridas electroforéticas de los productos de qPCR en los genes *ACTB* y *HPRT* donde también se obtuvieron los tamaños de amplicón esperados. Mientras que para el gen *ACTBL2*, solo en la primera concentración se observa lo esperado sin productos inespecíficos.

La curva estándar de los genes *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT* permitió encontrar la eficiencia de amplificación y el coeficiente de determinación (R^2) en cada gen. Donde, el coeficiente de determinación (R^2) de los genes *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT* fue superior a 0.9 en todos los casos, en particular, el gen *ACTB* tuvo un valor superior a 0.98. Lo cual indicó la existencia de relación entre la cantidad de RNA usado y los valores de Cq obtenidos. Mientras que, la eficiencia de amplificación de los genes *ACTB* y *HPRT* fue 109.5% y 93.5%, respectivamente, los cuales están dentro del rango óptimo (90-110%).

En los análisis de estabilidad de los genes *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT*, la corrección de datos con la eficiencia de amplificación de cada gen permitió evaluar la variabilidad génica de forma más precisa y apegada a la realidad.

Los ensayos de estabilidad de los tres genes de referencia, con corrección por eficiencia, permitieron identificar que el valor de estabilidad (el cual indica variabilidad) de *ACTBL2* el cual es 3 y 8.75 veces superior a los genes *HPRT* y *ACTB*, respectivamente. Con esto se establece que el gen *ACTBL2* muestra una mayor variabilidad y por ende inestabilidad de su expresión, en las condiciones experimentales del presente proyecto. Por su parte, los genes *ACTB* y *HPRT* muestran valores de estabilidad cercano a cero, lo que nos indica que estos genes presentan estabilidad constante en la línea celular McCoy ATCC CRL-1696 no expuesta y expuesta a nanopartículas de plata cubiertas con doxiciclina.

Capítulo VII: Recomendaciones

Se recomienda realizar los análisis de eficiencia de amplificación y estabilidad usando otro juego de primers para el gen *ACTBL2*, para comprobar si el diseño de los primers usados en el presente estudio fue un factor que influyó en los resultados obtenidos.

Se recomienda realizar un análisis de sensibilidad analítica en los genes *ACTBL2*, *ACTB* y *HPRT*. Esto para saber el límite de detección de los ensayos en las condiciones optimizadas.

Se recomienda realizar un análisis de estabilidad usando los datos crudos de Cq en función de las diferentes concentraciones y tiempos de exposición a nanopartículas de plata cubiertas con doxiciclina.

Se recomienda realizar un análisis de estabilidad usando como control a la línea celular McCoy ATCC CRL-1696 expuesta a nanopartículas de plata sin ser recubiertas con doxiciclina.

Capítulo VIII: Referencias

- Agilent Technologies, Inc. (2012). *Introduction to Quantitative PCR*.
https://www.agilent.com/cs/library/brochures/Brochure_Guide%20to%20QPCR_IN70200C.pdf
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Research*, 64(15), 5245-5250.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>
- Avelar-Freitas, B. A., Almeida, V. G., Pinto, M. C. X., Mourão, F. A. G., Massensini, A. R., Martins-Filho, O. A., Rocha-Vieira, E., & Brito-Melo, G. E. A. (2014). Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 47(4), 307-3015. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20143437>
- Balliu, B., Durrant, M., Goede, O. de, Abell, N., Li, X., Liu, B., Gloudemans, M. J., Cook, N. L., Smith, K. S., Knowles, D. A., Pala, M., Cucca, F., Schlessinger, D., Jaiswal, S., Sabatti, C., Lind, L., Ingelsson, E., & Montgomery, S. B. (2019). Genetic regulation of gene expression and splicing during a 10-year period of human aging. *Genome Biology*, 20(1), 230. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1840-y>
- Bio-Rad. (s. f.). *Real-Time PCR Experimental Design*. Bio-Rad Laboratories.
Recuperado 30 de agosto de 2022, de <https://www.bio-rad.com/es-es/applications-technologies/real-time-pcr-experimental-design?ID=LUSNJVIVK>
- Biosystems, A. (2004). Guide to performing relative quantitation of gene expression using real-time quantitative PCR. *Applied Biosystems*, 60.

