



UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGÍA

**AMPLIFICACIÓN DEL GEN CITOQUERATINA 5 EN LENGUAS DE
RATA WISTAR FIJADAS EN FORMALINA 10% TAMPONADA**

Memoria presentada a la Escuela de Odontología de la
Universidad de Talca como parte de los requisitos exigidos
para la obtención del título de Cirujano Dentista.

ESTUDIANTES: PAULA LORENA SALGADO PEÑAILILLO
CONSTANZA PAZ SANTELICES ASTORGA

PROFESOR GUÍA: DRA. WENDY DONOSO TORRES
PROFESOR CO-GUÍA: DRA. LORENA TOLOZA MATURANA
PROFESOR INFORMANTE: DR. LUIS GUZMÁN JOFRÉ

TALCA – CHILE
2019

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2020

ÍNDICE

1. RESUMEN	4
Palabras Clave	4
2. INTRODUCCIÓN	5
3. MARCO TEÓRICO	7
3.1 Biopsia.....	7
3.2 Fijación	7
3.3 Formalina 10%	9
3.4 Formalina 10% tamponada y su interacción con macromoléculas	10
3.5 Citoqueratinas 5 como marcador epitelial	11
3.6 Procesamiento histológico.....	12
3.7 Extracción de ADN	13
3.8 Relación A260 / A280.....	15
3.9 Electroforesis.....	16
3.10 Diagnóstico molecular.....	18
3.11 Reacción en cadena de la polimerasa	20
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	22
5. OBJETIVOS	23
5.1 Objetivo General	23
5.2 Objetivos Específicos	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1 Muestras	24
6.2 Diseño experimental.....	24
6.3 Extracción ADN	25
6.4 Cuantificación espectrofotométrica del ADN	27
6.5 Gel de agarosa	27
6.6 Diseño de cebadores para beta actina y queratina 5	28
6.7 Amplificación de ADN por reacción en cadena de polimerasa	28
6.8 Corrida electroforética.....	29
7. RESULTADOS	30

7.1 Cuantificación espectrofotométrica del ADN	30
7.2 Amplificación del gen de citoqueratina 5.....	31
8. DISCUSIÓN	32
9. CONCLUSIÓN.....	34
10. BIBLIOGRAFÍA.....	35
11. ANEXO	40

1. RESUMEN

Un adecuado procesamiento histológico parte con la fijación de las muestras en formalina 10% tamponada, que, si bien es ampliamente utilizada por su bajo costo, alta difusión tisular y compatibilidad con las técnicas histológicas, un exceso en el tiempo de fijación podría ir en desmedro de las muestras afectando macromoléculas como el ADN, perdiendo la integridad, y con ello su valor diagnóstico.

Si bien el tiempo de fijación para estudios histológicos convencionales es conocido, no ocurre lo mismo cuando se requiere realizar estudios moleculares. Es por ello, que el propósito de este estudio experimental fue determinar el tiempo máximo de fijación de lenguas de rata Wistar en formalina 10% tamponada, de modo tal que la integridad del ADN permita amplificar el gen de la citoqueratina 5, obteniéndose que con un tiempo de fijación de hasta 10 horas, es posible al realizar la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa.

Palabras Clave

Formalina, ADN, citoqueratina 5, PCR, estabilidad genómica.

2. INTRODUCCIÓN

La biopsia consiste en la extirpación de un tejido o lesión siendo utilizado con fines diagnósticos tanto en medicina general como en odontología. Particularmente, en el área estomatológica puede ser de gran ayuda en la diferenciación de lesiones para dar posteriormente adecuado tratamiento según diagnóstico, y principalmente será de gran utilidad para determinar la presencia de patologías malignas, estableciendo a su vez el pronóstico de dichas enfermedades.

Una adecuada técnica histopatológica tiene como objetivo mantener la integridad de las macromoléculas presentes en la muestra como proteínas y ácidos nucleicos, siendo importante el estudio de estos últimos para el diagnóstico molecular de diversas patologías, como lo es el caso de las citoqueratinas 5/6 (Cks 5/6), proteínas constitutivas del citoesqueleto celular de tejidos epiteliales orales, faringe y orofaringe. Genéticamente, se ha descrito el gen para citoqueratina 5 en *Rattus norvegicus*, pero no para citoqueratina 6.

Existen diversos métodos tanto físicos como químicos para la fijación de biopsias, donde el fijador comúnmente empleado es la formalina 10% tamponada (FT 10%) por su buen nivel de penetración y difusión en tejidos, permitiendo conservar y disminuir los cambios de la ultraestructura celular (Singhal *et al.*, 2016), sin embargo la utilidad de este puede ser afectada por un mal manejo, siendo uno de los tópicos importantes en la técnica histológica el tiempo máximo en que pueden estar inmersas las muestras en este fluido, donde si bien las proteínas podrían mantenerse íntegras en un período de mayor exposición, el ácido desoxirribonucleico (ADN), debido a sus características podría verse alterado.

El ADN puede sufrir cambios debido a una excesiva fijación y la información sobre el tiempo en que puede estar inmersa una muestra en FT 10%, desde la toma del tejido hasta su posterior procesamiento histológico, es controversial (Engel and Moore, 2011; O'Leary et al, 2009; Howat and Wilson, 2014; Buesa and Peshkov, 2012). En este sentido, el tiempo de fijación es un punto crítico que debe ser determinado dado que es muy relevante sobre todo cuando se trata de biopsias excisionales porque, éstas al ser muestras únicas, pueden perder su valor diagnóstico y con ello la oportunidad de un adecuado tratamiento para el paciente.

El propósito de este trabajo es determinar el tiempo máximo de fijación de muestras, desde su toma hasta el procesamiento histológico, utilizando formalina 10% tamponada, manteniendo tal grado de estabilidad genómica que permita amplificar el gen de la citoqueratina 5 en lenguas de rata Wistar mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR).

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Biopsia

La biopsia consiste en la extirpación de tejido en un organismo vivo para su posterior examen a nivel microscópico y con ello la obtención de un diagnóstico histopatológico, siendo el método estándar para la detección morfológica de patologías tanto benignas como malignas. Se solicita como examen complementario, dada la alta fidelidad de su resultado (Silva *et al.*, 2014).

En la práctica podría ocurrir que no exista concordancia entre lo observado clínicamente y el desarrollo a nivel histológico de determinada patología, obteniéndose falsos negativos por la posible confusión entre lesiones benignas y malignas. Es en dichos casos donde se requiere un análisis en profundidad de las muestras, estudiando en ocasiones las macromoléculas presentes como los son las proteínas y ácidos nucleicos. Por lo anterior, la biopsia es el principal procedimiento para confirmación diagnóstica en la actualidad (Napier *et al.*, 2010).

Dentro de las biopsias quirúrgicas podrían reconocerse dos tipos, las excisionales, donde hay una extirpación total de la lesión incluyendo un margen de tejido sano, y las incisionales, biopsias en la que se extrae la zona más representativa de la lesión (Seoane *et al.*, 2008).

Una vez obtenida la muestra, para su posterior análisis, se utilizan fijadores con el objetivo de mantener características estructurales y moleculares lo más parecidas posibles a su condición *in vivo*, conservando la microanatomía aparente del tejido (Martinez *et al.*, 2008).

