



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Comparación de dos técnicas para la obtención de proteínas a partir
de TRizol reactivo en cultivos celulares

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biólogo

P R E S E N T A:

Muñoz Godínez Ricardo

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Carolina García de Alba Rivas



2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Muñoz
Godinez
Ricardo
Tel. 57922816
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
304262014

2. Datos del Tutor

Dra.
Carolina
García de Alba
Rivas

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Annie
Pardo
Cemo

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Rafael
Camacho
Carranza

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Victor Manuel
Ruiz
López

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Laura
Kawasaki
Watanabe

7. Datos de la tesis

Comparación de dos técnicas para la obtención de proteínas a partir de TRIzol reactivo en cultivos celulares
39 p
2012

Agradecimientos

En primer lugar agradezco a la Dra. Carolina García de Alba Rivas por su apoyo, dirección, su tiempo dedicado y por la confianza en mí.

Gracias a mis sinodales: Dra. Laura Kawasaki Watanabe, Dr. Rafael Camacho Carranza por su tiempo y atención dedicado a mi trabajo. En especial a la Dra. Annie Pardo Cemo por su apoyo y permitirme formar parte del grupo y al Dr. Victor Manuel Ruiz López por su atención, amistad y apoyo en mi estancia en el laboratorio de biología molecular del INER, gracias a todos por las contribuciones que hicieron a este trabajo.

También quiero agradecer a las personas que me ayudaron durante la realización de este trabajo: Lalo por enseñarme a hacer western blot y su apoyo en las dudas que tenía, a la M. en C. Carina Becerril Berrocal por su apoyo y dudas que me resolvió. Y en general a todas las personas del laboratorio de biología molecular y celular del INER por su amistad.

Al INER y al Dr. Moises Selman por abrirme las puertas de esta institución para poder realizar este trabajo.

Dedicatoria

Llegar hasta aquí no hubiera sido posible sin el apoyo mis padres. Muñoz Flores Julián y María Estela Godínez Castro. Cuando la multitud clava sus ojos por primera vez en un hombre y se aplaude, la lucha empieza; hay que poner más lejos la intención y la esperanza; la gloria es más difícil, pero más digna, créanme que trataré de llegar a ella. Por el momento quiero agradecer enormemente su confianza en mí, su paciencia infinita y todo el apoyo que me brindaron durante todos estos años, saben que los quiero y que siempre trataré de llenar sus expectativas sin decepcionarlos. Esta tesis se las dedico a ustedes: los mejores padres!!!

A mis hermanos Isabel y Julián por ser una bonita familia, sin dejar de mencionar a mi cuñado y sobrinas.

También quiero dedicar esta tesis a todos mis amigos (la bandi) y a la canchita de Ciencias por tantos momentos de felicidad. Y a Picio Grisel por estar conmigo en las buenas y en las malas.

*Comprendamos qué se proponen nuestros
genes egoístas, pues entonces tendremos
al menos la oportunidad de modificar sus designios,
algo a que ninguna otra especie ha aspirado jamás.*

Richard Dawkins

INDICE

	Página
I. Introducción	
1.1 El RNA	1
1.2 Las proteínas	2
1.2.1 Etapas de la síntesis de las proteínas	3
1.2.2 Estructura de las proteínas	3
1.3 Técnicas estándar o comunes para obtención de RNA y Proteínas	4
1.4 Métodos para extracción del RNA o proteínas	4
1.4.1 Método de guanidín-fenol-cloroformo (GPC)	4
1.4.2 Extracción de RNA con TRIzol MR	5
1.4.3 El método BOOM	5
1.4.4 Método UMSAgen	6
1.5 Métodos de extracción de proteínas	6
1.5.1 Lisis de proteínas con buffer RIPA	6
1.6 Extracción simultanea de RNA y Proteínas	7
1.6.1 Extracción simultánea de ácidos nucleicos y proteínas por ultra centrifugación	7
1.6.2 Extracción de proteínas con Diálisis después de la extracción del RNA con TRIzol	8
1.6.3 Extracción de proteínas precipitando con acetona el sobrenadante fenol- etanol después de la extracción del RNA con TRIzol	9

1.6.4 Extracción de RNA y Proteínas utilizando un producto comercial basado en un kit de preparación de RNA en columnas	10
1.7 Contaminación y pruebas de la calidad del RNA y proteínas	10
1.7.1 Geles de agarosa	11
1.7.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	12
1.8 Fibrocitos	13
II. Justificación	15
III. Objetivos	16
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	17
4.1 Cultivo celular de células epiteliales (A549) Y Fibroblastos	17
4.2 Extracción y cultivo de fibrocitos provenientes de concentrados Leucocitarios	17
4.3 Extracción de RNA de cultivos en monocapa utilizando Trizol	17
4.4 Electroforesis del RNA	18
4.5 Técnica para obtención de proteínas por Buffer RIPA	19
4.6 Diálisis del sobrenadante fenol- etanol	20
4.7 Extracción de proteínas del sobrenadante fenol- etanol precipitándolo con Acetona	20
4.8 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	21
4.9 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS- PAGE)	21
4.10 Análisis de Western blot	22
V. Resultados	23

5.1 Extracción del RNA con TRizol	23
5.2 Electroforesis del RNA	24
5.3 Extracción de proteínas por lisis con buffer RIPA	25
5.4 Extracción de proteínas a partir del sobrenadante fenol-etanol	26
5.4.1 Diálisis del sobrenadante fenol- etanol	26
5.4.2 Extracción de proteínas del sobrenadante fenol- etanol precipitándolo con Acetona	28
5.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	30
5.6 Western blot	31
VI. Discusión	32
VII. Conclusiones	34
VIII. Referencias	35

I. Introducción

La tecnología con bases científicas y el razonamiento deductivo, son los cimientos para solucionar muchos problemas clínicos. Los impresionantes progresos en bioquímica, biología molecular, biología celular y genómica, permiten llegar a las partes más recónditas de la célula y abrir una ventana a puntos más profundos del organismo. Los descubrimientos sobre las células aisladas, la naturaleza de los genes y la función de las proteínas han permitido una nueva base molecular para explicar el funcionamiento de organismos y sistemas (1).

Así mismo la expansión rápida de los métodos para obtención de datos biológicos que van desde las variaciones de la secuencia del DNA hasta la expresión del mRNA y la cantidad y tipo de proteínas, nos dan la oportunidad de utilizar toda esta información en el estudio de diversas enfermedades humanas (2).

Todos los tipos de macromoléculas biológicas tienen una característica bioquímica particular que permite el desarrollo de métodos de separación específicos para ellas. Estos métodos deben ser completamente biocompatibles para que puedan ser posteriormente útiles al investigador y, al mismo tiempo, lo suficientemente específicos para permitir el aislamiento de la molécula deseada de entre una mezcla compleja de multicomponentes que a veces juegan un papel de “contaminantes” de nuestra molécula en cuestión (3).

1.1 El RNA

La actividad de un gen comienza con la transcripción de una molécula de RNA a partir de un molde de DNA (una unidad de transcripción) que se extiende desde una secuencia génica denominada promotor hasta el terminador. La reacción es catalizada por una RNA polimerasa y comprende eventos complejos. El primer producto de la transcripción es un transcrito primario, una molécula que rápidamente comienza a ser procesada por las ribonucleasas (RNAsas) nucleares (4, 5).

Posteriormente se dan los procesos de maduración del mRNA en los que intervienen un gran número de proteínas y factores de transcripción y de procesamiento. La maduración es un proceso simultáneo, coordinado y regulado recíprocamente con el proceso de transcripción.

Hay tres procesos que constituyen la maduración del mRNA:

- Capping.
- Regulación del splicing por la RNA polimerasa.
- Poliadenilación.

Un transcrito primario de un mRNA contiene secuencias que abarcan un gen. Desde el momento que inicia su síntesis, el transcrito naciente está expuesto a la presencia de nucleasas especializadas en degradar RNA. La protección del mRNA inmaduro se realiza a través del encapuchamiento que impide el reconocimiento y ataque del transcrito por las nucleasas (proceso denominado **capping**). Por lo tanto el Capping es el proceso de encapuchamiento del mRNA inmaduro que favorece la estabilidad del transcrito al protegerlo de nucleasas.

Posteriormente un residuo modificado, denominado casquete es añadido en el extremo 5' y el extremo 3' es cortado y la poliadenilato polimerasa añade unos 80 a 250 residuos de adenilato para formar una cola de poli A (**poliadenilacion**).

Por otra parte los fragmentos que interrumpen la región codificante del transcrito se denominan intrones y los segmentos codificantes se denominan exones, en un proceso denominado Corte y empalme (**splicing**) los intrones son eliminados del transcrito primario y los exones son unidos para formar una secuencia continua, esta reacción es catalizada por endo-RNAsas que localizan secuencias específicas, y el resultado es el RNA mensajero (mRNA) maduro.

Finalmente, una vez que el mRNA maduro pasa al citoplasma tiene lugar la síntesis proteica, un proceso muy complejo, con multitud de eventos, en el que participan los tres tipos de RNA celulares (tRNA, rRNA, mRNA), varias proteínas estructurales (ribosómicas) y factores proteicos de traducción (4 - 7).

1.2 Las proteínas

Las proteínas son las macromoléculas biológicas más abundantes, estando presentes en todas las células y en todas las partes de la misma. Hay una gran variedad de ellas; en una sola célula se pueden encontrar miles de clases de proteínas diferentes, es por esto que son el centro de la acción de procesos biológicos. Una célula humana típica puede contener aproximadamente 20,000 proteínas diferentes (8).

Las proteínas desempeñan una amplia variedad de funciones esenciales, estas funciones se pueden agrupar en dos clases: dinámicas y estructurales. Entre las funciones dinámicas se encuentra el transporte, el control metabólico, la contracción y la catálisis de las transformaciones químicas. Mediante sus funciones estructurales, las proteínas proporcionan la matriz para los tejidos óseo y conjuntivo que dan estructura y forma al organismo humano (9).

Como se había mencionado, a partir de que el mRNA maduro pasa al citosol, inicia la síntesis de las proteínas. Son sintetizadas en partículas denominadas ribosomas. Cada ribosoma está formado por dos subunidades distintas constituidas por RNA y muchas proteínas. Los ribosomas se encuentran organizados en dos formas adicionales. En la primera, a menudo intervienen varios ribosomas en la traducción simultánea de una única molécula de mRNA. En la segunda, los ribosomas se encuentran unidos en las membranas del retículo endoplasmico rugoso, las cuales sintetizan proteínas destinadas a ser secretadas al exterior de la célula (10).

Una vez que el mRNA (el cual tiene la información para formar una proteína determinada) llega al ribosoma comienza la síntesis de proteínas.

La secuencia de aminoácidos de una proteína es lo que determina su estructura final, así que resulta crítico que se inserte el aminoácido apropiado en el lugar correcto de la cadena polipeptídica. Este es el papel de la maquinaria que sintetiza proteínas en la célula.

1.2.1 Etapas de la síntesis de proteínas

Los ribosomas son el lugar de síntesis de proteínas. La síntesis de proteínas implica un ciclo completo en el cual varios componentes ribosómicos tienen funciones específicas, aunque es un proceso continuo la síntesis de proteínas puede llevarse en una serie de etapas discretas (11)

Iniciación: el mRNA portador del código del polipeptido que se ha de sintetizar se une a la menor de las subunidades ribosómicas y al aminoacil-tRNA iniciador. La subunidad ribosómica mayor se une a continuación para formar el complejo de inicio. El aminoacil-tRNA iniciador se aparea con el codón de inicio AUG del mRNA, que señala el principio del polipeptido (4).

Elongación: La cadena polipeptídica naciente se alarga mediante la unión covalente de sucesivas unidades de aminoácidos, transportada cada una al ribosoma y posicionada correctamente por su tRNA, que se aparea con su correspondiente codón en el mRNA. Durante la elongación se requieren varios factores (no ribosómicos), así como moléculas adicionales de guanósín trifosfato (GTP). El tRNA que mantiene el polipeptido debe ser ahora translocado para recibir otro aminoacil RNA de transferencia (AA-tRNA) (4,11).