- Bivins, A., Kaya, D., Bibby, K., Simpson, S. L., Bustin, S. A., Shanks, O. C., & Ahmed, W. (2021). Variability in RT-qPCR assay parameters indicates unreliable SARS-CoV-2 RNA quantification for wastewater surveillance. *Water Research*, 203, 117516. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117516>
- Brankatschk, R., Bodenhausen, N., Zeyer, J., & Bürgmann, H. (2012). Simple Absolute Quantification Method Correcting for Quantitative PCR Efficiency Variations for Microbial Community Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4481-4489. <https://doi.org/10.1128/AEM.07878-11>
- Buh Gašparič, M., Cankar, K., Žel, J., & Gruden, K. (2008). Comparison of different real-time PCR chemistries and their suitability for detection and quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnology*, 8, 26. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-26>
- Bustin, S. A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29(1), 23-39. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0290023>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Čepin, U. (2017, noviembre 15). *Understanding qPCR Efficiency and Why It Exceeds 100%*. <https://biosistemika.com/blog/qpcr-efficiency-over-100/>
- Chang, K.-W., Yang, P.-Y., Lai, H.-Y., Yeh, T.-S., Chen, T.-C., & Yeh, C.-T. (2006). Identification of a novel actin isoform in hepatocellular carcinoma. *Hepatology Research: The Official Journal of the Japan Society of Hepatology*, 36(1), 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.hepres.2006.05.003>

- Čikoš, Š., Bukovská, A., & Koppel, J. (2007). Relative quantification of mRNA: Comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Molecular Biology*, 8(1), 113. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-113>
- Clancy, S., & Brown, W. (2008). *Translation: DNA to mRNA to Protein | Learn Science at Scitable* [Nature Education]. Translation: DNA to MRNA to Protein. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/translation-dna-to-mrna-to-protein-393/>
- Curis, E., Nepost, C., Grillault Laroche, D., Courtin, C., Laplanche, J.-L., Etain, B., & Marie-Claire, C. (2019). Selecting reference genes in RT-qPCR based on equivalence tests: A network based approach. *Scientific Reports*, 9(1), 16231. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52217-2>
- De Spiegelaere, W., Dern-Wieloch, J., Weigel, R., Schumacher, V., Schorle, H., Nettersheim, D., Bergmann, M., Brehm, R., Kliesch, S., Vandekerckhove, L., & Fink, C. (2015). Reference Gene Validation for RT-qPCR, a Note on Different Available Software Packages. *PLoS ONE*, 10(3), e0122515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122515>
- Dheda, K., Huggett, J. F., Bustin, S. A., Johnson, M. A., Rook, G., & Zumla, A. (2004). Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques*, 37(1), 112-119. <https://doi.org/10.2144/04371RR03>
- Dundas, J., & Ling, M. (2012). Reference genes for measuring mRNA expression. *Theory in Biosciences*, 131(4), 215-223. <https://doi.org/10.1007/s12064-012-0152-5>
- El-Fahmawi, B. (2013, enero 10). *Primer-Dimer Formation: The Problem and the Solution*.