3.2 Fijación

La fijación es un proceso en el que es tratado el tejido en estudio mediante sustancias químicas, en el cual se retardan las alteraciones asociados a muerte celular, conservando su configuración original y logrando a su vez estabilización de las macromoléculas celulares (Gartner, Hiatt 2002). En cuanto a los agentes fijadores, estos podrían clasificarse según su

naturaleza en físicos y químicos, siendo el segundo grupo, los más utilizados. Existen fijadores físicos como calor húmedo, calor seco, frío y liofilización, mientras que dentro de los fijadores químicos hay una gran variedad destacando los fijadores a base de cloruro de mercurio, como es el Cloruro de paramalinaa- mercurio II (B5) y el líquido de Zenker, de utilidad en la fijación de órganos linfoides y hematopoyéticos; líquido de Bouin, utilizado principalmente para estudios que requieran tinciones tricrómicas, además de usarse en estudios de órganos linfoides y neuronales; etanol y acetona, utilizados en estudios citológicos, y solución de Carnoy, regularmente para estudios de ácidos nucleicos e hidratos de carbono.

El mecanismo de acción de los fijadores químicos está en la creación de puentes químicos entre moléculas del tejido evitando consigo su degradación y permitiendo estabilizar su microestructura y ultraestructura. Las muestras histológicas son fijadas mediante inmersión respetándose para ello diversas consideraciones, enumeradas a continuación (Morel *et al.*, 2000):

- 1.- El pH del fijador debe ser próximo al pH neutral (6,8-7,2).
- 2.- El tiempo de fijación depende de cada tipo de fijador.
- 3.- El volumen recomendado del fijador es 20 veces superior al volumen de la muestra.
- 4.- La osmolaridad del tejido y de la solución deben ser equilibradas.
- 5.- El tamaño de la muestra no debe ser superior a 5 cm (Grizzle 2009).

Además de las consideraciones anteriores, al momento de una fijación histológica es necesario tener en conocimiento la capacidad de penetración del agente fijador y la temperatura, siendo esta última junto con el tiempo, las variables principales en la fijación de muestras para el estudio histopatológico (Engel, Moore 2011). Otro punto a considerar es el volumen de inmersión el cual es aceptable en proporciones mayores a 1:10 en muestras con espesores de hasta 3 cm (Buesa, Peshkov 2012).

Es aquí donde encontramos la formalina 10% tamponada (FT 10%) como el fijador químico de tejidos más empleado en histopatología.

3.3 Formalina 10%

Se llama formalina a la disolución de formaldehído en agua en una concentración que oscila entre el 37 y el 40%, que puede contener hasta un 15% de metanol. El formaldehído a temperatura ambiente se presenta como un gas incoloro, inflamable y explosivo. Es utilizado normalmente en solución acuosa y así puede ser usado en la fijación de tejidos, debe estar previamente tamponado con fosfato sódico monobásico (NaH_2PO_4) y dibásico (Na_2HPO_4) a un pH fisiológico.

La formalina se presenta comercialmente a una concentración del 40%, y según la necesidad debe ser diluida en una solución tampón para obtener la formalina 10% tamponada. Este fijador presenta alta compatibilidad con las técnicas histológicas y destaca por su capacidad para desinfectar los tejidos, presentar rápida penetración y ser un fijador de bajo costo, por lo cual es ampliamente usado en la práctica habitual (Lacave, García 2012).

Se considera un fijador reticulante, por su capacidad de formar puentes metileno ($=\text{CH}_2$) (figura 1) con diversas cadenas de aminoácidos, específicamente entre los grupos amino libres. Las principales reticulaciones se producen entre el aminoácido lisina y la formalina. Son justamente estos puentes moleculares formados entre el agente fijador y los aminoácidos, quienes impiden los procesos autolíticos de la muerte celular, deteniendo el metabolismo y evitando la colonización microbiana.

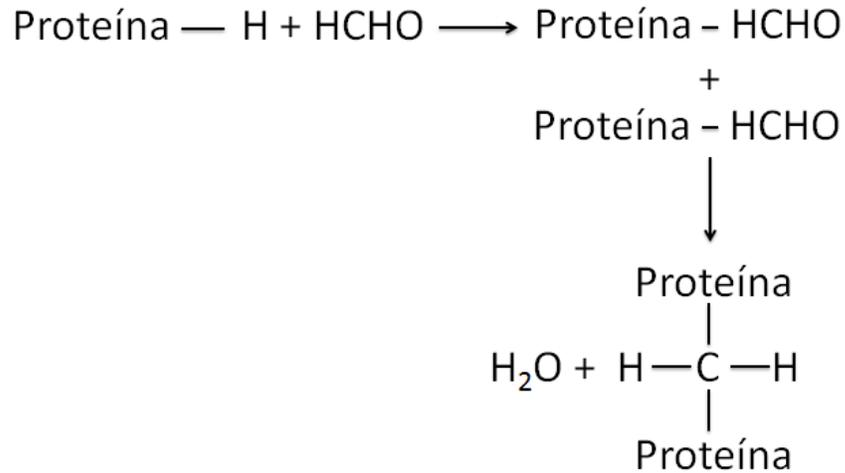


Figura 1. Formación de puentes metileno entre proteínas y formalina.

3.4 Formalina 10% tamponada y su interacción con macromoléculas

Si bien la formalina estabiliza estructuralmente los tejidos, puede producir cambios químicos determinados por la ubicación de las moléculas en una célula o bien por la biología de la misma, donde una inadecuada utilización de este fijador puede ir en desmedro de la integridad de macromoléculas como proteínas o de ácidos nucleicos como el ARN y ADN. Alguna de las causas de la degradación del material nuclear es la reticulación con las histonas circundantes, y su capacidad de reaccionar con nucleótidos (Howat, Wilson 2014). Esto último ocurre como resultado de la ruptura de puentes de hidrógenos y desestabilización de las bases nitrogenadas, creando sitios para la interacción química.

Un correcto procesamiento de la muestra, con conocimiento sobre los tiempos adecuados para fijación y la posterior inclusión del tejido en parafina, permite que se conserve en el tiempo de tal forma, que tanto las proteínas y los ácidos nucleicos, podrían ser analizados con diversas técnicas incluso después de largos períodos de almacenamiento. Por el contrario, un inadecuado procesamiento podría darse por una deficiente fijación o por un exceso de esta.

En cuanto al empleo de la formalina 10% tamponada, en la práctica los tejidos se fijan con regularidad durante 24 a 48 horas (Nam *et al*, 2014; Srinivasan *et al*, 2002), sin embargo, diversos autores han propuesto diferentes tiempos para una idónea fijación.

Srinivasan *et al*, (2002), como medida para la conservación de ácidos nucleicos, plantea un tiempo de fijación de 3 a 6 horas, agregando además que un tiempo de fijación más extenso no afectaría la histopatología. Por su parte Nam *et al*, (2014), propone una fijación en formalina de 24 horas, lo que permitiría reproducibilidad del ADN para un acertado diagnóstico molecular. Este tiempo también es sugerido por Singhal *et al*, (2016), mediante un estudio en lenguas de cabras para evaluar el seccionamiento y tinción del tejido, ocurriendo lo mismo con Howat and Wilson, (2014), que utilizaron este rango de tiempo de fijación en muestras de ratones BALB/c, para hacer una comparación entre métodos fijadores. Por otro lado, Grizzle, (2009) y Atanesyan *et al*, (2017), mencionan una fijación de 12 a 24 horas, mientras que Gunn *et al*, (2018), indica un intervalo más amplio de 6 a 72 horas para una mejor calidad del ADN.

De lo anterior se desprende que, si bien se han hecho estudios con formalina 10% tamponada, en la actualidad no existe un consenso en cuanto al tiempo de fijación óptimo que permita la conservación e integridad de cadenas de ADN, que facilite su posterior análisis mediante métodos como electroforesis, espectrometría de masas y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Patel *et al*, 2016).