Terminación: el mRNA que se está traduciendo lleva un codón de terminación (UAG, UGA Ó UAA). Cuando el ribosoma llega a este codón, la proteína ensamblada es liberada y el ribosoma se fragmenta en sus subunidades quedando listo para un nuevo proceso (4,10).

1.2.2 Estructura de las proteínas

En cuanto a la estructura de las proteínas, para adoptar su forma biológicamente activa el polipeptido nuevo ha de plegarse en su forma tridimensional adecuada, cabe mencionar que la función depende de la conformación y ésta viene determinada por la secuencia de aminoácidos. Para el estudio de la estructura es frecuente considerar una división en cuatro niveles de organización, aunque el cuarto no siempre está presente. La estructura primaria, describe una línea de secuencia de residuos de aminoácidos, debemos recordar que las secuencias de aminoácidos se traducen siempre en dirección del extremo amino al carboxilo terminal (12).

La estructura secundaria, se refiere a las regularidades en la conformación local, mantenida por enlaces de hidrógeno, entre los átomos de hidrógeno amida y oxígeno carbonilo del esqueleto peptídico. Las estructuras secundarias importantes son α -hélices y β -plegadas.

La estructura terciaria describe la cadena de polipéptidos completamente doblada y compactada (estructura 3D), muchos polipéptidos plegados consisten en varias unidades globulares distintas unidas por un corto tramo de residuos de aminoácidos, estas unidades se llaman dominios, cabe mencionar que la estructura terciaria es la forma en que la proteína está activa. Algunas proteínas tienen estructura cuaternaria que involucran la asociación de dos o más cadenas polipeptídicas (12).

Por todo lo anterior es importante analizar las proteínas ya que están asociadas a mecanismos fundamentales del organismo y la alteración o expresión de estas puede ser de suma importancia en el análisis de una enfermedad, los métodos más comunes para obtenerlas se mencionan más adelante.

1.3 Técnicas estándar o comunes para obtención de RNA y Proteínas

Debido a la importancia del RNA y las proteínas para el funcionamiento de los sistemas biológicos y análisis de las patologías, existen diferentes métodos para poder extraer estas preciadas moléculas y así poder analizarlas de manera individual. Unos de los métodos para obtenerlas son:

1.4 Métodos para extracción del RNA:

1.4.1 Método de guanidil-fenol-cloroformo (GPC)

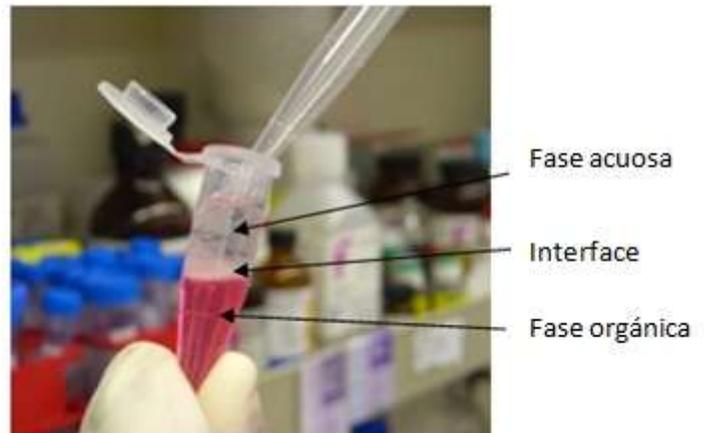
Es un método común para la extracción de RNA, descrito por Chomczynski et al. 1987, (14). Usando guanidil-fenol-cloroformo (GPC) con este método se puede obtener RNA con $A_{260}/A_{280} > 1.7$ sin la necesidad de medidas adicionales de extracción (13).

El principio básico de este método es la separación del RNA del DNA después de la extracción con una solución ácida que contiene tiocianato de guanidina, acetato de sodio, fenol y cloroformo, seguida de centrifugación. Bajo condiciones ácidas el RNA total permanece en la fase acuosa superior, mientras que el DNA y las proteínas permanecen ya sea en la interface o en la fase orgánica inferior. El total del RNA es removido por precipitación con isopropanol y puede ser usado en distintas aplicaciones (14, 15).

1.4.2 Extracción de RNA con TRIzol_{MR}

Este método ha ido creciendo en popularidad porque reduce dramáticamente el tiempo necesario para aislar RNA sin sacrificar su calidad. TRIzol_{MR} es una versión mejorada del método de extracción GPC (14). TRIzol_{MR} es una solución monofásica de fenol e isotiocinato de guanidina que durante la homogenización o lisis de las muestras, mantiene la integridad del RNA, el método consiste en la lisis celular con este reactivo para posteriormente agregar cloroformo y centrifugar, después de esto la solución se separa en 3 fases: una acuosa, una interfase y la otra orgánica (Figura 1). El RNA se mantiene en la fase acuosa la cual se debe separar con mucho cuidado, el DNA y las proteínas quedan en la fase orgánica y pueden ser posteriormente recuperadas (16, 17). Este método es particularmente ventajoso en situaciones en las cuales las células o tejidos son ricos en RNAsas endógenas, es también un método eficaz para aislar RNA pequeños, tales como los micro RNAs, RNA asociados a piwi, RNA endógeno o RNA pequeño de interferencia (18).

Figura 1. Fases formadas durante la extracción de RNA con TRIzol, en la fase acuosa es donde se encuentra el RNA.



1.4.3 El método BOOM: desarrollado por Boom *et al.* (1990)(19). Es un procedimiento rápido para la extracción total de RNA de células en cultivo, la extracción se lleva a cabo con el ácido tiosanato de guanidina, el método está basado en la lisis y la inactivación de las propiedades de nucleasa, separando los ácidos nucleicos con base en su alta afinidad para enlazarse en matrices de sílica, en vez de utilizar fenol. Dado que este método aísla tanto DNA como RNA, resulta esencial utilizar las nucleasas específicas para DNA que lo eliminen de la muestra. Algunas compañías han creado paquetes de extracción basados en este principio, que utilizan matrices de sílica diseñadas para favorecer el enlace de RNA (como RNeasy de QIAGEN). Las moléculas grandes de RNA, incluyendo rRNA y mRNA, son insolubles en soluciones con altas concentraciones de sal, por lo que durante su precipitación es común utilizar cloruro de litio 8 M (libre de RNAsas) e incubar las muestras a 0°C durante dos horas antes de centrifugar y obtener el RNA (19 - 21).

1.4.4 Método UMSAgen: se basa en la separación de proteínas, RNA y DNA aprovechando las diferentes características de solubilidad en las fases orgánica y acuosa. En esta técnica se hace una mezcla de 30 μ l de acetato de sodio, 330 μ l de fenol ácido y 100 μ l cloroformo alcohol isoamílico 49:1, para posteriormente recuperar la fase acuosa y agregar isopropanol. El paso de precipitación con isopropanol se lleva a cabo varias veces y finalmente se resuspende la pastilla de ARN con agua DEPC (22).

Así mismo existen técnicas de extracción de ARN en base a kits comerciales tal es el caso del **Oligotex mRNA Midi Kit_{MR}**: El método representa una nueva tecnología para extraer RNA total, que combina las propiedades selectivas de unión de una membrana de gel de sílice colocada en una columna, con la velocidad y la tecnología microspin. Esta técnica se lleva a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (22, 23).

Otro Kit es el **QuickGene_{MR}**: aísla RNA total con alto rendimiento; y más aún, con la utilización de su membrana, elimina la mayoría de los contaminantes. Utiliza la técnica de filtración a presión (24). Estos métodos aunque pueden dar resultados satisfactorios, a veces utilizan equipo muy sofisticado, pueden ser costosos o solo están diseñados para un tipo de RNA en específico (mRNA, tRNA, rRNA), si lo que se desea es analizar un tipo de RNA en específico es recomendable utilizar estos métodos de extracción en base a kits.

1.5 Métodos de extracción de proteínas:

1.5.1 Lisis de proteínas con buffer RIPA

El buffer RIPA es uno de los Buffers o amortiguadores más usado, es utilizado para lisar células de mamíferos en cultivos celulares. Este buffer permite la extracción de proteínas de la membrana citoplasmática; y proteínas nucleares, tanto en cultivos celulares en monocapa, en muestras de tejido y en células cultivadas en suspensión. La técnica consiste en la lisis celular agregando 1 ml de RIPA frío por cada 5×10^6 células (25).

Este procedimiento es adecuado para las células de insectos, aves y mamíferos (26). La lisis es una de las condiciones más rigurosas que se utilizan para trabajar con las proteínas que son difíciles de solubilizar, ya que al trabajar con esta técnica no se dificulta la solubilización en comparación a otras técnicas (Figura 2) (27). Esta técnica es compatible con muchas aplicaciones, incluyendo los ensayos de gen reportero, ensayos de proteínas, los inmunoensayos y la purificación de proteínas, análisis de SDS-PAGE y Western-blot.

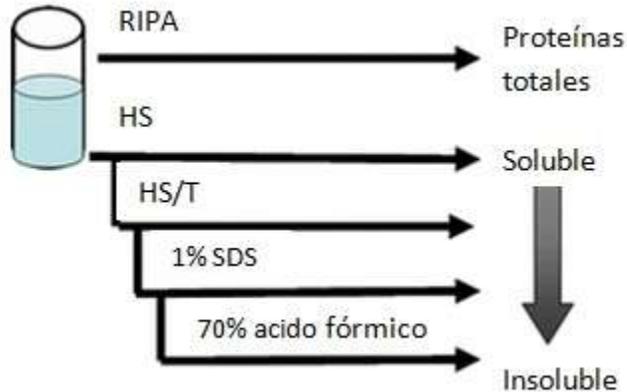


Figura 2. Representación esquemática de la extracción de proteínas con buffers. Con buffer RIPA se extraen proteínas totales y se da la máxima solubilización. Así mismo se muestra la solubilidad de los otros reactivos: Buffer alto en sales (HS), 1% de HS + Triton 100x (HS/T), dodecilsulfato sódico (SDS) y 70% de ácido fórmico.

1.6 Extracción simultánea de RNA y Proteínas.

El análisis del DNA, RNA y las proteínas ocupa un lugar importante en el campo de la investigación biomédica y ciencias de la vida. Esto a menudo se ve obstaculizada por la limitada disponibilidad de material de la muestra. Por esta razón, existe un creciente interés para el aislamiento simultáneo del RNA y las proteínas a partir de una alícuota única de la muestra (28).

Estos métodos generalmente se basan en el uso de un reactivo que contiene fenol y tiocianato de guanidina. En este método una muestra biológica se homogeniza en el reactivo y el aislamiento simultáneo de RNA y las proteínas se lleva a cabo en un solo paso por una separación en fase líquida. Así mismo las moléculas (ácidos nucleicos y proteínas) extraídas con estas técnicas son de buena calidad, como para ser utilizadas con las técnicas comunes de análisis en biología molecular y celular (29).

1.6.1 Extracción simultánea de ácidos nucleicos y proteínas por ultra centrifugación:

En este método, se basan en lo establecido para la extracción simultánea de DNA y RNA con isotiosinato de guanidina, haciendo una lisis de la muestra con isotiosinato de guanidina para posteriormente ultra centrifugar y separar las moléculas, lo cual permite el uso de la fracción de proteína extraída como un producto secundario de la muestra y así hacer análisis de proteoma (30).

1.6.2 Extracción de proteínas con Diálisis después de la extracción del RNA con TRIzol

Es un método para extraer de manera eficiente y solubilizar las proteínas de las muestras después de la extracción secuencial de RNA y DNA utilizando TRIzol_{MR}. Esta técnica tiene, además, la ventaja de que las proteínas se mantienen estables en fenol-etanol hasta más de 3 años a -20 ° C (31).

La extracción de RNA y DNA se realiza como se describe en la información del producto, con el método de TRIzol_{MR}. Posteriormente, el sobrenadante fenol-etanol resultante de la extracción de RNA y DNA es el que se somete a la diálisis (Figura3). La diálisis es un procedimiento que separa las proteínas de los solventes aprovechando el mayor tamaño de las proteínas. El sobrenadante fenol-etanol se coloca en un saco de membrana semipermeable, el cual al suspenderse en un mayor volumen de disolución del buffer de fuerza iónica apropiada, permite el intercambio de sal y buffer, pero no de proteínas (Figura3). De este modo la diálisis retiene las proteínas dentro del saco de membrana, mientras que permite que la concentración de los demás solutos se modifique hasta llegar al equilibrio con la solución al exterior de la membrana. (31,4).

