

Trabajo Final de Laboratorio de Procesos Biotecnológicos

*“Silenciamiento del receptor del factor de
crecimiento epidérmico (EGFR) mediante
RNA de interferencia en el miocardio de
rata”*

María Soledad Brea

Director: Dr. Néstor Gustavo Pérez

Co-Director: Dr. Patricio Eduardo Morgan

Centro de Investigaciones Cardiovasculares

Facultad de Ciencias Médicas

Universidad Nacional de la Plata



La Plata, marzo de 2013

Índice

I. Introducción y Objetivos	4
I.A. Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)	5
1. Generalidades	5
2. Estructura del EGFR	5
3. Activación del EGFR	6
4. Ligandos extracelulares de los receptores ErbB	8
5. Receptores ErbB y sus ligandos en el corazón	8
I.B. El EGFR como parte de las señales intracelulares que conducen a la hipertrofia cardiaca	8
I.C. Silenciamiento génico mediante RNA de interferencia	11
• Sistema de delivery: lentivirus	12
I.D. Objetivos	13
1. Objetivo general	13
2. Objetivos específicos	13
II. Materiales y métodos	14
II.A. Diseño del shRNA-EGFR	15
II.B. Construcción del vector lentiviral	16
1. Generación del inserto	16
• Reacción de “annealing”	16
• Electroforesis de DNA en geles de agarosa	16
• Electroforesis de DNA en geles de poliacrilamida	17
• Digestión enzimática del inserto	17
• Purificación del inserto digerido	18
• Cuantificación del producto digerido	18
2. Generación del vector	18
• Vector utilizado para el clonado	18
• Digestión enzimática del vector	18
• Purificación del vector digerido	19
• Desfosforilación del vector	19
• Cuantificación del producto digerido	20
3. Ligación del inserto al vector	20
II.C. Producción y obtención del plásmido vector	20
• Bacterias <i>E. coli DH5-α</i>	20
• Preparación de bacterias <i>E. coli DH5-α</i> electrocompetentes	21
• Transformación de bacterias electrocompetentes	21
• Colony-PCR	22
• Aislamiento del vector: Miniprep	23
• Aislamiento del vector: Maxiprep	23
• Precipitación fenol-cloroformo	24
II.D. Análisis del plásmido vector generado	24
• Digestión enzimática del plásmido recombinante	24
• Reacción de PCR	24
• Transfección de células HEK 293	25

• Secuenciación	26
III. Resultados y Discusión	27
III.A. Diseño del shRNA-EGFR	28
• BLAST de la secuencia específica del EGFR y del SCR	28
• OligoAnalyzer para la cadena sense del shRNA-EGFR	29
III.B. Construcción del vector lentiviral	30
III.C. Producción y obtención del plásmido vector	32
III.D. Análisis del plásmido vector generado	34
IV. Conclusiones	39
IV. Conclusiones	40
V. Direcciones futuras	41
V. Direcciones futuras	42
VI. Bibliografía	43
VI. Bibliografía	44

I. Introducción y Objetivos

I.A. Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

1. Generalidades

Las células están continuamente expuestas a diversos estímulos, desde factores endócrinos y parácrinos solubles, hasta moléculas de señalización provenientes del entorno. Es de vital importancia que estas señales extracelulares sean interpretadas correctamente por la célula, a fin de ejecutar una respuesta apropiada de desarrollo y proliferación. La superfamilia de receptores de tirosina-kinasa (RTKs) tiene un rol fundamental en estos procesos. Mediante la unión a ligandos peptídicos específicos, son capaces de integrar esos estímulos externos con las vías internas de transducción de señales, contribuyendo de esa forma a la habilidad de la célula para responder correctamente a su entorno [1].

Las proteínas conocidas como ErbB pertenecen a la subclase I de la superfamilia de RTKs, que a su vez consta de cuatro miembros, uno de los cuales, el receptor del factor de crecimiento epidérmico o “EGFR” (Epidermal Growth Factor Receptor, también llamado ErbB1/HER1) reviste especial interés para el presente proyecto. Los restantes miembros de esa subclase son el ErbB2/Neu/HER2, el ErbB3/HER3 y el ErbB4/HER4. Todos ellos tienen en común un dominio extracelular de unión a ligando, una región transmembrana y un dominio citoplásmico con propiedades tirosina-kinasa. Una familia de ligandos, conocida como “factores de crecimiento peptídicos relacionados al EGF”, se une al dominio extracelular de los receptores ErbB dirigiendo la formación de homo y heterodímeros. La dimerización estimula la actividad tirosina-kinasa intrínseca de los receptores, produciendo la autofosforilación de residuos de tirosina específicos dentro del dominio citoplásmico. Estos residuos fosforilados sirven como sitios de anclaje para moléculas involucradas en la regulación de las cascadas de señalización intracelulares. Por último, los efectos “downstream” (expresión génica) determinan la respuesta biológica a la activación del receptor [1].

2. Estructura del EGFR

Pese a que existen variaciones en la capacidad de unión a ligando y en la actividad tirosina-kinasa, la estructura general de los dominios del EGFR es compartida para los 4 receptores ErbB (**Figura 1**). Todos son proteínas modulares largas, que están glicosiladas en sus dominios extracelulares y tienen un peso molecular de ~180 kDa [2].