- Elvidge, G. (2005). Options for quantitative analysis by real-time PCR. *European Pharmaceutical Review*.
<https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/2908/options-for-quantitative-analysis-by-real-time-pcr/>
- Eurogentec. (2004). *Troubleshooting Guide qPCR and RT qPCR kits*.
<https://www.gene-quantification.de/eurogentec-qq-troubleshooting.pdf>
- Fam, S. Y., Chee, C. F., Yong, C. Y., Ho, K. L., Mariatulqabiah, A. R., & Tan, W. S. (2020). Stealth Coating of Nanoparticles in Drug-Delivery Systems. *Nanomaterials*, 10(4), 787. <https://doi.org/10.3390/nano10040787>
- Flaga, J., Przybyło, M., & Górka, P. (2021). Gene Expression Analysis with No Sequence Data: Study on Reeves's Muntjac (*Muntiacus reevesi*). *Current Issues in Molecular Biology*, 43(3), 1576-1582.
<https://doi.org/10.3390/cimb43030111>
- Fleige, S., & Pfaffl, M. W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), 126-139.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.003>
- Fraser, L. C. R., Dikdan, R. J., Dey, S., Singh, A., & Tyagi, S. (2021). Reduction in gene expression noise by targeted increase in accessibility at gene loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(42), e2018640118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2018640118>
- Geraghty, R. J., Capes-Davis, A., Davis, J. M., Downward, J., Freshney, R. I., Knezevic, I., Lovell-Badge, R., Masters, J. R. W., Meredith, J., Stacey, G. N., Thraves, P., & Vias, M. (2014). Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *British Journal of Cancer*, 111(6), 1021-1046.
<https://doi.org/10.1038/bjc.2014.166>

- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12827. <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
- Ginzinger, D. G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30(6), 503-512. [https://doi.org/10.1016/s0301-472x\(02\)00806-8](https://doi.org/10.1016/s0301-472x(02)00806-8)
- Guerrero, L., & Paredes, N. (2017). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata y de nanocompuestos poliméricos, para la creación de un dispositivo antibacterial obtenido mediante pintrónica, evaluado en Staphylococcus aureus y Escherichia coli*. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Guha, D. (2019). *A new algorithm for primer design*. 64.
- Guo, M., Chen, Y., Lin, L., Wang, Y., Wang, A., Yuan, F., Wang, C., Wang, S., & Zhang, Y. (2022). The Study on the Clinical Phenotype and Function of HPRT1 Gene. *Child Neurology Open*, 9, 2329048X221108821. <https://doi.org/10.1177/2329048X221108821>
- Haenel, F., & Garbow, N. (2014). *Cell Counting and Confluency Analysis as Quality Controls in Cell-Based Assays*. 5.
- Haimes, J., & Kelley, M. (2018). *Demonstration of a $\Delta\Delta Cq$ Calculation Method to Compute Relative Gene Expression from qPCR Data*. 4.
- Hasler, J., Hatt, L. P., Stoddart, M. J., & Armiento, A. R. (2020). Stable Reference Genes for qPCR Analysis in BM-MSCs Undergoing Osteogenic Differentiation within 3D Hyaluronan-Based Hydrogels. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 9195. <https://doi.org/10.3390/ijms21239195>

- Hödebeck, M., Scherer, C., Wagner, A. H., Hecker, M., & Korff, T. (2014). TonEBP/NFAT5 regulates ACTBL2 expression in biomechanically activated vascular smooth muscle cells. *Frontiers in Physiology*, 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2014.00467>
- Johnston, A. D., Lu, J., Ru, K., Korbie, D., & Trau, M. (2019). PrimerROC: Accurate condition-independent dimer prediction using ROC analysis. *Scientific Reports*, 9(1), 209. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36612-9>
- Jung, H.-N., Zerlin, T., Podder, B., Song, H.-Y., & Kim, Y.-S. (2014). Cytotoxicity and gene expression profiling of polyhexamethylene guanidine hydrochloride in human alveolar A549 cells. *Toxicology in Vitro*, 28(4), 684-692. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.02.004>
- Kaur, G., & Dufour, J. M. (2012). Cell lines. *Spermatogenesis*, 2(1), 1-5. <https://doi.org/10.4161/spmg.19885>
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908-931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
- Köhler, M., Leitsch, D., Müller, N., & Walochnik, J. (2020). Validation of reference genes for the normalization of RT-qPCR gene expression in *Acanthamoeba* spp. *Scientific Reports*, 10(1), 10362. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67035-0>
- Kong, B., Seog, J. H., Graham, L. M., & Lee, S. B. (2011). Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. *Nanomedicine (London, England)*, 6(5), 929-941. <https://doi.org/10.2217/nnm.11.77>
- Kozera, B., & Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, 54(4), 391-406. <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x>

- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00108>
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), pdb.prot095505. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>
- Lewinski, N., Colvin, V., & Drezek, R. (2008). Cytotoxicity of nanoparticles. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 4(1), 26-49. <https://doi.org/10.1002/smll.200700595>
- Li, W., Zhou, J., & Xu, Y. (2015). Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices (Review). *Biomedical Reports*, 3(5), 617-620. <https://doi.org/10.3892/br.2015.481>
- Li, X., He, Q., & Shi, J. (2014). Global Gene Expression Analysis of Cellular Death Mechanisms Induced by Mesoporous Silica Nanoparticle-Based Drug Delivery System. *ACS Nano*, 8(2), 1309-1320. <https://doi.org/10.1021/nn4046985>
- Life Technologies. (2012). *Real-time PCR handbook*. [real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr](https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr). <https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 63, 3998. <https://doi.org/10.3791/3998>

- Malek, N., Michrowska, A., Mazurkiewicz, E., Mrówczyńska, E., Mackiewicz, P., & Mazur, A. J. (2021). The origin of the expressed retrotransposed gene ACTBL2 and its influence on human melanoma cells' motility and focal adhesion formation. *Scientific Reports*, *11*(1), 3329. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82074-x>
- Mazoochi, T., Salehnia, M., Pourbeiranvand, S., Forouzandeh, M., Mowla, S. J., & Hajizadeh, E. (2009). Analysis of apoptosis and expression of genes related to apoptosis in cultures of follicles derived from vitrified and non-vitrified ovaries. *Molecular Human Reproduction*, *15*(3), 155-164. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap002>
- Méry, B., Guy, J.-B., Vallard, A., Espenel, S., Ardail, D., Rodriguez-Lafrasse, C., Rancoule, C., & Magné, N. (2017). In Vitro Cell Death Determination for Drug Discovery: A Landscape Review of Real Issues. *Journal of Cell Death*, *10*, 1179670717691251. <https://doi.org/10.1177/1179670717691251>
- Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A., & Langer, R. (2021). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, *20*(2), 101-124. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>
- Modesto, P., Peletto, S., Pisoni, G., Cremonesi, P., Castiglioni, B., Colussi, S., Caramelli, M., Bronzo, V., Moroni, P., & Acutis, P. L. (2013). Evaluation of internal reference genes for quantitative expression analysis by real-time reverse transcription-PCR in somatic cells from goat milk. *Journal of Dairy Science*, *96*(12), 7932-7944. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6383>
- Moeinzadeh, S., & Jabbari, E. (2017). Nanoparticles and Their Applications. En B. Bhushan (Ed.), *Springer Handbook of Nanotechnology* (pp. 335-361). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-54357-3_11