3.5 Citoqueratinas 5 como marcador epitelial

Las citoqueratinas (CKs) son proteínas constitutivas del citoesqueleto celular cuya principal función es proteger a las células epiteliales del estrés mecánico, por lo que mantienen la estabilidad celular (Martínez, Martínez 2010). Al ser parte del citoesqueleto, son unas de las últimas estructuras que se afectan en deformaciones completas del tejido, por lo que se usan como marcadores de estadios de cáncer (Vasca *et al.*, 2014).

La citoqueratina 5 (CK 5), se caracteriza por tener un peso molecular de 58 kDa, y se encuentra en el epitelio escamoso estratificado, en la capa basal, intermedia y en las células superficiales, además de estar presente en el epitelio de transición, mesotelio y epitelios complejos. Se encuentra asociada a otra proteína del citoesqueleto, citoqueratina 6 (CK 6), la cual tiene un peso molecular de 56 kDa, y se encuentra principalmente en epitelio escamoso (Chen *et al.*, 2011; Vasca *et al.*, 2014). Ambas CKs se encuentran en epitelio ortoqueratinizado, como lo es el epitelio gingival de ratón y con CKs similares al tejido humano. Genéticamente están determinadas por genes independientes, el gen para citoqueratina 6 no ha sido descrito para rata Wistar (*Rattus norvegicus*), pero para citoqueratina 5 se ha descrito que está presente en el cromosoma 7, es un gen que posee 8 exones y su ubicación exacta es 7q36 en genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/369017>). Por su estabilidad estos, siguen siendo los mejores marcadores para diferenciar epitelios en cavidad oral (Montenegro *et al.*, 1998).

Otra utilidad de las CKs, es la identificación de tipos moleculares de cáncer, como por ejemplo en el carcinoma escamocelular, que independiente de su origen, se caracteriza por la expresión de CKs en el epitelio estratificado (CK 5, CK 14 y CK 17) y la sobreexpresión de CK 6 y CK 16 en estratos de hiperproliferación celular.

3.6 Procesamiento histológico

El procesamiento histológico son el conjunto de pasos a seguir para preparar la muestra y obtener cortes histológicos que puedan ser observados mediante microscopía óptica, proceso que podría demorar en promedio entre 24 y 48 horas, posterior a la obtención de la muestra y la fijación de esta.

Este procedimiento debe seguir un orden secuencial, descrito en los siguientes pasos;

Deshidratación: consiste en la aplicación de alcohol etílico en concentraciones crecientes hasta alcanzar el alcohol absoluto, con el objetivo de eliminar el agua de los tejidos. Es imperante que las concentraciones sean crecientes, dado que la inmersión abrupta en alcohol produce la deformación del tejido.

Aclaramiento: proceso en el cual se ubica la muestra en un medio miscible con la parafina, usándose normalmente xilol o xileno, que reemplaza el etanol de las muestras previamente deshidratadas. Esta etapa recibe este nombre dado que el xilol, torna las muestras claras o transparentes.

Inclusión: ubicación de la muestra de tejido en un bloque de parafina, procedimiento auxiliado con barras de Leuckart, en las cuales se vierte parafina fundida a 60 °C, infiltrándose ésta en los espacios que ocupaba el agua al inicio del procesamiento, permitiendo así la obtención de bloques sólidos denominados tacos, lo que permite tener soporte de una dureza tal que permite su rebanamiento o corte.

Corte o sección: consiste en la obtención de cortes lo suficientemente delgados (4 – 5 μm) que permitan el paso de la luz. Este procedimiento se realiza con un micrótomo, que permita regular el tamaño del corte deseado, según requerimientos.

3.7 Extracción de ADN

La extracción de ADN a partir de las muestras previamente emparafinadas, tiene numerosas finalidades como lo es el diagnóstico a partir de estudios moleculares de distintas enfermedades, siendo de gran importancia al estudiar la patogénesis del cáncer (Dedhia *et al*, 2007). La cantidad y calidad de ADN aislado puede variar de acuerdo al tejido y del procedimiento utilizado para su extracción (Gielda and Rigg, 2017).

Como se mencionó con anterioridad, la formalina incurre en la formación de enlaces cruzados entre ácidos nucleicos y proteínas, que, sumado a factores previos a la fijación como el tipo y cantidad de tejido, además del grado de autólisis y factores posteriores a la fijación como la temperatura y duración del almacenamiento (Gilbert *et al*, 2007), conducen a una inminente degradación del ADN. Por esta razón, mediante protocolos de extracción estándar se obtiene un ADN fragmentado, que suele poseer entre 50 y 300 pares de bases (pb) de longitud, dificultando con ello la amplificación del ADN de alto peso molecular, necesario para estudios genotípicos y de mutaciones (Bonin *et al*, 2003; Dedhia *et al*, 2007; Gielda and Rigg, 2017; Okello *et al*, 2010).

La extracción y purificación de ácidos nucleicos consiste en aislar una gran cantidad de moléculas y separarlas de todas las demás presentes en las células (Watson *et al*, 2006). Existe gran variedad de técnicas para desarrollar este procedimiento, pero la utilización de una u otra dependerá del tipo de ácido nucleico a aislar (ADN genómico, ARN total, ARN mensajero, etc.), del origen del ADN (tejidos frescos, emparafinados, congelados, etc.) y de la utilización del material genético extraído.

Muy utilizados para el aislamiento de ácidos nucleicos, son los kits comerciales de extracción, teniendo mejores propiedades en relación a métodos convencionales (Gilbert *et al*, 2007), ofreciendo una serie de protocolos para el aislamiento de ADN en diferentes tejidos, lo que facilita y vuelve más eficaz el proceso de extracción genómica.

Sea cual sea el método utilizado, la extracción de ADN genómico la podemos dividir en 5 pasos de manera general, mencionados a continuación:

1. Ruptura de las células

Destacan en los métodos de lisis celular;

- Detergentes: utilizados con el fin de provocar ruptura de la membrana celular y favorecer la extracción de ADN de parásitos, células en cultivo y tejidos. Los más utilizados son el dodecil sulfato de sodio (SDS), nonidet-P40 (NP40) y sarkosil.

- Enzimas: se usan bastante en la extracción de ADN bacteriano y plasmídico. La enzima más utilizada es la lisozima, dado su mecanismo de acción donde desestabiliza la pared celular.

- Agentes desnaturantes: su mecanismo de acción es cambiar la estructura base de proteínas y ácidos nucleicos. Pueden ser usados en distintos tejidos y tipos celulares. Uno de los más conocidos es el cloruro de guanidina (Puerta and Ureña, 2005).

2. Eliminación de proteínas

Para esto se utilizan enzimas proteolíticas como la proteinasa K, donde se adiciona a este proceso enzimático el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para inhibir la acción de las ADNasas (Puerta and Ureña, 2005).

3. Eliminación de ARN

Se busca eliminar el ARN presente a partir de enzimas ARNasas, como por ejemplo la ribonucleasa A de páncreas de bovino (Zavala, 2005).

4. Extracción de proteínas

Para la eliminación de proteínas se utilizan solventes orgánicos como el fenol, cuyo mecanismo de acción es la desnaturalización, ubicándose estas en la interfase, mientras que el ADN se ubica en la fase acuosa (Puerta and Ureña, 2005).

5. Precipitación del ADN

Para obtener el ADN concentrado se utilizan una serie de sales tales como; acetato de sodio, acetato de potasio, acetato de amonio y cloruro de litio, entre otras. Posterior a ello el ADN debe ser precipitado con etanol absoluto, compuesto que luego será eliminado mediante incubación. Finalmente, la muestra es rehidratada en el amortiguador adecuado para ser cuantificado (Zavala, 2005).