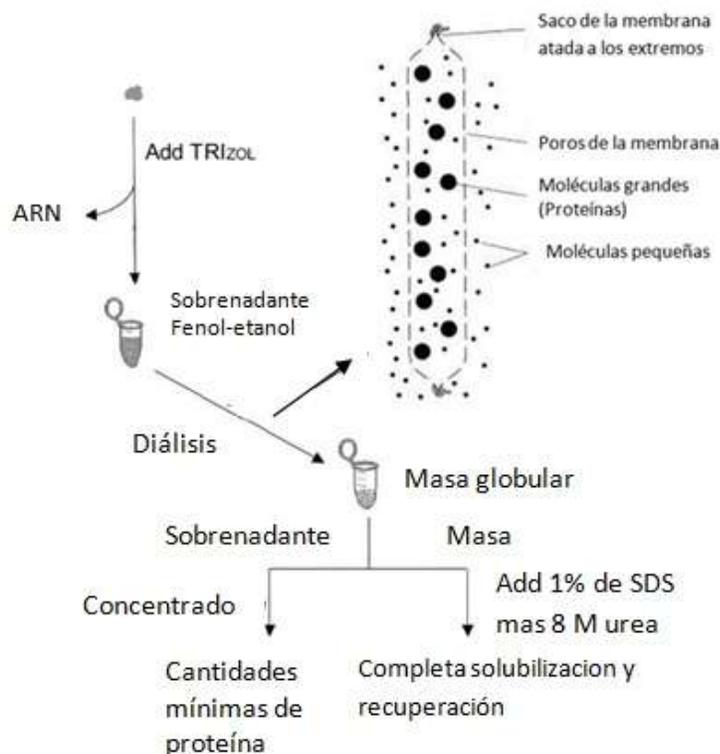


Figura 3. Extracción de proteínas por diálisis del sobrenadante fenol-etanol.

*Modificado de: Hummon, A. Lim, S. Difilippantonio, M. and Reid, T. 2007. Isolation and solubilization of proteins after Trizol extraction of RNA and DNA from patients material following prolonged storage. BioTechniques 15:532-537.

1.6.3 Extracción de proteínas precipitando con acetona el sobrenadante fenol- etanol después de la extracción del RNA con TRizol

En este método se utiliza de igual forma la extracción del RNA con TRizol^{MR}, tal y como ya se describió. Al recuperar el sobrenadante fenol- etanol, se precipitan con 3 volúmenes de acetona, ya que estas son las condiciones para maximizar la recuperación de proteínas a partir de la solución de fenol-etanol. Las proteínas pueden ser precipitadas por la adición de isopropanol (que comúnmente se utiliza) o acetona. Pero en un estudio, en la mayoría de los casos, la acetona tuvo como resultado los rendimientos de proteína más alto que el isopropanol (figura 4) (32). El rendimiento óptimo del sobrenadante fenol-etanol para extraer proteínas se da en las relaciones 3:1 y 6:1 (Figura 4). Posteriormente se centrifugan para recuperar las proteínas (32).

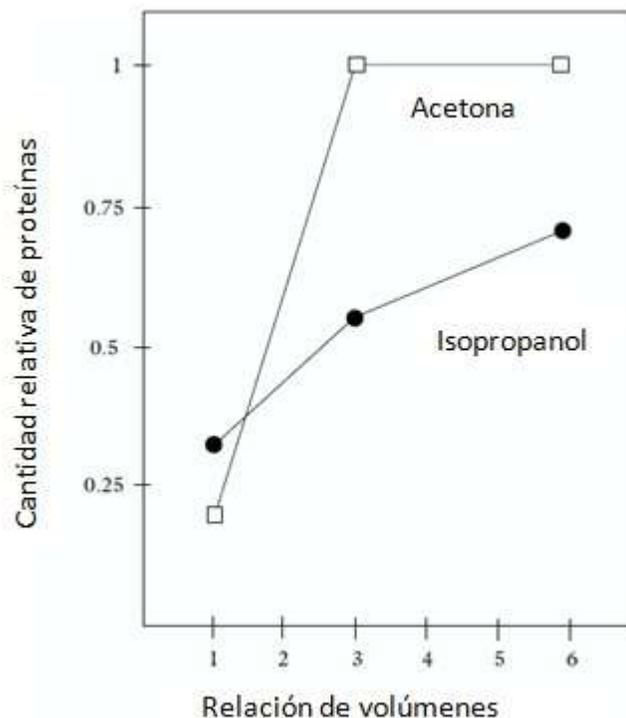


Figura 4. Proteínas de recuperación por las precipitaciones. Volúmenes de isopropanol □, volúmenes de acetona ●. Se muestra el rendimiento óptimo del sobrenadante 3:1 y 6:1.

* Figura tomada de: Wu, L.C. 1997. Isolation and long-term storage of proteins from tissue and cells using Trizol reagent. *Invitrogen Focus* 17:98-100.

1.6.4 Extracción de RNA y Proteínas utilizando un producto comercial basado en un kit de preparación de RNA en columnas.

La tecnología de centrifugado en columnas es un método simple y rápido para la extracción de ácidos nucleicos a partir de pequeñas muestras biológicas. Además, la mayoría de los procedimientos basados en columnas no requieren la cantidad de productos químicos peligrosos tales como la centrifugación en gradiente del fenol, cloroformo o CsCl que se utilizan en los procedimientos tradicionales de extracción de ácidos nucleicos (33).

Los procedimientos de estas técnicas se llevan a cabo como lo indican las instrucciones del fabricante, (cada fabricante tienen diferentes instrucciones) algunos de los cuales se pueden encontrar en ([www1.qiagen.com /literatura /handbooks /PDF/RNA Stabilization And](http://www1.qiagen.com/literatura/handbooks/PDF/RNA%20Stabilization%20And%20Purification/FromAnimalAndPlantTissuesBacteriaYeastAndFungi/RNY_Mini/1016272HBRNY_062001WW.pdf)

[Purification/FromAnimalAndPlantTissuesBacteriaYeastAndFungi/RNY_Mini/1016272HBRNY_062001WW.pdf](http://www1.qiagen.com/literatura/handbooks/Purification/FromAnimalAndPlantTissuesBacteriaYeastAndFungi/RNY_Mini/1016272HBRNY_062001WW.pdf)) o en (www1.qiagen.com/literatura/handbooks).

Así mismo se dice que estos protocolos son menos complicados e implican menor tiempo de esfuerzos, ya que solo son lavados simples que forman parte de la RNeasy Mini Kit (33, 34).

En los métodos anteriores, cuando se utiliza TRIzol_{MR}, se recomienda para recobrar un mayor número de proteínas la adición de glicógeno, ya que se ha demostrado un aumento significativo en la recuperación cuantitativa de las proteínas y RNA, el cual se produce después de precipitación con alcohol en presencia de glicógeno y la disolución a pH más altos (de 8,0 a 8,8). La adición de glicógeno durante la precipitación del sobrenadante con TRIzol_{MR} aumentó la recuperación de las proteínas totales (35).

1.7 Contaminación y pruebas de la calidad del RNA y proteínas

La posibilidad de aislar las macromoléculas biológicas lo más intacto posible es esencial tanto para el clonado de genes como para el análisis de la expresión génica y proteómica. El éxito de cualquier extracción de RNA es totalmente dependiente de la eliminación de toda posible contaminación de ribonucleasas (RNAsas) que degradan el RNA durante y después de la extracción, provocando bajos rendimientos de RNA completos (36).

En el caso del RNA: la extracción de RNA es esencial para algunas técnicas usadas en el análisis de la expresión de genes, como son: Northern blot, construcción de una biblioteca de cDNA, construcción de cDNA para el análisis de micro arreglos (especialmente cuando hay un primer con oligo (dT)) requiere un RNA de alta y extremada calidad. El RT-PCR y los ensayos de protección ribonucleica, implican el análisis de las regiones más pequeñas de RNA (generalmente menos de 1 Kb), y por tanto, son más tolerantes al RNA parcialmente degradado. Independientemente de la aplicación posterior, es una buena idea comprobar la integridad del RNA antes de su análisis mediante el uso de geles de agarosa (37).

1.7.1 Geles de agarosa: es el método más común utilizado para evaluar la integridad del RNA total. El RNA intacto cuando se corre en un gel de desnaturalización tendrá nítidas y claras bandas del RNA 28S y 18S. La banda del 28S debe ser aproximadamente el doble de intensa que la banda del 18S. Esta proporción de 2:1 (28S: 18S) es un buen indicio de que el RNA está completamente intacto. El RNA parcialmente degradado tendrá un aspecto manchado, o no se presentan la proporción 2:1 del RNA de alta calidad. El RNA completamente degradado aparecerá como una mancha de muy bajo peso molecular o una banda totalmente barrida o inexistente (Figura 5) (37).

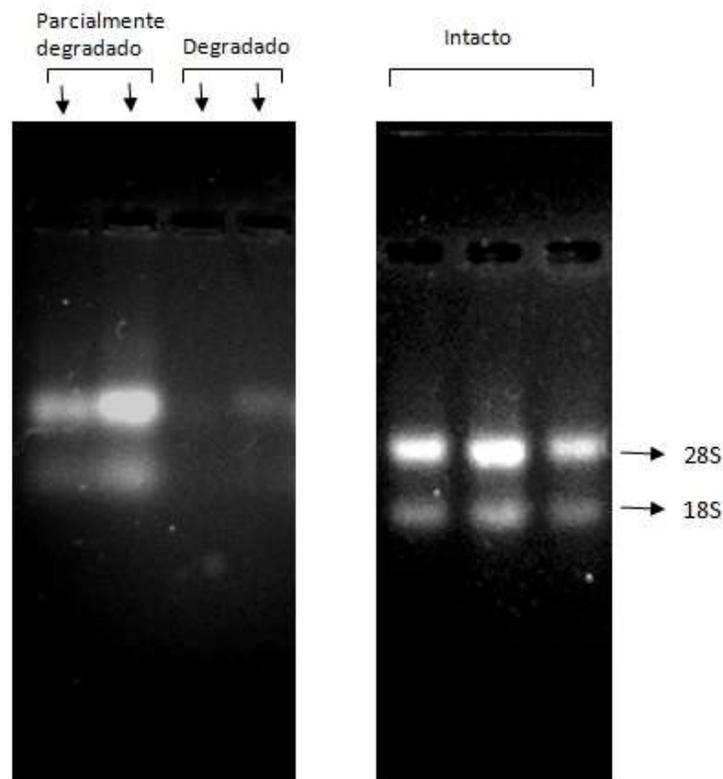


Figura 5. ARN intacto vs degradado. Las bandas del RNA 18S y 28S ribosomal son claramente visibles en la muestra del RNA intacto. La degradación del RNA se presenta como bandas visiblemente nítidas o sin bandas.

En cuanto a las proteínas: nuestro conocimiento de la estructura y función de las proteínas proviene del estudio de muchas proteínas individuales. Para estudiar una proteína con cierto detalle es necesario separarla del resto de las proteínas y debe disponerse de técnicas que permitan determinar sus propiedades. Los métodos necesarios provienen de la química de proteínas (4).

Las proteínas tienen periodos de vida finitos. Están sujetas a lesiones ambientales tales como oxidación, proteólisis o desnaturalización conformacional, y a otras modificaciones irreversibles. Así mismo las proteínas exhiben periodos de vida muy distintos (10).

Es por eso que al extraerlas de las células para ensayos de biología molecular y bioquímica se deben tener en cuenta distintos parámetros de cuidado, como impedir la degradación. El proceso de degradación de las proteínas tiene lugar en dos etapas, la primera reversible, correspondiente al proceso de desnaturalización y la segunda irreversible que conduce a un estado final (degradación) que implica la pérdida total de la actividad de la proteína, los agentes desnaturalizantes pueden ser urea, incrementos en la temperatura, cambios en el pH y la fuerza iónica (38).