- Moharamzadeh, K., Brook, I. M., & Van Noort, R. (2009). Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. *Materials*, 2(2), 514-548.
<https://doi.org/10.3390/ma2020514>
- Mubarak, S. M. H., Al-Koofee, D. A. F., Radhi, O. A., Ismael, J. M., & Al-Zubaidi, Z. F. (2020). An Optimization and Common Troubleshooting Solving in Polymerase Chain Reaction Technique. 11(2), 10.
- Pavel, M., Renna, M., Park, S. J., Menzies, F. M., Ricketts, T., Füllgrabe, J., Ashkenazi, A., Frake, R. A., Lombarte, A. C., Bento, C. F., Franze, K., & Rubinsztein, D. C. (2018). Contact inhibition controls cell survival and proliferation via YAP/TAZ-autophagy axis. *Nature Communications*, 9(1), 2961.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-05388-x>
- Peirson, S. N., & Butler, J. N. (2007). Quantitative Polymerase Chain Reaction. En E. Rosato (Ed.), *Circadian Rhythms* (Vol. 362, pp. 349-362). Humana Press.
https://doi.org/10.1007/978-1-59745-257-1_25
- Pfaffl, M. (2004). *A-Z of quantitative PCR*. S.A. Bustin. <https://www.gene-quantification.de/chapter-3-pfaffl.pdf>
- Phelan, K., & May, K. M. (2015). Basic Techniques in Mammalian Cell Tissue Culture. *Current Protocols in Cell Biology*, 66(1).
<https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0101s66>
- Phelan, M. C. (2007). Techniques for Mammalian Cell Tissue Culture. *Current Protocols in Neuroscience*, 38(1).
<https://doi.org/10.1002/0471142727.nsa03bs38>
- Rabaan, A. A., Tirupathi, R., Sule, A. A., Aldali, J., Mutair, A. A., Alhumaid, S., Muzaheed, Gupta, N., Koritala, T., Adhikari, R., Bilal, M., Dhawan, M., Tiwari, R., Mitra, S., Emran, T. B., & Dhama, K. (2021). Viral Dynamics and Real-Time

- RT-PCR Ct Values Correlation with Disease Severity in COVID-19. *Diagnostics*, 11(6), 1091. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11061091>
- Radonić, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W., & Nitsche, A. (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(4), 856-862. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.177>
- Regier, N., & Frey, B. (2010). Experimental comparison of relative RT-qPCR quantification approaches for gene expression studies in poplar. *BMC Molecular Biology*, 11, 57. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-57>
- Riss, T., Niles, A., Moravec, R., Karassina, N., & Vidugiriene, J. (2019). Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells. En S. Markossian, A. Grossman, K. Brimacombe, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, J. Baell, T. D. Y. Chung, N. P. Coussens, J. L. Dahlin, V. Devanarayan, T. L. Foley, M. Glicksman, J. V. Haas, M. D. Hall, S. Hoare, J. Inglese, P. W. Iversen, S. C. Kales, ... X. Xu (Eds.), *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540958/>
- Rocha, A. J., Miranda, R. de S., Sousa, A. J. S., & Silva, A. L. C. da. (2016). Guidelines for Successful Quantitative Gene Expression in Real- Time qPCR Assays. En *Polymerase Chain Reaction for Biomedical Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/65850>
- Rogers-Broadway, K.-R., & Karteris, E. (2015). Amplification efficiency and thermal stability of qPCR instrumentation: Current landscape and future perspectives. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 10(4), 1261-1264. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2712>

- Ruijter, J. M., Barnewall, R. J., Marsh, I. B., Szentirmay, A. N., Quinn, J. C., van Houdt, R., Gunst, Q. D., & van den Hoff, M. J. B. (2021). Efficiency Correction Is Required for Accurate Quantitative PCR Analysis and Reporting. *Clinical Chemistry*, 67(6), 829-842. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvab052>
- Ruijter, J. M., Ruiz-Villalba, A., van den Hoff, A. J. J., Gunst, Q. D., Wittwer, C. T., & van den Hoff, M. J. B. (2019). Removal of artifact bias from qPCR results using DNA melting curve analysis. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(12), 14542-14555. <https://doi.org/10.1096/fj.201901604R>
- Ruiz-Villalba, A., Ruijter, J. M., & van den Hoff, M. J. B. (2021). Use and Misuse of Cq in qPCR Data Analysis and Reporting. *Life*, 11(6), 496. <https://doi.org/10.3390/life11060496>
- Ruiz-Villalba, A., van Pelt-Verkuil, E., Gunst, Q. D., Ruijter, J. M., & van den Hoff, M. J. (2017). Amplification of nonspecific products in quantitative polymerase chain reactions (qPCR). *Biomolecular Detection and Quantification*, 14, 7-18. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.10.001>
- Ruutu, M., Johansson, B., Grenman, R., Syrjänen, K., & Syrjänen, S. (2004). Effect of confluence state and passaging on global cancer gene expression pattern in oral carcinoma cell lines. *Anticancer Research*, 24(5A), 2627-2631.
- Salata, O. (2004). Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology*, 2(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-2-3>
- SantaLucia, J. (1998). A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(4), 1460-1465. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1460>