3.8 Relación A260 / A280

Las biopsias contienen un gran número de proteínas que exceden en cantidad a los ácidos nucleicos (Held, 2001). Es por esto que, para estimar la concentración y pureza del ADN, se utilizan métodos como la espectrofotometría UV, debido a su sencillez y confiabilidad (Schipor *et al*, 2016). Para dicho método se utiliza un equipo llamado espectrofotómetro que trabaja a diversas longitudes de ondas, por ejemplo la mayoría de las proteínas presentan absorción a 280 nm, mientras que las bases nitrogenadas del ADN, absorben luz UV a una longitud de onda de 260 nm (Leonard, 2016).

Es así como a esta longitud de onda una disolución con una concentración de 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ presenta una absorbancia de 50 unidades de absorbancia (UA) o unidades ópticas (mide la absorción de un elemento óptico por unidad de distancia) en ADN bicatenario. Por lo tanto, la cantidad absoluta de una muestra se puede determinar mediante la siguiente ecuación (Jiménez, 2003).

$$\text{ADN ng /}\mu\text{l} = \text{absorbancia 260 nm} \times \text{factor dilución} \times 50 \text{ ng /ml}$$

Para determinar la pureza del ADN se establece la relación A260 / A280 dada por la siguiente fórmula:

$$\text{Pureza ADN} = \text{absorbancia 260 nm} / \text{absorbancia 280 nm}$$

Donde una relación entre 1,8 y 2 indica la presencia de ADN puro. Cocientes menores a 1,8 indican la presencia de contaminantes, en su mayoría proteínas. Mientras que cocientes mayores a este rango indicarían que la muestra puede estar contaminada con cloroformo, fenol u otros contaminantes (Fonseca *et al*, 2010).

3.9 Electroforesis

La electroforesis es uno de los métodos más utilizados para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN (Puerta and Ureña, 2005), así como también mezclas complejas de proteínas y otras biomoléculas. La técnica consiste en la separación de moléculas sometidas en un campo eléctrico a través de una matriz porosa compuesta por polímeros, donde su migración depende de la forma, tamaño, carga y composición química. En el caso del ADN, que posee carga negativa por la presencia de grupos fosfatos, migran en la cámara electroforética desde el polo negativo hacia el positivo (Alberts *et al*, 2007).

Este movimiento de moléculas es representado por la siguiente ecuación (Segal and Ortega, 2005).

$$v = \frac{Eq}{f}$$

Donde, E = campo eléctrico en volts / cm, q = carga neta de la molécula y f = coeficiente de fricción (depende de la masa y de la forma de la molécula) v = Velocidad de migración de la molécula.

Al migrar las moléculas en la cámara electroforética se generan bandas, donde cada una corresponde a ADN de tamaño específico, el cual se determina comparando el gel con un marcador de peso molecular que contiene fragmentos de ADN de tamaño conocido. Por lo tanto, el tamaño de un fragmento se establece por la distancia de migración que presenta en relación a los fragmentos del estándar utilizado (Zavala, 2005).

Las bandas de ADN que se generan en el gel de agarosa son invisibles, por lo que deben ser observadas mediante tinción con sustancias que se intercalan en el ADN y fluorescen bajo luz ultravioleta (Alberts *et al*, 2007).

La migración de los fragmentos de ADN en gel de agarosa depende de varios parámetros:

1. El tamaño del fragmento: las moléculas de ADN migran en el gel de manera inversamente proporcional al log 10 de sus pesos moleculares, por lo tanto, a menor tamaño del fragmento, mayor es su velocidad de migración (Puerta and Ureña, 2005).
2. La concentración de la agarosa: la concentración de agarosa determina el tamaño del poro del soporte y mientras más pequeño es este, las moléculas que se resuelven mejor son las de menor tamaño (Lee *et al*, 2012).
3. La corriente aplicada: a voltajes bajos, el movimiento de las moléculas lineales de ADN es proporcional al voltaje aplicado. Pero si la fuerza del campo es elevada, la migración de los fragmentos con mayor peso molecular se ve incrementada. Para una adecuada resolución de los fragmentos, la corriente aplicada no debe exceder de 5 V / cm (Zavala, 2005).
4. El amortiguador utilizado: el movimiento del ADN se ve influenciado por la composición y fuerza iónica del amortiguador, por ende, el procedimiento se debe realizar con una fuerza iónica suficiente para lograr la conductancia eléctrica, sin provocar la desnaturación del ADN (Puerta and Ureña, 2005).

3.10 Diagnóstico molecular

Uno de los grandes desafíos médicos en la actualidad es predecir el riesgo de padecer patologías en determinados individuos (Courchoud and Pérez, 2016), es aquí en donde aparece el diagnóstico molecular, que constituyen técnicas de biología molecular en beneficio de la salud humana, que van detectando y/o cuantificando secuencias genéticas específicas de ADN, ácido ribonucleico (ARN) o proteínas.

Su aplicación se ha enfocado en enfermedades infecciosas, oncológicas y genéticas (Corvalán *et al*, 2003).

Existen ciertas moléculas presentes en un individuo que podrían ser determinantes de padecimientos presentes o futuros de alguna enfermedad, desprendiéndose el término “biomarcador” o “marcador biológico”, refiriéndose a un estado de salud observada fuera del paciente, en una muestra, que se puede medir de forma precisa y reproducible (Strimbu and Tavel, 2010).

A su vez, el Instituto Nacional de Salud (por sus siglas en inglés, NIH), definió biomarcador como “una característica que se mide objetivamente y se evalúa como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica”. Los biomarcadores poseen variaciones genéticas de las proteínas y diferencias en la expresión metabólica de los diversos fluidos corporales, células o tejidos (Günther *et al*, 2015), donde las pruebas de diagnóstico molecular detectan secuencias específicas en el ADN o ARN que pueden o no estar asociados con la enfermedad (Firdos, 2014).

Estos los podemos clasificar en dos tipos: en una etapa previa se pueden reconocer biomarcadores de exposición, útiles en la predicción del riesgo, y por otro lado están biomarcadores de la enfermedad, que se utilizan en la detección, diagnóstico y monitoreo de la progresión de esta, una vez instaurada, siendo ambos de gran utilidad para la detección temprana de algún padecimiento.

En odontología, este tipo de técnicas pueden ser utilizadas para estudios de cánceres relacionados con el tabaquismo, ya que el ADN de células bucales podría actuar como biomarcador de riesgo por la exposición al humo del cigarrillo (Cao *et al*, 2003). Incluso, gracias a su alta sensibilidad y especificidad se pueden diagnosticar otras patologías orales de mayor recurrencia como son las víricas o bien, enfermedades micóticas tan frecuentes como la candidiasis (Corvalán *et al*, 2003; Mahaisavariya *et al*, 2005). Sin embargo, dado los tiempos críticos de manejo, la necesidad de almacenaje y los altos costos, en muchas ocasiones no son el método de estudio a elección (Mayeux, 2004).

Ante lo último su utilidad radica en diagnósticos tempranos, especialmente en el virus del papiloma humano que, si bien a nivel oral puede generar lesiones detectables por sus características morfológicas, estas se presentan regularmente en estados tardíos y cuando las condiciones ambientales e inmunológicas lo permiten (Melo *et al*, 2005). Es decir, con normalidad los virus se encuentran silentes, por lo que las pruebas moleculares no sólo son de utilidad en la detección del virus, sino que también en la tipificación del mismo, ayudando de esta forma a hacer un seguimiento del individuo portador, para una adecuada prevención, control de factores de riesgo y de ser necesario, dar tratamiento oportuno una vez expresado el virus (Suárez *et al*, 2006).