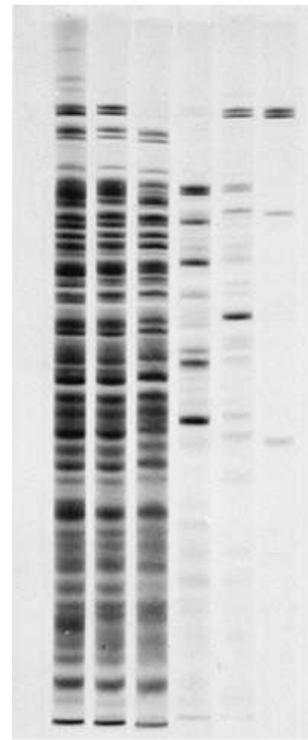
La contaminación por proteasas es algo que también se debe tener en cuenta ya que las proteasas catalizan la ruptura hidrolítica de los enlaces peptídicos. Algunas proteasas cortan solo los enlaces peptídicos adyacentes a residuos de aminoácidos específicos y fragmentan una cadena polipeptídica de forma predecible y reproducible, así mismo varios reactivos químicos también cortan los enlaces peptídicos adyacentes a residuos específicos (4, 39).

1.7.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) La electroforesis en geles de poliacrilamida es uno de los métodos más utilizados para la purificación, análisis y caracterización de proteínas. El método permite separar proteínas haciéndolas pasar por una resina: Bis Acrilamida, la cual es un agente entrecruzador que genera un polímero sobre el cual se separaran las proteínas. En la electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE), como su propio nombre indica, se utilizan agentes desnaturalizantes de proteínas, como pueden ser: detergentes (SDS), caótopos (urea) y agentes reductores (2-mercaptoetanol, DTT). Es por esto que las proteínas se desnaturalizan, provocando pérdida de la estructura nativa y la disociación de las subunidades. Las proteínas quedan cargadas negativamente y migran del polo negativo al positivo durante la electroforesis (40).

Para la visualización de las proteínas se utilizan diferentes métodos de tinción, siendo el más habitual el azul de coomassie, el cual se fija a las proteínas pero no al gel (Figura 6) (40, 41). Así mismo las proteínas se pueden purificar, utilizando métodos de purificación y posteriormente pueden ser corridas en un gel, de tal forma que el número de bandas proteicas visibles deben disminuir tras nuevos pasos de purificación (figura6) (42).

Figura 6. Proteínas visibles después de la electroforesis y tinción con azul de coomassie. El gel muestra la purificación de la enzima RNA polimerasa de la bacteria *E. coli*. El primer carril muestra las proteínas presentes en el extracto celular crudo, las bandas de los carriles de izquierda a derecha van disminuyendo, por el proceso de purificación de las proteínas.

*Tomado de Lehninger Principles of Biochemistry (4).



1.8 Fibrocitos

Los fibrocitos son una población de células circulantes progenitoras de fibroblastos y miofibroblastos que fue descrita por primera vez en 1994 (43). Comprenden del 0.1 – 0.5% de la población de leucocitos en sangre periférica, son células adherentes y cuando son cultivados adquieren una morfología en forma de huso muy parecida a la de los fibroblastos (44). Co-expresan marcadores de células mesenquimatosas (colágena I, fibronectina), antígeno pan-leucocitario (CD45) monocitos (CD14) y células troncales hematopoyéticas (CD34) (45-47).

Existen diversas evidencias de que los fibrocitos circulantes pueden participar en la reparación de tejidos y cicatrización ya que entran rápidamente a sitios de lesión, se diferencian a fibroblastos/miofibroblastos y secretan un perfil único de citocinas, factores de crecimiento y quimiocinas aunado a su capacidad de secreción de proteínas de matriz extracelular (48-51).

La presencia de los fibrocitos en enfermedades pulmonares ha sido ya documentada en padecimientos como el asma donde se ha mostrado acumulación de fibrocitos en la mucosa bronquial circundante a áreas sub-epiteliales de fibrosis (52-53). Además de esto, Mehrad y colaboradores (54) encontraron un incremento en el porcentaje de fibrocitos circulantes en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y neumonía intersticial inespecífica comparados con controles sanos y más recientemente se demostró por primera vez la presencia de fibrocitos en tejido pulmonar de pacientes con FPI (55).

El descubrimiento de estas células ha despertado el interés en todas las áreas de investigación biomédica, abriendo líneas de investigación respecto a su linaje y participación en la patogénesis de enfermedades aparentemente tan diversas como la fibrosis pulmonar, cáncer y artritis reumatoide. Las técnicas de obtención de fibrocitos no han variado a través de los años. Pueden obtenerse a partir de sangre periférica o de concentrados leucocitarios a través de un gradiente de Ficoll. Muchos autores purifican los cultivos después de 10 días utilizando anticuerpos específicos asociados con perlas magnéticas para eliminar células T y B, así como macrófagos que puedan estar contaminando la población de fibrocitos, obteniendo posteriormente una pureza > 95% evaluada por citometría de flujo utilizando la combinación Col I+ /CD34+ o Col I+ / CD11b+ (56). Es por esto que los fibrocitos son considerados como células difíciles de obtener ya que se debe pasar por varios procesos para poderlos purificar totalmente y finalmente analizarlos.

II. Justificación

Sabemos que la complejidad biológica surge de diferentes niveles de organización en un espacio y tiempo altamente regulado por una coordinación de procesos que involucran la participación y orquestación de la interacción entre ácidos nucleicos y proteínas.

Es por eso que al estudiar alguna enfermedad, causas, prevenciones o posible cura, es necesario asomarnos a ella a nivel celular, lo cual indica que tendremos que analizar tanto ácido nucleicos como proteínas para el mejor entendimiento de esta.

De ahí la importancia de que con métodos de extracción comparemos la obtención de estas moléculas en una misma muestra para la generación de muestras manipulables para tener un empleo eficiente en cuanto a ejemplares biológicos pequeños y preciados.

Tal es el caso de los fibrocitos, ya que podrían participar en numerosos procesos, tanto normales como patológicos, por lo cual se hace necesario estudiarlos a nivel de RNA y proteína. La obtención, purificación y mantenimiento de este tipo de células resulta difícil en comparación con otras, ya que son células que no proliferan mucho y son difíciles de cultivar.

Por esta razón es importante optimizar el uso de estas células y así poder estudiarlas a nivel de RNA y proteínas en una misma muestra, sin la necesidad de hacer cultivos diferentes para cada molécula y así ahorrar tiempo, dinero y esfuerzo.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

1. Mejorar la utilización de los cultivos celulares extrayendo de una sola muestra RNA y Proteínas con TRIzol, comparando técnicas para su obtención.

Objetivos particulares

- 1.- Comparar tres métodos de extracción de proteínas para evaluar la eficiencia.
- 2.- Verificar que las proteínas y RNA obtenidos por estas técnicas sean adecuadas para su utilización en técnicas comunes para el estudio de las proteínas y RNA.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Cultivo celular de células epiteliales (A549) Y Fibroblastos

Líneas celulares comerciales epiteliales (A549) y fibroblastos (CCD11) (ATCC, Rockville, Maryland), fueron descongeladas y cultivadas en cajas T25 con medio F-12 (Gibco®) con antibiótico (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina) más 10 % de suero fetal bobino (SFB), haciendo cambios del medio cada tres días para su óptimo crecimiento, hasta llegar a aproximadamente 80% de confluencia, en ese momento se les agregaba TRIzol o buffer RIPA.

4.2 Extracción y cultivo de fibrocitos provenientes de concentrados leucocitarios

Se utilizó un gradiente de densidad con Ficoll-Paque (Amersham Biosciences) para la obtención de células mononucleares de sangre periférica a partir de concentrados leucocitarios provenientes de donadores sanos. Posteriormente se hizo una selección de monocitos utilizando un estuche de selección negativa de células CD14+ (Stem Cell Technologies, Vancouver, Can). Las células CD14+ obtenidas (aproximadamente 75-80% de pureza determinado por citometría de flujo (Aria de BD, software Diva)) fueron cultivadas en cajas Falcon de 25-cm² a 37°C y 5% CO₂-95% utilizando medio Eagle modificado por Dulbecco (Dubelcco's modified Eagle médium (DMEM); Invitrogen, Carlsbad, CA) con 20% de suero humano AB (Valley Biomedical, Winchester, Virginia); después de 48hs las células no adherentes fueron eliminadas y las células adherentes se cultivaron hasta el día 8.

4.3 Extracción de RNA de cultivos en monocapa utilizando Trizol

Una vez alcanzada la confluencia las células se prepararon para guardarlas en TRIzol hasta el momento de ser utilizadas:

Para esto se extrajo el medio de las cajas T25, se lavaron las células con una solución de buffer fosfato salino (PBS) a temperatura ambiente y se retiró el PBS. Posteriormente se agregaron 3ml de TRIzol_{MR} (Invitrogen life technologies) cubriendo perfectamente la superficie donde estaban creciendo las células, la cantidad de Trizol se calcula dependiendo la superficie en los cultivos en monocapa, aproximadamente 1ml de TRIzol por cada 3.5cm². Después se procedió a Subir y bajar el TRIzol varias veces con una pipeta, enjugando la pared donde crecieron las células. Las células con TRIzol se repartieron en tubos eppendorf para RNA previamente etiquetados. Finalmente, se guardaron a - 70 °C hasta el momento de ser usadas (10, 11).

Para la extracción del RNA las muestras se descongelaron manteniéndolas en hielo y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. A cada tubo se le agregó 0.2 ml de cloroformo y se agitaron vigorosamente con la mano durante 25 segundos. Se incubaron a temperatura ambiente por 2-3 minutos. Posteriormente se centrifugaron las muestras a $1200 \times g$ a $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (9500 rpm en el rotor JA-18.1) por 15 minutos, se formaron dos fases, la inferior (fenol-cloroformo) de color rojo y la superior incolora acuosa que contiene el RNA. Se transfirió la fase acuosa (superior) a sendos tubos sin mezclarla con la fase inferior (en este paso es usual que se deseché la fase inferior, en este caso se guardó a -20°C para la posterior extracción de proteínas).

La fase superior incolora se precipitó con 0.5 ml de isopropanol por tubo y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugaron las muestras a $12000 \times g$ a $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (9500 rpm en rotor JA-18.1) por 10 minutos. Se formó un botón gelatinoso y se desechó el sobrenadante por inversión, embocando el tubo con papel secante. Se le añadió 1ml de etanol al 75% a cada tubo y se resuspendió el botón con vortex para después centrifugar las muestras a $7500 \times g$ a $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (7500 rpm en el rotor JA-18.1) por 5 minutos. El sobrenadante se desechó por inversión, embocando el tubo en el papel secante. Se secó el botón con aire por 5-10 minutos.

Finalmente se resuspendió en agua DEPC (se sugieren $10\mu\text{l}$ en cada tubo) finalmente se cuantificó el RNA que se obtuvo (13). Para cuantificar el RNA se utilizó Thermo Scientific. NanoDrop™, el cual es un aparato que se usa para cuantificar ácidos nucleicos, lee la cantidad de $1\mu\text{l}$ de muestra al colocarla en una fibra óptica dando la concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

4.4 Electroforesis del RNA

El RNA que se extrajo de los diferentes tipos celulares, se sometió a una electroforesis para ver la calidad de este, en un gel de agarosa al 1%.

Se utilizaron 2ml de una solución que contiene 240 mM de MOPS pH 7.0, 96 mM de Acetato de Sodio, 10 mM de EDTA pH 8.0 en grado biología molecular para formar MOPS 12x (57), más 4.4 ml de formaldehído y se agregó a un tubo de 15ml, el cual se puso en baño maría a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos con la tapa entreabierta. Una vez transcurridos los 10 minutos, se pesaron 0.25 gr de agarosa y se puso en un frasco de vidrio, se agregó aproximadamente 18 ml de agua DEPC y se calentó en el horno de microondas durante 1 minuto.

Posteriormente en un tubo de 50ml se mezcló todo lo anterior y se aforó a 25ml con agua DEPC, luego se adicionaron $5\mu\text{l}$ de bromuro de etidio. Finalmente se vació a la cámara de electroforesis y se dejó gelificar de 15 a 20 minutos.