- Schaefer, A., Jung, M., Miller, K., Lein, M., Kristiansen, G., Erbersdobler, A., & Jung, K. (2010). Suitable reference genes for relative quantification of miRNA expression in prostate cancer. *Experimental & Molecular Medicine*, 42(11), 749-758. <https://doi.org/10.3858/emm.2010.42.11.076>
- Scholtes, C., Icard, V., Amiri, M., Chevallier-Queyron, P., Trabaud, M.-A., Ramière, C., Zoulim, F., André, P., & Dény, P. (2012). Standardized One-Step Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for Universal Detection and Quantification of Hepatitis Delta Virus from Clinical Samples in the Presence of a Heterologous Internal-Control RNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(6), 2126-2128. <https://doi.org/10.1128/JCM.06829-11>
- Shen, C.-H. (2019). Detection and Analysis of Nucleic Acids. En *Diagnostic Molecular Biology* (pp. 167-185). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802823-0.00007-9>
- Ståhl, P. L., Salmén, F., Vickovic, S., Lundmark, A., Navarro, J. F., Magnusson, J., Giacomello, S., Asp, M., Westholm, J. O., Huss, M., Mollbrink, A., Linnarsson, S., Codeluppi, S., Borg, Å., Pontén, F., Costea, P. I., Sahlén, P., Mulder, J., Bergmann, O., ... Frisén, J. (2016). Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science*, 353(6294), 78-82. <https://doi.org/10.1126/science.aaf2403>
- Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M. W., & Kubista, M. (2015). How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification*, 3, 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>
- Thompson, R. E. (2010). *An Analysis of Efficiency and Melt Curve Effects on Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) Inhibition*.

<https://www.semanticscholar.org/paper/An-Analysis-of-Efficiency-and-Melt-Curve-Effects-on-Thompson/93dc88eb6d90f7e33ea260ee90b2fb38b65b69ac>

Thornton, B., & Basu, C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 39(2), 145-154. <https://doi.org/10.1002/bmb.20461>

Tian, Y., Chu, Z., Wang, H., Wang, G., Wu, S., & Yang, Y. (2022). Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR in *Cymbidium sinense*. *BioTechniques*, 72(2), 51-59. <https://doi.org/10.2144/btn-2021-0073>

Van Acker, S. I., Van Acker, Z. P., Haagdoorens, M., Pintelon, I., Koppen, C., & Zakaria, N. (2019). Selecting Appropriate Reference Genes for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Studies in Isolated and Cultured Ocular Surface Epithelia. *Scientific Reports*, 9(1), 19631. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56054-1>

Vazanova, A., Jurecekova, J., Balharek, T., Marcinek, J., Stasko, J., Dzian, A., Plank, L., Zubor, P., Racay, P., & Hatok, J. (2018). Differential mRNA expression of the main apoptotic proteins in normal and malignant cells and its relation to in vitro resistance. *Cancer Cell International*, 18(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0528-9>

Vermeulen, J., De Preter, K., Lefever, S., Nuytens, J., De Vloed, F., Derveaux, S., Hellemans, J., Speleman, F., & Vandesompele, J. (2011). Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR. *Nucleic Acids Research*, 39(9), e63. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr065>

Wan, Q., Chen, S., Shan, Z., Yang, Z., Chen, L., Zhang, C., Yuan, S., Hao, Q., Zhang, X., Qiu, D., Chen, H., & Zhou, X. (2017). Stability evaluation of reference genes for gene expression analysis by RT-qPCR in soybean under different

conditions. *PLoS ONE*, 12(12), e0189405.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189405>