Bajo la misma premisa, se puede hacer diagnóstico molecular en oncología, donde los métodos habituales de diagnóstico suelen ser herramientas tardías, y para esto, los mejores biomarcadores son los ácidos nucleicos, dado que aportarán información específica sobre los cambios celulares o morfológicos a los que podría verse sometido un tejido.

Ningún estudio molecular puede ser llevado a cabo con inadecuado manejo de las biopsias, y es ahí donde radica la importancia de un procesamiento histológico meticuloso, donde se respeten por ejemplo los tiempos de fijación. Para evaluar la integridad de este recurso molecular tan importante como lo es el ADN, pueden utilizarse métodos de laboratorio como lo es el PCR.

De forma general, esta técnica permite la amplificación de una región específica de ADN utilizando partidores o secuencias de ADN que delimitan la zona de amplificación. A partir de una copia de la región a amplificar se obtienen millones de copias, lo que permite su detección y de esta forma se evidencia la presencia de la región de ADN en una muestra

determinada. Dada la naturaleza de la técnica, la alta especificidad de la PCR viene dada por la hibridación de los partidores complementarios a la secuencia blanco y su elevada sensibilidad a la baja cantidad de ADN que requiere para iniciar la amplificación.

3.11 Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica determinada hebra de ADN millones de veces durante varios ciclos, obteniéndose una copia fiel de la secuencia elegida. Para dicha acción, se aprovecha la actividad enzimática del ADN polimerasa (Taq ADN polimerasa), que tiene naturalmente la capacidad de síntesis de ADN.

Para guiar la PCR, son necesarios los denominados cebadores o *primers*, que son secuencias de oligonucleótidos que delimitan la secuencia que se planea amplificar y son complementarios a ésta. El tamaño oscila entre 15-25 pares de bases (pb) y como requisito, la cantidad de puentes G-C no debiese superar el 55% de bases del total de la secuencia. Se han de necesitar dos tipos de cebadores para guiar a la PCR, uno denominada «forward» o sentido y otro «reverse» o antisentido; ambas deben estar diseñadas para que hibriden con el templado (ADN molde) y las cadenas de ácido nucleico puedan ser extendidas y amplificadas por la Taq polimerasa en dirección 5'-3' (Tamay de Dios *et al*, 2013).

La reacción se divide en 3 etapas:

Desnaturalización; para esto, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos; el tiempo dependerá de los tipos de pares de bases presentes, por ejemplo, ante una gran cantidad de bases G-C, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido al apareamiento de estas bases mediante tres enlaces del tipo puente hidrógeno, a diferencia de las bases A-T que poseen solo dos. Cuando termina esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso. Cabe destacar que, la Taq ADN polimerasa se considera una enzima termoestable por su capacidad para mantener su funcionalidad a temperaturas altas.

Hibridación; en esta etapa, los cebadores se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para obtener el complejo templado-cebadores, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura *melting* (T_m) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C.

Extensión; en esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-*primers* y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's (nucleótidos) complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional, considerándose por ello una enzima termoestable.

Finalizado el ciclo, se habrán formado los amplicones, nombre dado a las nuevas secuencias amplificadas de ADN, con una longitud determinada por el número total de pares de bases, número conocido previamente por quien realiza el estudio.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el rango de tiempo máximo de fijación en formalina 10% tamponada para amplificar el gen de la citoqueratina 5 en lenguas de rata Wistar mediante reacción en cadena de polimerasa?

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Establecer el tiempo máximo de fijación con formalina 10% tamponada para la amplificación del gen de citoqueratina 5 en lenguas de rata Wistar (*Rattus norvegicus*) mediante reacción en cadena de polimerasa.

5.2 Objetivos Específicos

- Evaluar integridad de los amplicones de citoqueratina 5 en lenguas de rata Wistar, obtenidos mediante reacción en cadena de la polimerasa, usando para ello electroforesis.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Muestras

Se utilizaron un total de 10 muestras correspondientes a lenguas de rata Wistar (*Rattus norvegicus*). El material de estudio fue parte del proyecto “Crema nanocicatrizante – Nanoderm” (Proyecto COPEC-UC) dirigido por el Dr. Luis Guzmán, el cual fue aprobado por el Comité Institucional de Ética Cuidado y Uso de Animales de laboratorio (CIEQUAL) de la Universidad de Talca (Folio 2017-12-B) (Anexo 1).

6.2 Diseño experimental

Las muestras fueron fijadas en FT 10% a tiempos variables (Cuadro 1). Posterior a la fijación de cada muestra, se realizó el procesamiento histológico en el STP 120 Spin Tissue Processor (Thermo scientific, Walldorf, Alemania) siguiendo el correspondiente protocolo; deshidratación de muestras en alcohol en forma ascendente, aclaramiento en xileno e inclusión en parafina histológica. Dicho procedimiento fue realizado en el laboratorio de Patología Oral de la Universidad de Talca en el año 2018.

CUADRO 1: TIEMPOS DE FIJACIÓN EN FORMALINA 10% TAMPONADA DE MUESTRAS DE LENGUA DE RATA WISTAR.

Muestra	Tiempo de fijación (horas)	Tiempo de fijación (días)
1	7 horas	
2	10 horas	
3	12 horas	
4	24 horas	1 día
5	48 horas	2 días
6	72 horas	3 días
7	96 horas	4 días
8	120 horas	5 días
9	144 horas	6 días
10	168 horas	7 días

6.3 Extracción ADN

Una vez seleccionados los bloques de parafina, se realizó la extracción de DNA mediante Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, USA) siguiendo el protocolo del fabricante con algunas modificaciones.

1) Por cada muestra se cortaron en el micrótopo las 3 primeras secciones de 5 µm que están en contacto con el ambiente, y fueron descartadas.

- 2) Se cortaron 120 secciones de 10 μm de espesor para la obtención de ADN.
- 3) Las secciones obtenidas fueron depositadas en un microtubo de 1,5 ml y posteriormente se añadió 1 ml de xileno a la muestra. Se cerró y agitó en el vortex durante 15 segundos.
- 4) Se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 min a 20 °C.
- 5) Cuidadosamente y mediante pipeteado se quitó el sobrenadante (sin quitar ninguno de los precipitados).
- 6) Se repitieron los pasos 3, 4 y 5 respectivamente, dos veces más hasta completar 3 lavados con xileno.
- 7) Luego se añadió 1 ml de etanol absoluto (100%) al precipitado, y se mezcló en vortex 15 segundos.
- 8) Se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 min a 20 °C.
- 9) Cuidadosamente y mediante pipeteado se quitó el sobrenadante (sin quitar ninguno de los precipitados).
- 10) Se abrió el tubo y se incubó a 37 °C durante 20 minutos para evaporar el etanol residual.
- 12) Se adicionó 600 μL de solución de lisis nuclear (kit) y se homogeneizó en vortex por 15 segundos.
- 13) Se incubó a 65 °C por 20 minutos. Luego los microtubos se enfriaron a temperatura ambiente.
- 14) Se adicionaron 3 μl de solución de RNasas (kit) a cada tubo con muestra y se mezclaron en vortex por 10 segundos. Se incubaron por 20 minutos a 37 °C. Luego se enfriaron los microtubos a temperatura ambiente.
- 15) Se adicionaron 200 μl de solución precipitante de proteínas (kit). Se homogeneizó en vortex por 15 segundos y se dejó en freezer por 27 horas.
- 16) Posteriormente se centrifugó a 12.000 rpm por 20 minutos.
- 17) Se transfirió cuidadosamente 600 μl del sobrenadante a otro tubo de 1,5 ml que contenía 600 μl de isopropanol y se mezcló por pipeteo lentamente.