Una vez listo el gel, se prepararon las muestras del RNA:

Se mezcló el equivalente a $3\mu\text{g}$ de RNA y se puso la misma cantidad en μl de una solución desnaturante que contiene $500\mu\text{l}$ de formamida, $162\mu\text{l}$ de MOPS 12x, $162\mu\text{l}$ de formaldehído 37% y $255\mu\text{l}$ de agua DEPC. Esta mezcla se sometió a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos.

Una vez lista la muestra, se agrego a cada una 3 μ l de la solución buffer de carga y se mezclo. Finalmente se cargaron las muestras al gel y se cubrieron con buffer de corrida (se prepara mezclando 83.3 ml de MOPS 12X y aforar a 1000ml con agua DEPC), para ponerlo a correr durante 40 a 60 minutos.

4.5 Técnica para obtención de proteínas por Buffer RIPA

El buffer RIPA es el método más usado para la extracción de proteína de cultivos celulares. De los cultivos celulares totales, tres cajas T 25 por tipo celular fueron utilizadas para la extracción de proteínas por buffer RIPA:

Se extrajo el medio de las cajas T25, posteriormente se lavaron las células con PBS frío, lavando cuidadosamente la superficie donde estaban creciendo las células y se retiro el PBS.

Se bañaron las células con PBS frio y las cajas se colocaron en hielo, para posteriormente retirar el PBS por decantación.

Con una micropipeta se retiro completamente el PBS que se quedo en la caja y se dejaron secar durante 4 minutos, posteriormente las células se bañaron con 50 μ l de Buffer RIPA (santa cruz biotechnology, inc.) el cual contiene: 25 mM Tris HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodio desoxicolato y 0.1% SDS, se agrego a esto un coctel de inhibidores de proteasas y se cubrió completamente toda la superficie donde estaban creciendo las células, se dejaron reposar durante 10 minutos en hielo.

Una vez transcurrido el tiempo, con una espátula se raspo completamente toda la pared donde estaban creciendo las células hasta obtener un liquido viscoso, el cual se recogió con una micropipeta y deposito en un tubo eppendorf previamente etiquetado, para posteriormente sonicar el líquido viscoso manteniéndolo en hielo, con un homogenizador ultrasónico, esto para homogenizar completamente la muestra. Se Centrifugo este liquido a 14000 rpm durante 10 minutos, transcurrido el tiempo se recupero el sobrenadante (que es el que contiene las proteínas) sin llevarse el pellet y se coloco en nuevos tubos eppendorf previamente etiquetados, finalmente se guardaron a -70°C .

4.6 Diálisis del sobrenadante fenol- etanol

Del sobrenadante fenol- etanol resultante de la extracción de RNA de una parte de las muestras y para todos los tipos celulares, se realizó una diálisis para la obtención de proteínas de la siguiente forma:

El sobrenadante fenol-etanol se cargó en una membrana de diálisis (membrana de celulosa espectro /por 6). Por cada 1ml de sobrenadante fenol –etanol se usaron 100 ml 0.1 % de SDS y se dializó contra tres cambios de esta solución de SDS a 4°C en constante movimiento. El primer cambio se hizo después de 16 horas, luego después de 4 horas y finalmente después de 2 horas.

Durante la diálisis y al final de esta, las muestras se separaron en tres fases:

- 1.- una fase incolora (aproximadamente 85% del volumen)
- 2.- una masa globular (aproximadamente 10% del volumen)
- 3.- un líquido incoloro viscoso (aproximadamente 5% del volumen)

La masa globular que es la que contenía el botón de proteínas fue removida a tubos eppendorf y resuspendida en una solución que contenía 50 µl de 0.1% de SDS + 8M urea en tris-HCl, pH 8.0 en grado biología molecular 1:1.

Posteriormente y como se dificulta su resuspensión, las proteínas fueron sonicadas para su completa resuspensión y guardadas a -70 °C (3).

4.7 Extracción de proteínas del sobrenadante fenol- etanol precipitándolo con Acetona

De la otra parte de las muestras resultantes de la extracción de RNA, se realizó la extracción de proteínas mediante precipitación con acetona del sobrenadante fenol-etanol de la siguiente manera:

Contrariamente a lo que comúnmente se hace en los laboratorios de biología molecular que precipitan el sobrenadante fenol-etanol con isopropanol, se precipitó este sobrenadante con Acetona. Fueron precipitados de 100 a 200 µl de sobrenadante con 3 volúmenes de acetona, esto es: que por cada 100 µl del sobrenadante se agregan 300 µl de acetona y se dejaron reposar durante 5 minutos y posteriormente se centrifugaron a 5000 xg durante 2 minutos. El sobrenadante fue removido por decantación y el pellet rosa que contenía las proteínas fue resuspendido en una solución de 1M Tris-HCl pH 8.5. Posteriormente y como se dificulta su resuspensión, las proteínas fueron sonicadas para su completa resuspensión y guardadas a -70 °C (58).

4.8 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Las proteínas resultantes de los tres diferentes métodos fueron cuantificadas por el método de Bradford.

Se cuantifico 1 μ l de muestra: para poder cuantificar las proteínas primero se realizo una curva con Albumina en diferentes concentraciones. Posteriormente se cuantificaron las muestras colocando en un tubo eppendorf 799 μ l de agua DEPC más 200 μ l de Bradford (Bio-Rad protein assay) y 1 μ l de proteína, comparadas contra una solución blanco que contenía 800 μ l de agua DEPC mas 200 μ l de Bradford. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro con una longitud de onda de 280nm.

4.9 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS- PAGE)

Las proteínas obtenidas de los diferentes tipos celulares y por los diferentes métodos de extracción fueron sometidas a una electroforesis en gel de poliacrilamida y sulfato duodecil de sodio, el cual es una técnica de biología molecular usada para separar las proteínas por peso molecular y con la finalidad de observar el estado de estas para otras aplicaciones.

Las proteínas fueron separadas en un gel de acrilamida al 10 %, este contenía 4.02 ml de agua destilada, 2.5 ml de Tris- HCl 1.5 M pH 8.8, 100 μ l de SDS 10X, 3.33 ml de Acrilamida/Bis 30 X, 50 μ l de persulfato de amonio (APS) 10 X y 5 μ l de TEMED.

Las muestras fueron cuantificadas para cargar 20 μ g y mezcladas con un volumen igual en μ l de buffer de carga, esta mezcla se calentó a 99 °C durante 5 minutos y posteriormente se pusieron en hielo para después cargar el gel, colocando un marcador de pesos moleculares (Precision Plus Protein Standards. Dual Color. BIO-RAD) en el primer carril.

La electroforesis se llevo a cabo durante 1:20 horas a 120 volts y - 4 °C.

Una vez terminada la electroforesis, el gel se tiñó durante 20 minutos con azul de coomassie (Bio Rad Bio-Safe Coomassie Stain 161-0786) y 30 minutos con una solución desteñidora que contiene 500 ml metanol, 100 mL ácido Acético y 400 ml Agua.

Finalmente se observaron y fotografiaron las proteínas totales a contra luz.

4.10 Análisis de Western blot

Para corroborar la calidad de las proteínas obtenidas por los diferentes métodos de extracción, se realizó un western blot para β -tubulina ya que es un gen constitutivo y debe expresarse en los diferentes tipos celulares y obtenerse por los tres métodos de extracción.

Las proteínas obtenidas por lisis de buffer RIPA, diálisis del sobrenadante fenol-etanol y por precipitación del sobrenadante fenol-etanol con acetona, de los diferentes tipos celulares fueron cargados en una concentración de 20 μ g y mezcladas con un buffer de carga para ser desnaturalizadas, posteriormente se separaron en un gel de acrilamida al 10 %.

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana PVDF (NEN Life Science), se transfirieron durante 1 hora a 10 volts en una cámara de transferencia semiseca (Trans-Blot SD Cell. BioRad). Posteriormente la membrana se dejó bloqueando con leche al 5% en buffer PBS-T (NaCl 136.77 mM, Na₂HPO₄ 10.14Mm, KH₂PO 41.74 Mm, 0.01% Tween 20) durante 18 hrs a - 4 °C.

Una vez transcurrido el tiempo, la membrana se dejó incubando durante una hora con el anticuerpo primario para β -tubulina (Santa Cruz). Posteriormente se realizaron 4 lavados con TBS-T (10mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl, 0.01% Tween 20) cada uno de 10 minutos. Después de estos lavados, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario (Santa cruz) anti β -tubulina, durante una hora y seguido a esto se realizaron cuatro lavados con TBS-T de 10 minutos cada uno.

Finalmente la membrana fue revelada en un Chemi-Doc XRS+ (Bio-Rad), bañándola con 2 ml de luminol, se tomaron las fotografías correspondientes a la membrana para su posterior análisis.

V. Resultados

5.1 Extracción de RNA con TRIzol

Las Células epiteliales (A549), los fibroblastos y los fibrocitos fueron cultivados hasta llegar a 80% de confluencia. Posteriormente la extracción del RNA se realizó con el método más utilizado en los laboratorios de biología molecular (método de TRIzol_{MR}). A las células A549 y los fibroblastos se les agregó 3ml de TRIzol y a los fibrocitos en 6ml de TRIzol, esto por el tamaño de la caja en que se requerían ser cultivados. El RNA resultante fue cuantificado en un NanoDrop (el cual es un aparato que mide las concentraciones del DNA y RNA a una A260, y las proteínas A280. Dando también las medidas de pureza de las muestras A260/280), los resultados se muestran como promedio y desviación estándar del RNA obtenidas de las tres cajas independientes de cada tipo celular (Cuadro 1).

caja	260/280	260/230	µg/µl
A) A549			
caja 1	1.75	1.36	0.7078
caja 2	1.7	1.08	0.6948
caja 3	1.85	1.28	0.7287
		Promedio	0.71043333
		DE	0.01396432
caja	260/280	260/230	µg/µl
B) Fibroblastos			
caja 1	1.79	0.7	0.724
caja 2	1.86	1.15	0.7237
caja 3	1.76	0.68	0.7076
		Promedio	0.71843333
		DE	0.0076613
caja	260/280	260/230	µg/µl
C) Fibrocitos			
caja 1	1.75	1.36	1.2166
caja 2	1.77	1.17	1.0991
caja 3	1.91	1.62	1.9109
		Promedio	1.40886667
		DE	0.3582175

Cuadro 1.- Cuantificación del RNA de los tres tipos celulares, resultados expresados por caja, mostrando promedios de las relaciones 260/280 y 260/230.

En el cuadro también se muestran los promedios de las relaciones 260/280 y 260/230 las cuales nos indican la calidad del RNA. Se observa un aumento en la cantidad de recuperación del RNA en fibrocitos, esto por la adición de glicógeno en los pasos para extraer el RNA (Figura 7).

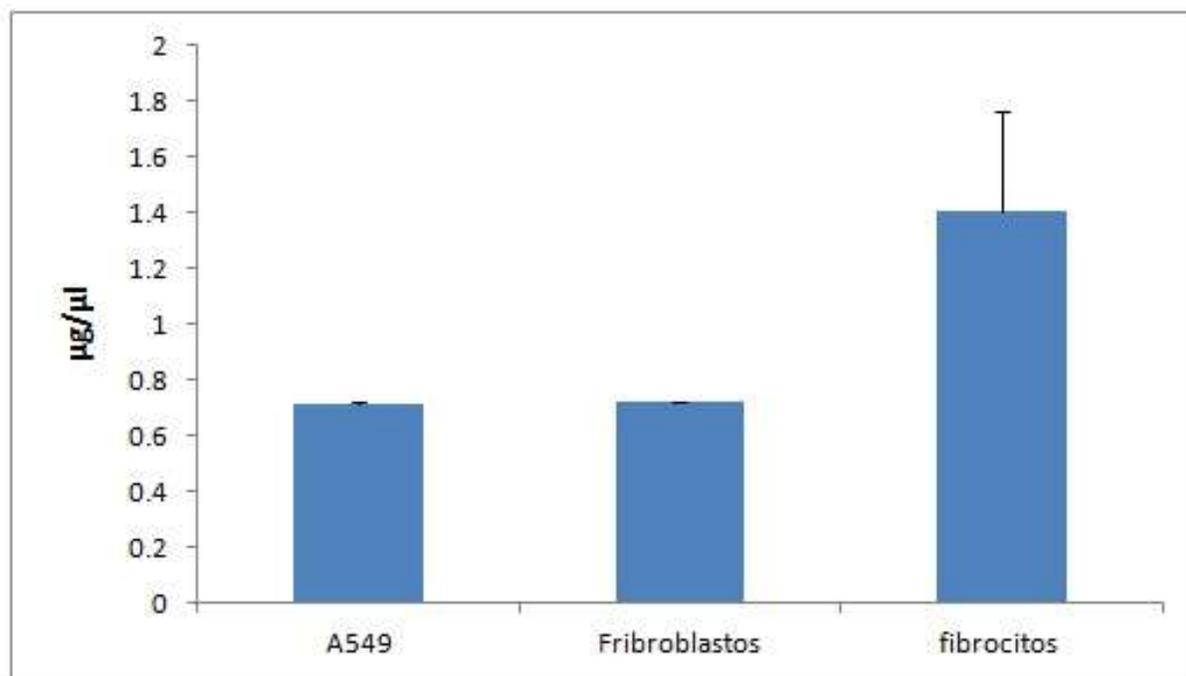


Figura 7. Representación grafica de la extracción del RNA de los diferentes tipos celulares.