Wang, G.-H., Wang, S.-H., Zhang, W.-Z., Liang, C.-C., Cheng, G., Wang, X.-Y., Zhang, Y., & Zan, L.-S. (2022). Analysis of stability of reference genes for qPCR in bovine preadipocytes during proliferation and differentiation in vitro. *Gene*, 830, 146502. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146502>

Wang, X., He, J., Wang, W., Ren, M., Gao, S., Zhao, G., Wang, J., & Yang, Q. (2016). Validation of internal reference genes for relative quantitation studies of gene expression in human laryngeal cancer. *PeerJ*, 4, e2763. <https://doi.org/10.7717/peerj.2763>

Wittmeier, P., & Hummel, S. (2022). Agarose gel electrophoresis to assess PCR product yield: Comparison with spectrophotometry, fluorometry and qPCR. *BioTechniques*, 72(4), 155-158. <https://doi.org/10.2144/btn-2021-0094>

Xu, Z., Dai, J., Su, W., Wu, H., Shah, K., Xing, L., Ma, J., Zhang, D., & Zhao, C. (2022). Selection and Validation of Reliable Reference Genes for Gene Expression Studies in Different Genotypes and TRV-Infected Fruits of Peach (*Prunus persica* L. Batsch) during Ripening. *Genes*, 13(1), 160. <https://doi.org/10.3390/genes13010160>

Yin, I. X., Zhang, J., Zhao, I. S., Mei, M. L., Li, Q., & Chu, C. H. (2020). <p>The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry</p>. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 2555-2562. <https://doi.org/10.2147/IJN.S246764>

Yin, W.-Z., Yang, Q.-W., Niu, K., Ren, M., He, D., & Song, W.-Z. (2019). Validation of reference genes for the normalization of RT-qPCR expression studies on human laryngeal cancer and hypopharyngeal cancer. *European Review for*

Medical and Pharmacological Sciences, 23(10), 4199-4209.

https://doi.org/10.26355/eurrev_201905_17924

Zhang, Q., Wang, J., Deng, F., Yan, Z., Xia, Y., Wang, Z., Ye, J., Deng, Y., Zhang, Z., Qiao, M., Li, R., Denduluri, S. K., Wei, Q., Zhao, L., Lu, S., Wang, X., Tang, S., Liu, H., Luu, H. H., ... Jiang, L. (2015). TqPCR: A Touchdown qPCR Assay with Significantly Improved Detection Sensitivity and Amplification Efficiency of SYBR Green qPCR. *PLOS ONE*, 10(7), e0132666.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132666>

Zhang, T., Wang, L., Chen, Q., & Chen, C. (2014). Cytotoxic Potential of Silver Nanoparticles. *Yonsei Medical Journal*, 55(2), 283-291.

<https://doi.org/10.3349/ymj.2014.55.2.283>

Zhang, X.-F., Liu, Z.-G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1534.

<https://doi.org/10.3390/ijms17091534>

Zhang, Y., Li, H., Shang, S., Meng, S., Lin, T., & Zhang, Y. (2020). *Evaluation validation of a qPCR curve analysis method and conventional approaches*. 2020.06.18.158873.

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.06.18.158873v1>

Zhang, Y., Peng, X., Liu, Y., Li, Y., Luo, Y., Wang, X., & Tang, H. (2018). Evaluation of suitable reference genes for qRT-PCR normalization in strawberry (*Fragaria × ananassa*) under different experimental conditions. *BMC Molecular Biology*, 19(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s12867-018-0109-4>

Zhao, F., Maren, N. A., Kosentka, P. Z., Liao, Y.-Y., Lu, H., Dudit, J. R., Huang, D., Ashrafi, H., Zhao, T., Huerta, A. I., Ranney, T. G., & Liu, W. (2021). An

optimized protocol for stepwise optimization of real-time RT-PCR analysis.

Horticulture Research, 8(1), 1-21. <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00616-w>