- 18) Se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 minutos.
- 19) Se descartó el sobrenadante y se adicionó 600 µL de etanol 70% frío. Se homogenizó en vortex por 15 segundos y se centrifugó a 12.000 rpm por 20 minutos.
- 20) Se repitió el paso 19
- 21) Posteriormente se eliminó sobrenadante
- 22) Se dejó evaporar el etanol a 37 °C.
- 3) Se rehidrató con 30 µl de agua destilada estéril a 65 °C para su posterior análisis.

6.4 Cuantificación espectrofotométrica del ADN

Se realizó un análisis espectrofotométrico UV al ADN purificado para obtener la concentración de éste y determinar la relación A260/280 para conocer la pureza del ácido nucleico obtenido. Para ello se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop Tecan, las lecturas se realizaron con 2 µl de cada una de las muestras junto al blanco correspondiente (Howat, Wilson 2014).

6.5 Gel de agarosa

Se prepararon 50 ml de agarosa al 1%, en 50 ml de tampón TAE 1X con un pH 8,3 (Tris-Acetato 0,04M, EDTA 0,001M), adicionando 2 µl de gel red 1X (Gel Red en DMSO, Biotium). La agarosa fue calentada en un horno microondas hasta que se disolvió completamente y luego se depositó en la cámara electroforética hasta la solidificación por 20 minutos a T° ambiente, posterior a ello la cámara se cubrió con 150 ml de tampón TAE 1X (Cao *et al*, 2003).

6.6 Diseño de cebadores para beta actina y queratina 5

El diseño de los cebadores (*primers*) se realizó buscando la secuencia del gen en la base de datos del GenBank para la especie *Rattus norvegicus*, el número de secuencia utilizada fue NM_031144.3 para beta actina (ACTB) y NM_183333.1 para citoqueratina 5 (KRT5), se seleccionaron los cebadores y fueron analizados en el programa de Sigma Aldrich para evaluar los porcentajes de CG (citosina-guanina), formación de dímeros y Tm óptima, una vez seleccionados los cebadores fueron sintetizados por la empresa Genexpress.

Los cebadores para la amplificación de gen control de beta actina se indican a continuación y el amplicón posee 470 pb.

FW: CTAGGCACCA GGGTGTGA

RW: GGTCAGGATCTTCATGAGGT

Los cebadores para la amplificación de gen para citoqueratina 5 se indican a continuación y el amplicón posee 217 pb.

FW: TCAAGAAGCAGTGTGCCAAC

RW: TCCAGCAGCTTCCTGTAGGT

Para los controles se utilizó ADN extraído de tejido sin fijar de *Rattus norvegicus* correspondiente al control positivo y como control negativo una mezcla de reacción con todos los componentes excepto ADN molde.

6.7 Amplificación de ADN por reacción en cadena de polimerasa

La amplificación se realizó con SapphireAmp fast PCR hot start master mix (Takara Bio INC., Japan). La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 50 µl, en las siguientes condiciones:

Master mix 2X 25 μ l; cebador “forward” y “reverse” a una concentración final de 0,2 μ M; ADN molde (muestras) se ajustaron a una concentración de 50 - 60 ng y agua suficiente para completar el volumen de 50 μ l.

El programa del termociclador DNA Engine® Thermal Cycler (Bio-Rad laboratories, Inc, USA) utilizado fue:

Paso 1- 95 °C por 5 segundos

Paso 2 - 95 °C por 5 segundos

Paso 3 - 61 °C por 45 segundos

Paso 4 - 72 °C por 1 minuto

Paso 5 - volver a paso 2, 3 y 4 (30 veces)

Paso 6 - 72 °C por 10 minutos

Paso 7 - 4 °C indefinido

6.8 Corrida electroforética

Los productos de amplificación obtenidos por reacción en cadena de la polimerasa (pPCR) fueron cargados en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X con Gelred. La corrida electroforética se realizó a 80 volts durante 50 minutos. Se utilizó un marcador de peso molecular (2 μ l de tampón de carga (azul de bromofenol y glicerol en agua)) y 8 μ l de 1Kb DNA Plus Ladder (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) que permitió determinar el tamaño de las bandas. Se tomaron fotos del gel en un transluminador UVP BioDoc- it™ System con luz UV.

Si el producto de PCR obtenido es visualizado, implica que el ADN en esa muestra es íntegro.

7. RESULTADOS

7.1 Cuantificación espectrofotométrica del ADN

Para obtener la concentración de ADN y determinar la pureza del ácido nucleico obtenido. Se analizaron las muestras, realizando lecturas con 2 µl de cada una, junto al blanco correspondiente. Obteniéndose los datos del cuadro 2.

CUADRO 2. CONCENTRACIÓN Y RELACIÓN A260 / A280 DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS POR CADA TIEMPO DE FIJACIÓN

Muestra	Tiempo de fijación	ng/ul	A260 / 280
1	7 horas	59	1,81
2	10 horas	90,9	2,1
3	12 horas	288,7	1,91
4	1 día	67,4	1,71
5	2 días	65,9	1,54
6	3 días	81,5	1,7
7	4 días	117,7	1,81
8	5 días	82,9	1,53
9	6 días	150,2	1,78
10	7 días	129,7	1,86

De acuerdo a los resultados obtenidos por el espectrofotómetro la muestra correspondiente a las 10 horas presentó una mayor pureza, a su vez la muestra correspondiente a las 12 horas presentó mayor concentración de ADN.

7.2 Amplificación del gen de citoqueratina 5

A continuación, se realizó la amplificación del gen de la citoqueratina 5 mediante reacción en cadena de la polimerasa, dicha amplificación fue posteriormente evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa obteniéndose intensidades fluorescentes variables.

Se observa una fotografía de la electroforesis en gel de agarosa. Figura 2



Figura 2. Amplificación del gen para citoqueratina 5 en los carriles correspondientes a los 10 tiempos de fijación; 1: 7 horas, 2: 10 horas, 3: 12 horas, 4: 1 día, 5: 2 días, 6: 3 días, 7: 4 días, 8: 5 días, 9: 6 días, 10: 1 semana, PM: Marcador de peso molecular y control en carril +.

En los carriles 1 y 2 se aprecia una banda fluorescente de la amplificación para citoqueratina 5, correspondiente a los tiempos 7 y 10 horas respectivamente. Lo que indica la presencia de ADN íntegro.

8. DISCUSIÓN

El análisis genómico es una herramienta útil para el diagnóstico, pronóstico y lineamientos de tratamiento en los pacientes. En este sentido el material fijado en formalina si bien permite almacenar la muestra por largos períodos de tiempo, posee como limitante que la integridad de las moléculas presentes en ellas que pueden ser empleadas con los fines previamente indicados no siempre permanezcan disponibles e íntegros, condiciones asociadas principalmente a los tiempos de fijación en formalina previo al procesamiento histológico de la muestra (Howat, Wilson 2014).

En cuanto a los resultados obtenidos podemos señalar que en 2 muestras (7 horas y 2 días respectivamente) se obtuvo una baja concentración de ADN, en relación a trabajos similares (Mirmomeni *et al.*, 2010). Esto puede estar asociado al procesamiento histológico en cuanto a la cantidad de tejido ubicado en cada taco de parafina, influyendo además el corte de la lengua de rata y la disposición del mismo dentro del cubo, dado que esto sería determinante al momento de realizar la sección en el micrótopo, habiendo cortes con mayor densidad de tejido que otros. Se utilizó para el estudio una media de 120 cortes por muestra, sin embargo, para reducir el riesgo de baja concentración genómica en proporción a baja cantidad de tejido, en estudios posteriores, sería ideal aumentar la cantidad de cortes según lo permita el taco de parafina.