5.2 Electroforesis del RNA

Para corroborar la calidad del RNA, tres muestras de células A549, Fibroblastos y Fibrocitos fueron sometidos a electroforesis.

El equivalente a 10µg de RNA fue cargado en cada carril del gel de agarosa al 1% dejándolo correr a 80 Volts durante 40 minutos (figura 8).

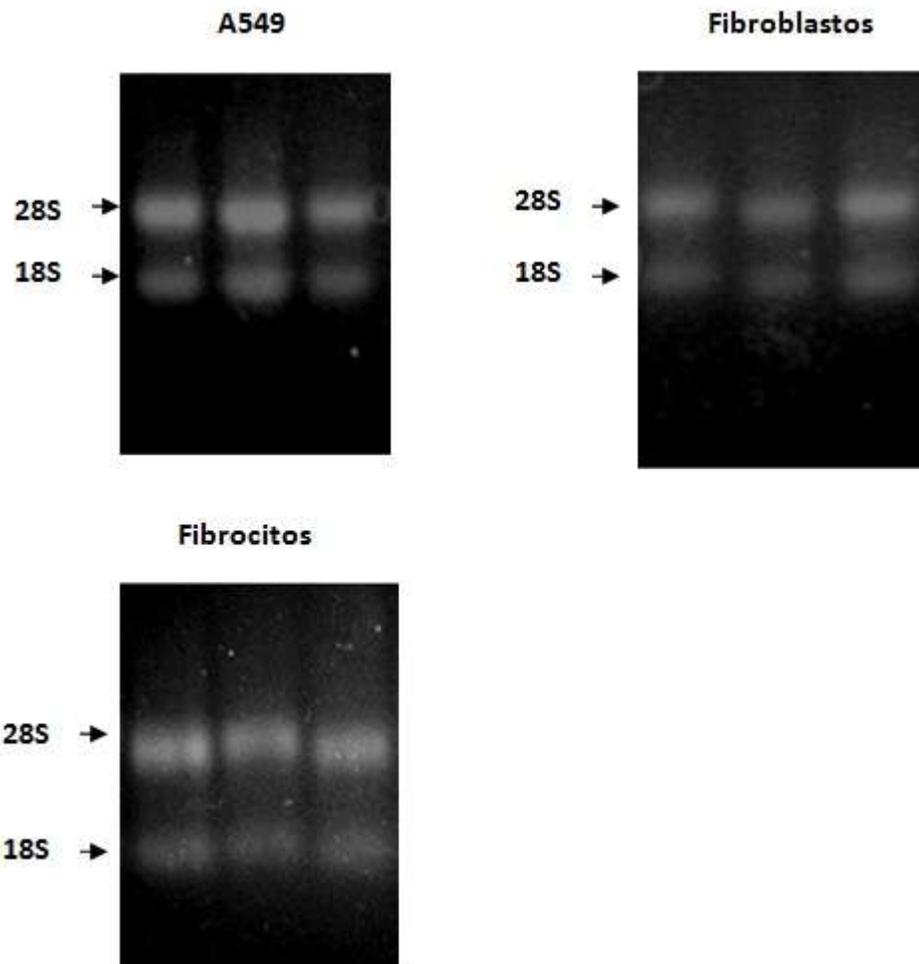


Figura 8. Electroforesis del RNA. Se muestran las bandas del 28S y 18S resueltas en un gel de agarosa al 1%, las bandas se observan intactas, lo cual indica una buena calidad del RNA.

La calidad del RNA es un requisito indispensable para posteriores análisis, es por esto que la técnica de extracción de RNA se debe hacer con sumo cuidado para evitar la contaminación de este, con el método de reactivo Trizol se observaron buenos resultados en cuanto a la calidad del RNA extraído, mostrando las bandas del 28S y 18S intactas (figura 8), sumado a esto la relación 260/280 son mayores a 1.7, lo cual indica el buen estado del RNA.

5.3 Extracción de proteínas por lisis con buffer RIPA

Se cultivaron tres cajas de células epiteliales (A549), tres de fibroblastos y tres de fibrocitos hasta llegar a 80% de confluencia. Estas células fueron sometidas a una lisis con buffer RIPA para obtención de proteína.

Dado que este buffer es uno de los más confiables utilizado para lisar células y extracción de proteínas, se utilizó este método como estándar de oro y así poder comparar el rendimiento de las otras técnicas (Cuadro 2).

Las células fueron bañadas con 50 μ l de Buffer RIPA posteriormente se recuperaron raspando la pared de la caja y se transfirieron a tubos eppendorf, para después Sonicarlas y centrifugarlas a 14000 rpm. Finalmente las proteínas fueron recuperadas del líquido sobrenadante y cuantificadas por el método de Bradford (Cuadro 2).

5.4 Extracción de proteínas a partir del sobrenadante fenol-etanol

El sobrenadante fenol- etanol resultante de la extracción de RNA fue utilizado para la extracción de proteínas por dos distintos métodos.

5.4.1 Diálisis del sobrenadante fenol- etanol

Los tubos que contenían el sobrenadante fenol-etanol de tres cajas para cada tipo celular fueron descongelados y dializados para la recuperación de proteínas.

El sobrenadante fenol-etanol se cargó en una membrana de diálisis. Durante la diálisis las muestras se separaron en tres fases (Figura 9), una fase incolora (aproximadamente 85% del volumen, la cual tiene únicamente el 2% de las proteínas), una masa globular (aproximadamente 10% del volumen la cual contiene el 98% de las proteínas), y un líquido incoloro viscoso (aproximadamente 5% del volumen). Observamos que la diálisis separa de manera eficiente las proteínas de los solventes debido al peso molecular de las proteínas.



Figura 9. Fases resultantes de la diálisis del sobrenadante fenol-etanol

Las proteínas fueron recuperadas de la masa globular y transferidas a tubos eppendorf para finalmente ser solubilizarlas en 50 μ l de 0.1% de SDS + 8M urea en tris-HCl, pH 8.0 1:1. Posteriormente, las proteínas fueron sonicadas y cuantificadas por el método de Bradford (Cuadro 2).

	A549	Fibroblastos	Fibroцитos
	μ g/ μ l	μ g/ μ l	μ g/ μ l
DIALISIS	4.32	3.9366	3.4366
RIPA	5.21333	4.6933	5.59
ACETONA	3.19666	2.54	2.793
PROMEDIO	4.24333	3.7233	3.93987
DE	0.82509	0.89193	1.19604

Cuadro 2. Cuantificación de proteínas extraídas por tres métodos diferentes. Los resultados se muestran por promedio de las tres cajas por tipo celular y se observa que para los tres tipos celulares la eficiencia del método de RIPA es mejor seguido de la diálisis y finalmente la precipitación con acetona.

5.4.2 Extracción de proteínas del sobrenadante fenol- etanol precipitándolo con Acetona

Los tubos restantes que contenían el sobrenadante fenol-etanol que representan tres cajas para cada tipo celular fueron descongelados y precipitados con acetona para la recuperación de las proteínas.

Por cada 100 μ l del sobrenadante se agregaron 300 μ l de acetona para precipitar las proteínas, posteriormente se centrifugaron a 5000 xg. El sobrenadante fue removido por decantación y el pellet rosa que contenía las proteínas (Figura 10) fue resuspendida en una solución de 1M Tris-HCl pH 8.5, para posteriormente sonicarlas y cuantificarlas por el método de Bradford (Cuadro 2).

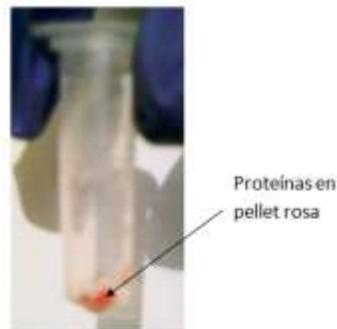


Figura 10. Pellet resultante de la precipitación del sobrenadante fenol-etanol con acetona, el cual contiene las proteínas totales.

Los resultados muestran que este método es el menos eficiente de los tres en cuanto a la recuperación de cantidad de proteína se refiere. Comparando lo con el método de buffer RIPA, en algunos casos se alcanza a ver que se recupera la mitad de la cantidad de proteína en μ g/ μ l por caja de cultivo (Figura 11), además de que la solubilización del pellet es más complicada en comparación con las otras dos y esto podría representar un problema al investigador si lo que necesita es grandes cantidades de proteína.

Los resultados muestran que el método de la diálisis, es más eficiente y se puede recuperar mayor cantidad de proteínas por caja de cultivo, en comparación del método de precipitación con acetona. Sin embargo comparando este método con el de buffer RIPA, es menos eficiente en cuanto a la recuperación de cantidad de proteína por caja de cultivo (Figura 11).

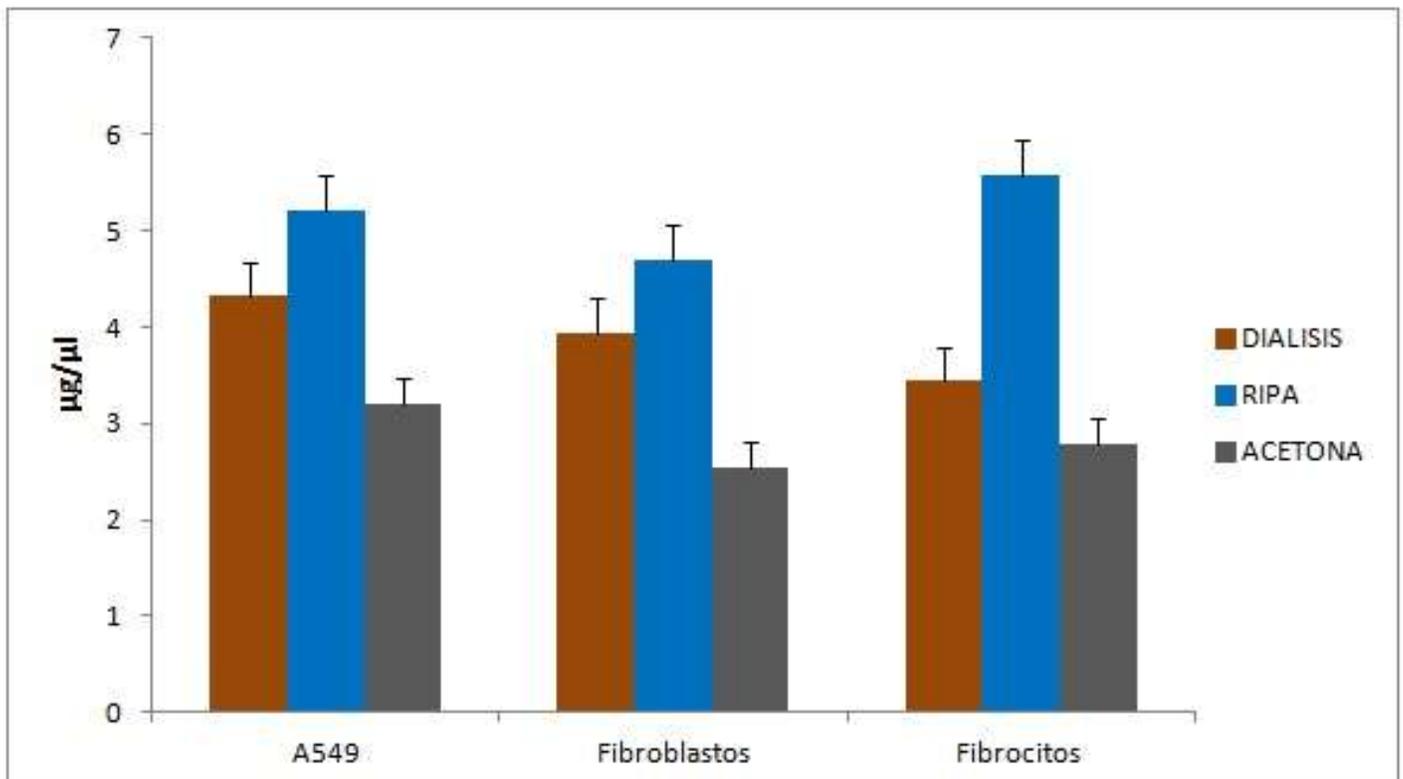


Figura 11. Representación grafica de la extracción de proteínas por tres métodos diferentes

5.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

La electroforesis de las proteínas es el método más utilizado para la purificación, separación y análisis de proteínas. Las proteínas obtenidas de los tres métodos de extracción se separaron en un gel de acrilamida al 10%, fueron cargados 20 μg de proteína. Una vez concluida la electroforesis, el gel se tiñó con azul de coomassie (Figura 12). Se observa que las proteínas resultan íntegras al extraerlas con estos tres métodos, ya sean proteínas grandes de hasta 250 KD o proteínas pequeñas de hasta 10 KD, lo cual nos indica que en cuanto a la calidad de las proteínas obtenidas, los tres métodos son similares (Figura12).