Otro aspecto que puede determinar la cantidad y calidad del ADN extraído es el kit de extracción utilizado. En este estudio se empleó un sistema de uso regular para sangre y tejido frescos el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, USA) para muestras que no han sido sometidos a procesos propios de análisis histológico convencional por lo que la fijación pudo ir en desmedro de la extracción del ácido nucleico (Heller MJ *et al.*, 1992). Es así que se han descrito otros sistemas específicos para obtener una adecuada muestra a partir de tejido fijado en formalina y embebido en parafina, de un mayor costo, pero con mejores resultados en cuanto a la cantidad de material obtenido (Ruiz-Fuentes JL *et al.*, 2015). De este modo una de las sugerencias para futuros estudios sería probar con otros sistemas más específicos que permitan mejorar los rendimientos y calidad del material de estudio

obtenido; ya que los principales obstáculos para la obtención de ADN de material parafinado para amplificación por PCR son la remoción de parafina y la purificación de ADN.

En la corrida electroforética de los productos de amplificación, se utilizó como control positivo el gen para beta actina correspondiente al carril +, que posee 470 pb, es decir, a partir de una muestra sin fijar en formalina es posible amplificar un gen de mayor tamaño que para el de citoqueratina 5 (217 pb). Dado que para las muestras de los carriles 3 al 10 no fue posible amplificar un gen de tamaño inferior como lo es el de citoqueratina 5 con 217 pb, se puede inferir que genes de este tamaño y mayores, son susceptibles a ser dañados por la sobreexposición a formalina, así como se ha descrito en otros trabajos dado que, la formalina rompe las hebras de ácidos nucleicos. A nivel de la PCR se recomienda para su éxito amplificar fragmentos menores de 200 pb (Masuda et al., 1999; Schoepp et al., 2004; Zafra et al., 2004) de genes multicopia y el uso de PCR anidada para aumentar sensibilidad y especificidad de los ensayos.

Han sido estudiados mediante PCR el gen de la beta actina y el gen LAT, de 129 y 115 pb respectivamente, para evaluar la presencia del virus herpes simple tipo 1, en estado de latencia, en ganglios humanos (Cepeda *et al* 2012). Lo antes expuesto ejemplifica la existencia de genes de menor tamaño, los cuales, podrían permanecer disponibles de manera intacta o débilmente alterados con mayores tiempos de fijación.

A mayor tiempo de fijación en formalina, mayor será el entrecruzamiento con proteínas y las modificaciones en ácidos nucleicos que llevan a degradación, fragmentación, metilación y alcalinización, afectando su calidad y cantidad, dificultando estudios posteriores.

9. CONCLUSIÓN

El movimiento del ADN en la electroforesis para las muestras 1 y 2 (7 y 10 horas respectivamente), indicaría la presencia de material genómico íntegro para la secuencia de ADN de la citoqueratina 5, caracterizada por presentar una banda de 217 pb, es decir, al intentar evaluar dicho gen bajo las condiciones actuales de estudio, el tiempo de fijación de los tejidos en formalina 10% tamponada no debiese superar las 10 horas.

Se obtuvieron muestras (3 a la 10) que no amplificaron pese a presentar una concentración de ADN adecuada, esto podría ser indicativo de la degradación del ADN, producto de una excesiva fijación.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walte P. Molecular Biology of the Cell. 5thEd. New York: Garland Science.2007.1392 páginas.
2. Atanesyan L, Steenkamer M, Horstman A, Moelans C, Schouten J, Savola S. Optimal Fixation Conditions and DNA Extraction Methods for MLPA Analysis on FFPE Tissue-Derived DNA. American Journal of Clinical Pathology. 2017; 147:60-68.
3. Bonin S. PCR analysis in archival postmortem tissues. Molecular Pathology. 2003; 56(>3):184-186.
4. Buesa R, Peshkov M. How much formalin is enough to fix tissues? Annals of Diagnostic Pathology. 2012; 16(3):202-209.
5. Cao W, Hashibe M, Rao J, Morgenstern H, Zhang Z. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. Cancer Detection and Prevention. 2003; 27(5):397-404.
6. Cepeda LJ, Adarme LV, Gallón LM, Martínez JA, Ávila SD, Sánchez SB, Castellanos JE. Detección de la presencia de antígeno y ADN de virus herpes simple tipo 1 en ganglios trigeminales humanos. Universitas Odontológica. 2012; 31(66):117-24.
7. Courchoud T, Pérez J. Biomarcadores y práctica clínica. An Sist Sanit Navar. 2016;39(1):5-8.
8. Corvalán A, Aguayo F, Lévicán J, Corvalán I. Biología molecular en Infectología. Parte II: Diagnóstico molecular de agentes infecciosos. Rev Chil Infect. 2003; 20(1): 26-38.
9. Dedhia P, Tarale S, Dhongde G, Khadapkar R, Das B. Evaluation of ADN Extraction Methods and Real Time PCR Optimization on Formalin-fixed Paraffin- Embedded Tissues. Asian Pac J Cancer Prev. 2007; 8(1):55-59.
10. Engel K, Moore H. Effects of preanalytical variables on the detection of proteins by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. Arch Pathol Lab Med.2011; 135(5):537-543.
11. Firdos A. Biotechnology in Medical Sciences. 1st Ed. London: CRC Press.2014. 405 páginas.

12. Fonseca D, Mateus H, Contreras N. 2010. *Prácticas de Laboratorio de Biología Molecular: Su aplicación en genética básica*. 1a Ed. Bogotá: Universidad del Rosario. 2010. 69 páginas.
13. Gartner L, Hiatt J. *Texto atlas de histología*. Distrito Federal, Mexico: Mc Graw Hill. 2002. 539 páginas.
14. Giolda L, Rigg S. Extraction of amplifiable DNA from embalmed human cadaver tissue. *BMC Res Notes*. 2007; 10(1):737.
15. Gilbert MT, Haselkorn T, Bunce M, Sanchez JJ, Lucas SB, Jewell LD, Van Marck E, Worobey M. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues— which methods are useful when? *PloS one*. 2007 Jun 20; 2(6):e537.
16. Ralf H, Christine G, Josefine HA. *Advances in pharmaceutical cell therapy: principles of cell-based biopharmaceuticals*. World Scientific; 2015 Sep 23.
17. Grizzle, W. Special symposium: fixation and tissue processing models. *Biotech Histochem*. 2009; 84(5):185-193.
18. Gunn SR, Govender S, Sims CL, Khurana A, Koo S, Scoggin J, Moore MW, Cotter PD. Reference size-matching, whole-genome amplification, and fluorescent labeling as a method for chromosomal microarray analysis of clinically actionable copy number alterations in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue. *J Mol Diagn*. 2018; S1525-1578(17):30253-2.
19. Heller MJ, Robinson RA, Burgart LJ, TenEyck CJ, Wilke WW. DNA extraction by sonication: a comparison of fresh, frozen, and paraffin-embedded tissues extracted for use in polymerase chain reaction assays. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 1992 Mar; 5(2):203-6.
20. Held P. Nucleic Acid Purity Assessment using A260/A280 Ratios. 2001. Senior Scientist & Applications Lab Manager. Disponible en <https://www.biotek.com/resources/application-notes/nucleic-acid-purity-assessment-using-a260/a280-ratios/> [Consultado el 11 de marzo de 2018].
21. Howat W, Wilson B. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods*. 2014; 70(1):12-19.
22. Jiménez A. *Manual de Neurogenética*. 1a Ed. Madrid: Ediciones Díaz de Santos. 2003. 295 páginas.

23. Lacave I, Garcia T. Atlas de inmunohistoquímica. 1 a Ed Madrid: Ediciones Díaz de Santos. 2012.448 páginas.
24. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp.* 2012;(62):3923
25. Leonard DG. *Molecular Pathology in Clinical Practice.* 2nd Ed. Dordrecht: Springer. 2016. 1001 páginas.
26. Martinez, R. *Fundamentos teóricos y prácticos de la histoquímica.* 1a Ed. Madrid: Editorial CSIC - CSIC Press. 2008. 783 páginas.
27. Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M, Okubok. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27(22):4436.
28. Mayeux R. Biomarkers: Potential Uses and Limitations. *NeuroRx.*2004; 1(2):182-188.
29. Melo A, Roa I, Montenegro S, Capurro I, Roa J. Estudio comparativo de detección del virus papiloma humano (VPH) en muestras citológicas y biopsias de cuello uterino. *Rev Méd Chile.* 2005.
30. Mirmomeni M, Sajjadi Majd S, Sisakhtnezhad S, Doranegardf .Comparison of the three methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues.*J Biol Sci.* 2010;10(3):261-266
31. Montero C. *Manual Teórico-Práctico De Técnicas Inmunohistoquímicas.* San Luis Potosí: Editorial universitaria Potosina. 1998. 100 páginas.
32. Morel G. *Hibridación in situ en microscopía óptica.* 1a Ed. Santiago de Compostela: Univ Santiago de Compostela. 2000. 309 páginas.
33. Nam SK, Im J, Kwak Y, Han N, Nam KH, Seo AN, Lee HS. Effects of fixation and storage of human tissue samples on nucleic Acid preservation. *Korean J Pathol.* 2014; 48(1):36-42.
34. Patel S, Stracke JO, Altenburger U, Mahler HC, Metzger P, Shende P, Jere D.Prediction of intraocular antibody drug stability using ex-vivo ocular model. *Eur J Pharm Biopharm.* 2016; 112(1):177-186.
35. Puerta CJ, Ureña CP. *Prácticas de biología molecular.* Pontificia Universidad Javeriana; 2005.

36. Ruiz-Fuentes JL, Diaz A, Entenza AE, Frion Y. Comparison of four DNA extraction methods.2015.
37. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985 Dec 20; 230(4732):1350-4.
38. Schipor S, Vladiu S, Baci A, Niculescu A, Caragheorghopol A, Iancu I, Plesa A, Popescu A, Manda D. A comparative analysis of three methods used for RNA quantitation. *Romanian Reports in Physics*. 2016; 68(3):1178-1188.
39. Schoepp Rj, Morin Md, Martinez Mj, Kulesh Da, Hensley L, Geisberttw. Detection and identification of Variola virus in fixed human tissue after prolonged archival storage. *Lab Invest*. 2004;84(1):41-48
40. Segal C, Ortega G. (Ed.). *Manual de prácticas Biología molecular de la célula I*. 1a Ed. Ciudad de México: UNAM. 2005. 121 páginas.
41. Seoane, J, González A, Velo J. La biopsia oral en el contexto del precáncer y del cáncer oral. *Avances en Odontoestomatología*. 2008; 24(1):89-96.
42. Silva J, Soares L, Moreira G. Frecuencia de patologías bucais diagnosticadas em clínica odontológica universitaria. *Rev Cubana Estomatol*. 2014; 51(1):43-54.
43. Singhal P, Singh N, Sreedhar G, Banerjee S, Batra M, Garg A. Evaluation of histomorphometric changes in tissue architecture in relation to alteration in fixation protocol – An in vitro study. *J Clin Diagn Res*. 2016; 10(8): ZC28-ZC32.
44. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. *Am J Pathol*. 2002; 161(6):1961-1971.
45. Strimbu K, Tavel J. What are Biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*.2010; 5(6): 463-466.
46. Suárez A, Esquivias J, Vidart J, Picazo J. Detección y tipificación mediante biología molecular del virus del papiloma humano en muestras genitales. *Rev Esp Quimioterap*. 2006; 19(2):161-166.
47. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*. 2013 May; 2(2):70-8.

48. Watson J, Baker T, Bell S, Gann A, Levine M, Losick R. *Biología molecular del gen*. 5ta Ed. Madrid: Ed. Médica Panamericana. 2006. 776 páginas.
49. Zafra G, Flórez Ó, González C. Influencia del método de desparafinación y el tiempo de almacenamiento en la extracción de DNA a partir de tejidos de archivo. *Salud UIS*. 2004; 36:73-79.
50. Zhang J, Yan M, Liang J, Li M, Yao Z. A novel KRT5 mutation associated with generalized severe epidermolysis bullosa simplex in a 2-year-old Chinese boy. *Experimental and therapeutic medicine*. 2016; 12(5):2823-6. Epub 2016/11/25.
51. Zavala J. *Manual de Técnicas Básicas de Biología Molecular*. 1a Ed. Mérida: UADY. 2005. 195 páginas.

11. ANEXO

Certificado de evaluación del proyecto del comité institucional de ética cuidado y uso e animales de laboratorio.



Vicerrectoría Académica
Dirección de Investigación



CERTIFICADO DE EVALUACIÓN DE PROYECTO DEL COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE LABORATORIO (CIEQUAL)

Fecha: 11 de abril de 2018
Folio: 2017-12-B

1. Miembros del CIEQUAL participantes

Nombre	Profesión	Cargo
María Cristina Theoduloz Lafuente	Bióloga	Depto. de Bioquímica Clínica e Inmunohematología, Fac. Cs. Salud
Mónica Carrasco Pastenes	Bioquímica	Depto. de Cs. Básicas Biomédicas, Fac. Cs. Salud
Alex Soto Poblete	Estadístico	Instituto de Matemáticas y Física
Miguel Morales Villena	Licenciado en Pedagogía Básica	Miembro CIEQUAL
Daniel Droguett Ossa	Cirujano Dentista	Depto. de Estomatología, Fac. Cs. Salud

- Título completo del proyecto: Crema nanocicatrizante - Nanoderm.
- Nombre del investigador responsable: Luis Guzmán J.
- Institución: Universidad de Talca Unidad académica: Depto. de Bioquímica Clínica e Inmunohematología, Fac. de Cs. de la Salud.
- Documentos revisados: Protocolo de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio UTALCA y carta conductora de solicitud de enmienda.
- Análisis: Se acusa recibo de los antecedentes entregados, informe de seguimiento y se realizan las siguientes sugerencias:
 - Actualizar protocolo en la sección del manejo analgésico como SOS a tramadol. Sumar dosis tramadol subcutánea post cirugía.
 - Se sugiere para futuros experimentos tender a ocupar material estéril individual por animales en la inducción de la herida.
 - Cualquier cambio de compuesto o producto farmacológico debe ser visado por el CIEQUAL (cambio de ketamina a tiopental).
 - Se solicita actualizar el documento del protocolo experimental con los nuevos antecedentes.
- Resolución: Se aprueba el protocolo experimental y solicita enviar la enmienda planteada en un documento en papel con las firmas correspondientes.



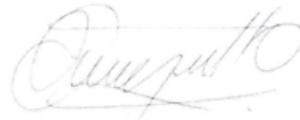
Daniel Droguett Ossa
Presidente



Mónica Carrasco Pastenes
Secretario



María Cristina Theodulóz Lafuente
Vocal



Miguel Morales Villena
Vocal



Alex Soto Poblete
Vocal