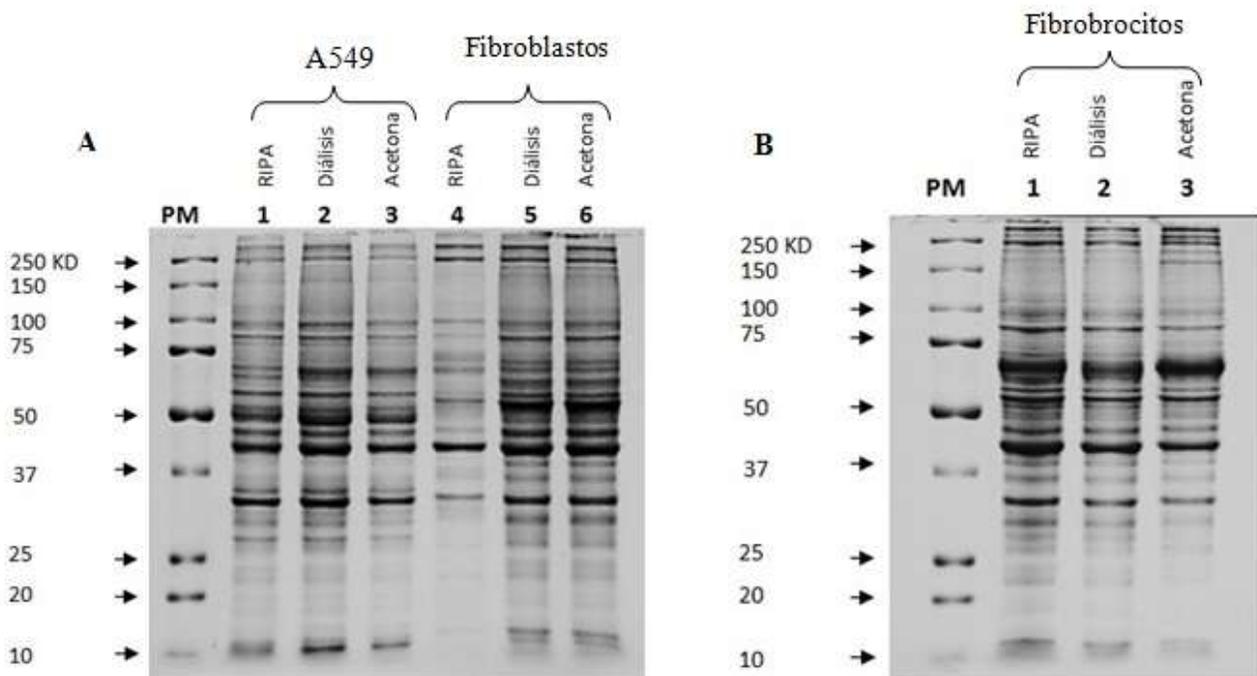


Figura 12. SDS-PAGE de las proteínas extraídas por los tres métodos. Se observa gran similitud en cuanto a la integridad de todas las proteínas.

5.6 Western blot

Para corroborar la calidad de los diferentes métodos de extracción para proteína, se realizó un western blot para β -tubulina (Figura 13). Dado que el western blot es uno de los métodos más utilizados para el análisis de las proteínas, se demuestra con esto que las proteínas obtenidas con estos métodos de extracción son compatibles con esta técnica. Se cargaron 20 μ g de proteína por muestra, las cuales fueron separadas en un gel de acrilamida al 10%, posteriormente transferidas a una membrana PVDF y finalmente reveladas. Se detectaron todas las bandas tal y como se esperaba de aproximadamente 50KD y con bandas similares entre los diferentes métodos. (Figura 13).

Esto nos indica que la única diferencia de estos métodos de extracción está en la cantidad de proteína en μ g/ μ l recuperada.

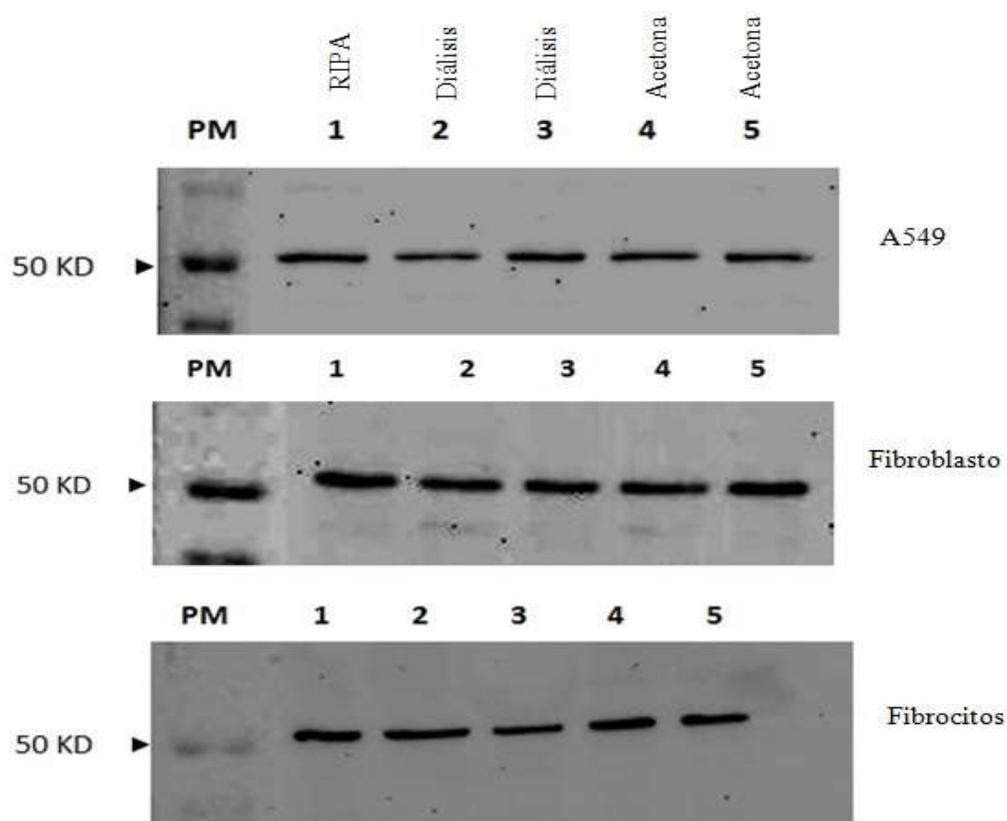


Figura 13. Western blot para β -tubulina. Compatibilidad de los métodos de extracción para el análisis de western blot en los diferentes tipos celulares.

VI. Discusión

Existen métodos que pueden incrementar la capacidad del investigador de analizar ácidos nucleicos y proteínas de la misma muestra biológica, lo cual se hace particularmente necesario e importante cuando se dispone de ejemplares biológicos pequeños o difíciles de obtener en las cuales es importante optimizar la muestra y así poder estudiarlas a nivel de RNA y proteínas en una misma muestra, sin la necesidad de hacer cultivos diferentes para cada molécula y así ahorrar tiempo, dinero y esfuerzo.

Tal es el caso de los fibrocitos, que han sido implicados en numerosos procesos inflamatorios y fibrosantes de diversos órganos, y dado que han adquirido una gran importancia biológica es necesario estudiarlos ampliamente. La obtención, purificación y mantenimiento de este tipo de células resulta difícil en comparación con otras, ya que son células que no proliferan mucho y existen en pequeños porcentajes en la circulación sanguínea.

Para nuestro conocimiento existen pocas técnicas de extracción simultánea de ácidos nucleicos y proteínas de la misma muestra, y la mayoría de estos métodos están basados en la extracción de RNA por el método de TRIzol (36).

Los resultados de esta tesis muestran que la extracción del RNA con reactivo TRIzol da relaciones de A260/A280 igual o mayores a 1.7, lo cual da confianza a este método, si lo que se desea es obtener un RNA con buena calidad y así no arriesgar las muestras biológicas que se quieran someter a pruebas del RNA delicadas. Así mismo se observó un aumento en la recuperación del RNA al agregar glicógeno a los pasos de extracción en fibrocitos (figura 7).

Para la realización de esta tesis, la extracción de proteínas del sobrenadante fenol-etanol posterior a la obtención del RNA, se llevó a cabo con dos métodos diferentes: uno mediante una diálisis del sobrenadante fenol-etanol y el otro mediante la precipitación del sobrenadante fenol-etanol con acetona, para comparar la eficiencia entre ellos y con el buffer RIPA el cual es el método estándar para obtención de proteínas en la mayoría de los laboratorios de biología molecular y celular.

Así mismo se aplicaron estos métodos a tres tipos celulares: Fibroblasto, células epiteliales (A549) y Fibrocitos. En cuanto a las cantidades de proteínas recuperadas en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ por estos dos métodos, observamos que la técnica de la diálisis es más eficiente que la de precipitación con acetona, este comportamiento se observa en los tres tipos celulares utilizados (figura 11). Lo anterior podría deberse a que la diálisis elimina de una manera más eficiente los solventes aprovechando el tamaño de las proteínas, lo cual deja un pellet de proteínas más puro (5). Sin embargo ninguna de las anteriores resultó con mayor eficiencia que el método con buffer RIPA en ninguno de los tipos celulares utilizados para estas pruebas.

Además de esto, los resultados demuestran que independientemente de la concentración de las proteínas recuperadas, con los tres métodos obtenemos la misma calidad de proteínas ya que en el SDS-PAGE se observan las proteínas en buen estado desde las pequeñas de 10 KD hasta las más grandes de 250 KD, así mismo en el SDS-PAGE no se ven diferencias para ningún tipo celular comparándolos con el método de buffer RIPA, lo que nos indica que la única diferencia es cuantitativa, siendo la calidad de recuperación de proteínas la misma.

Así mismo el análisis por western-blot para β -tubulina, que es una proteína constitutiva de las células indican satisfactoriamente que estos dos métodos son completamente confiables para el análisis de proteínas en westerns blot, ya que no hay diferencias comparándolo con el método de buffer RIPA.

VII. Conclusiones

- TRIzol es un método eficiente, no solo porque se extrae el RNA, sino también porque con este método se pueden recuperar las proteínas totales, este procedimiento es muy útil cuando se requiere comparar el transcriptoma y proteoma de la misma muestra.
- Si lo que se desea es analizar únicamente las proteínas de la muestra biológica, el método de Buffer RIPA es el indicado, ya que este está diseñado únicamente para extraer las proteínas y es un solubilizante muy eficiente, además de que los volúmenes en cuanto a $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ recuperados son los más altos en comparación con los otros métodos.
- Cuando es necesario analizar tanto RNA y proteínas de la misma muestra biológica, el método de la recuperación de proteínas por diálisis del sobrenadante Fenol-etanol es el más eficiente, ya que en este método por ser una diálisis separa de manera más eficiente las proteínas de las otras moléculas, además de que 0.1% de SDS + 8 M Urea en tris-HCl, pH 8.0 en grado biología molecular resulto ser mejor solubilizante que el utilizado en el otro método. Lo cual se ve reflejado en la cantidad de proteínas recuperadas en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, siendo este el método en el que mayor cantidad de proteínas se recuperaron, en comparación con el método de extracción de las proteínas por precipitación del sobrenadante fenol-etanol con acetona.
- Los tres métodos de extracción de proteína utilizados en esta tesis son compatibles con las técnicas que usualmente se aplican en laboratorios de biología molecular y celular, permitiendo con los tres un buen análisis para las proteínas, siendo la diferencia únicamente cuantitativa.
- La técnica de obtención de RNA y proteínas por diálisis es útil para aquellas células o muestras biológicas insuficientes y preciadas por el investigador, ya que con la misma muestra se pueden analizar ambas moléculas sin arriesgar la calidad de las pruebas.

VIII. REFERENCIAS

- 1.- Fauci, A. Braunwald, E. Kasper, D. Hauser, S. Longo, D. Jameson, J. Loscalzo, J. 2009. Harrison principios de Medicina Interna. Mc Graw Hill. 17 ed. México, D.F. Vol.1.
- 2.- Reif, D.M. White, B.C. and Moore, J. H. 2004. Integrated analysis of genetic, genomic and proteomic data. Future Drugs. 1478-9450.
- 3.- Soluciones QPCR, Extracción y purificación de los ácidos nucleicos. Protocolos PDF.
- 4.- David L. Nelson Michael M. Cox. 2009. Lehninger Principles of Biochemistry. Omega. 5 edition. Barcelona. ISBN 9788428214865.
- 5.- Castrillo J, L. 1992. Factores de Transcripción Específicos de Tejido. Investigación y Ciencia. No, 186. 64-72.
- 6.- Hernández, P. Martín Vasallo, A. Torres y E Salido. Análisis del RNA: Estudio de la expresión génica. NEFROLOGIA. Vol. XIV. Núm. 2, 1994.
- 7.- Lewin B. 1990. Genes IV. Oxford University Press. USA. 4th edition. ISBN-10: 0198542682.
- 8.- Liebler, D. 2002. Introduction to proteimics tolos for the new Biology. USA. ISSN 1478-9450.
- 9.- Thomas, M. Delvin, Ph. 1999. Bioquímica Libro de texto con aplicaciones clínicas. Editorial Reverté, S. A. 3ed. Vol. 1. España. ISBN 84-291-7205-X.
- 10.- Thomas, M. Delvin, Ph. 1999. Bioquímica Libro de texto con aplicaciones clínicas. Editorial Reverté, S. A. 3ed. Vol. 2. España. ISBN 84-291-7206-8.
- 11.- Michael T. Madigan, John M. Martinko, Jack Parker. 2004. Brock. Biología de los microorganismos. Décima edición. PEARSON Educacion, S. A., Madrid. ISBN: 84-205-3679-2.
- 12.- Horton, R. Moran, L. Scrimgeour, K. Perry, M. Rawn, J. 2006. Principles of biochemistry. Fourth edition. Rearson Pretice Hall. USA. ISBN 0-13-145306-8.
- 13.- Yamaguchi. M. Dffenbach. C. Connolly. R. Cruess. D. Baur. W. and Sharefkin. J. 1992. Effect of Different Laboratory Techniques for Guanidinium- Phenol-Chloroform RNA Extraction on A260/A280 and on Accuracy of mRNA Quantitation by Reverse Transcriptase- PCR. Technical Tips. 1:286-290.

- 14.- Chomezynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-choloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
15. - Chomezynski, P. and N. Sacchi. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-choloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols.* Vol.1 No.2. 10.1038.
- 16.- Simms, D. Cizdziel, P. Chomczynski. 1993. TRIzol™: A new reagent for optimal single-step isolation of rna. *Tools. Focus* 15 Number 4.
- 17.- Life technologies. TRIzol™. Reagent *Total RNA Isolation Reagent* . Cat. No. 15596.
- 18.- Rio DC, Ares M Jr, Hannon GJ, Nilsen TW. 2010. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc.* Jun (6):pdb.prot5439. 2051-6177.
- 19.- Boom, R., C J Sol, M M Salimans, C L Jansen, P M Wertheim-van Dillen y J van der Noordaa, 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28(3): 495-503.
- 20.- Raha S, Merante F, Proteau G, Reed JK. Simultaneous isolation of total cellular RNA and DNA from tissue culture cells using phenol and lithium chloride. *Genet Anal Tech Appl.* 1990 Nov;7(7):173-7. 170-6192.
- 21.- Luisa I. Falcón y Aldo Valera. 2003. Las herramientas moleculares. Capítulo 16 Extracción de ácidos nucleicos. Pp 501-515.
- 22.- Amaru, R. Peñaloza, R. Miguez, H. Torres, G. Cuevas H. 2008. UMSAgen, método para la extracción simultánea de RNA y DNA para diagnóstico molecular. Vol. 53 No. 1.
- 23.- QIAGEN. Oligotex mRNA Midi Kit. For mRNA purification from total RNA and for in vitro transcript cleanup.
- 24.- Falcon TM (Becton, Dickinson and Company). Kit S QuickGene de extracción de ARN en Células en Cultivo (RC-S).
- 25.- Pierce Biotechnology, Inc., 2/2006. INSTRUCTIONS RIPA Buffer. USA.
- 26.- Sefton, B.M. (2005). Labeling cultured cells with 32Pi and preparing cell lysates for immunoprecipitation. Unit 18.2. F. M. Ausubel, R. Brent, R.E.
- 27.- Universidad Nacional de Quilmes. 2010. TP2: Extracción y cuantificación de proteínas. <http://ibcmunq.files.wordpress.com/2010/03/tp2.pdf>.

- 28.- Radpour, R. Sikora, M. Grussenmeyer, T. Kohler, C. Barekati, Z. Holzgreve, W. Lefkovits, I. Zhong, X. 2009. Simultaneous Isolation of DNA, RNA, and Proteins for Genetic, Epigenetic, Transcriptomic, and Proteomic Analysis. *Journal of Proteome Research*. 5264–5274.
- 29.- Chomczynski P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*. Sep;15(3):532-4, 536-7. 7692896.
- 30.- Grzendowsk, M. Riemenschneider, M. Hawranke, E. Stefanski, A. Meyer, H. Reifenberger and Stuhler, K. 2009. Simultaneous extraction of nucleic acids and proteins from tissue specimens by ultracentrifugation: A protocol using the high-salt protein fraction for quantitative proteome analysis. *Proteomic*. 4985–4990.
- 31.- Hummon, A. Lim, S. Difilippantonio, M. and Reid, T. 2007. Isolation and solubilization of proteins after Trizol extraction of RNA and DNA from patients material following prolonged storage. *BioTechniques* 15:532-537.
- 32.- Wu, L.C. 1997. Isolation and long-term storage of proteins from tissue and cells using Trizol reagent. *Invitrogen Focus* 17:98-100.
- 33.- Tolosa, J. Schjenken, J. Civiti, T. Clifton, V. Smith, R. 2007. Column-based method to simultaneously extract DNA, RNA, and proteins from the same simple. *BioTechniques* 43:799-804.
- 34.- Morse, S.M.J., G. Shaw, and S.F. Lerner. 2006. Concurrent mRNA and protein extraction from the same experimental sample using a commercially available column-based RNA preparation kit. *BioTechniques* 40:54-58.
- 35.- Banerjee, S. Smallwood, A. Chambers, A. Nicolaides, K. 2003. Quantitative recovery of immunoreactive proteins from clinical samples following RNA and DNA isolation. *BioTechniques* 35:450-456.
- 36.- Hernández, A. Martín Vasallo, P. Torres A. y Salido, E. 1994. Análisis del RNA: Estudio de la expresión génica. *NEFROLOGIA*. Vol. XIV. Núm. 2.
- 37.- 2011 Applied Biosystems. Is your RNA intact? Methods to check RNA integrity: *AMBION TechNote* vol. 8(3).
- 38.- Cueto, M. Dorta, M. Munguía, O. Llabres, M. 2003. Desnaturalización y degradación de proteínas mediante colorimetría de barrido diferencial. *Tecnología farmacéutica* 61. España. 382000.

- 39.- Kyte, J. 1995. Structure in protein Chemistry. USA. Vol 24. ISBN 0-8153-1701-8.
- 40.- Bollag D.M., Edelman S.J., (1994) "Protein Methods". WileyLiss. Publications. USA. 229 p.
- 41.- Maldonado, A. Jesús, V. Novo, J. 2005. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana*. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales. 14071-Córdoba.
- 42.- Oakhill, J. Joannou, C. Buchanan, S. Gorringer, A. Evans, R.2002. Expression and purification of functional recombinant meningococcal transferrin-binding protein A. Biochemical Society. 364, 613-616.
- 43.- Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. Mol Med 1994; 1:71-81.
- 44.- Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. J Immunol 2001; 166: 7556-7562.
- 45.- Aiba, S., & Tagami, H. Inverse correlation between CD34 expression and proline-4-hydroxylase immunoreactivity on spindle cells noted in hypertrophic scars and keloids. J. Cutan. Pathol. 1997, 24, 65-69.
- 46.- Quan, T. E., Cowper, S., Wu, S. P., Bockenstedt, L. K., & Bucala, R. (2004). Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. Int. J. Biochem. Cell. Biol., 36, 598-606.
- 47.- Strieter, R. M., Gomperts, B. N., & Keane, M. P. (2007). The role of CXC chemokines in pulmonary fibrosis. J. Clin. Invest., 117, 549-556.
- 48.- Postlethwaite AE, Shigemitsu H, Kanangat S. Cellular origins of fibroblasts: possible implications for organ fibrosis in systemic sclerosis. Curr. Opin. Rheumatol. 2004; 16, 733-738.
- 49.- Chesney J, Metz C, Stavitsky AB, Bacher M, Bucala R. Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. J. Immunol. 1998; 160:419-425.
- 50.- Hartlapp I, Abe R, Saeed RW, Peng T, Voelter W, Bucala R, Metz CN. Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. FASEB J 2001; 15: 2215-24.

- 51.- Hong KM, Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Strieter RM. Differentiation of human circulating fibrocytes as mediated by transforming growth factor- β and peroxisome proliferator-activated receptor- γ . J Biol Chem. 2007; 282 (31): 22910–22920
- 52.- Nihlberg K, Larsen K, Hultgardh-Nilsson A, Malmström A, Bjermer L, Westergren-Thorsson G. Tissue fibrocytes in patients with mild asthma: A possible link to thickness of reticular basement membrane? Respir. Res.2006; 7: 50.
- 53.- Schmidt M, Sun G, Stacey MA., Mori L, Mattoli S. Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma. J. Immunol. 2003; 171: 380–389.
- 54.- Mehrad B, Burdick MD, Zisman DA, Keane MP, Belperio JA, Strieter RM. Circulating peripheral blood fibrocytes in human fibrotic interstitial lung disease. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007; 353: 104–108.
- 55.- Andersson-Sjöland A, García-de Alba C, Nihlberg Kristian, Becerril C, Ramírez R, Pardo A, Westergren-Thorsson G, Selman M. Int J Biochem Cell Biol. 2008; 40: 2129–2140.
- 56.- García C. *Fibrocytos circulantes. Descubrimiento, características y relevancia clínica.* Rev. Inst. Nal. Enf. Resp 2: 132-141, 2007.
- 57.- Sambrook, J. Russell, D. 2001. Molecular Cloning: A laboratory manual. 3 rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY.
- 58.- Ilaria, R., D. Wines, S. Pardue, S. Jamison, S.R. Ojeda, J. Snider, and M.R. Morrison. 1985. A rapid microprocedure for isolating RNA from multiple samples of human and rat brain. J. Neurosci. Methods 15:165-174.