El EGFR es sintetizado como un pro-receptor, que incluye un péptido señal para dirigirlo a su localización celular correcta en la membrana plasmática. La proteína madura de 1186 residuos (**Figura 1**) consiste en un dominio extracelular N-terminal (residuos 1-621), un dominio transmembrana simple (residuos 622-644), y una región intracelular que contiene un sub-dominio yuxtamembrana (residuos 645-684), un sub-dominio intracelular con actividad tirosina-kinasa (residuos 685-953) y una región regulatoria C-terminal no catalítica (residuos 954-1186) [3, 4]. El dominio extracelular glicosilado está formado por 4 sub-dominios, 2 de los cuales son homólogos ricos en Leucina que consisten en β -hélices plegadas (llamados I y III), mientras que los 2 restantes son ricos en Cisteína y están unidos entre sí por puentes disulfuro (llamados II y IV) [3, 4]. El dominio transmembrana es rico en aminoácidos hidrofóbicos y está flanqueado en el sitio intracelular por una región yuxtamembrana que tiene un rol regulatorio en la función del receptor. El subdominio catalítico con actividad tirosina-kinasa (PTK) es una estructura bilobular inusual, dado que a diferencia de otros miembros de la familia de receptores tirosina-kinasa, no requiere la fosforilación de un residuo tirosina conservado (Tyr845) para promover la actividad PTK.

La región C-terminal contiene gran cantidad de residuos tirosina, que son fosforilados en la activación del receptor [5].

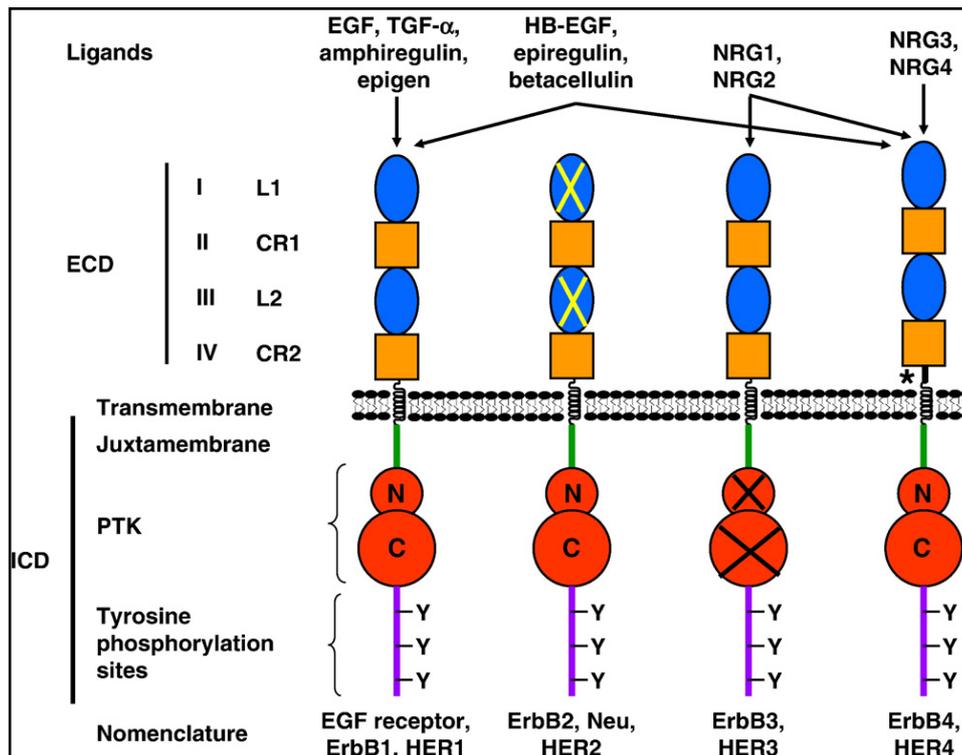


Figura 1: Receptores ErbB y sus ligandos. Los receptores ErbB consisten en un dominio extracelular (ECD), una región transmembrana simple (TM) y un dominio intracelular (ICD), que contiene el subdominio tirosina-quinasa (PTK). La región C-terminal contiene los residuos tirosina regulatorios, que son fosforilados cuando se activa el receptor. Las cruces en el dominio de unión a ligando del ErbB2 y en el dominio tirosina-quinasa del ErbB3 indican su falta de funcionalidad.

3. Activación del EGFR

El mecanismo de activación del EGFR ha sido estudiado en detalle. La homodimerización o la heterodimerización con otro miembro de la familia ErbB es esencial para la iniciación de la cascada de señales pero, inusualmente para los receptores de la familia tirosina-quinasa, estudios cristalográficos de rayos X sobre el dominio extracelular mostraron que los ligandos se unen a un solo receptor, induciendo la posterior dimerización [2, 3]. En el estado auto-inhibido (en ausencia de ligando extracelular), los subdominios I y III del ECD son mantenidos aparte por la presencia de una traba intramolecular entre los dominios II y IV, lo que retiene al ECD en una conformación cerrada (**Figura 2**). Los ligandos se unen de forma independiente al subdominio I o al III del ECD con baja afinidad, causando un cambio en la conformación del receptor. Este rearrreglo resulta en una unión de afinidad elevada del ligando a ambos subdominios, y en la ruptura de la atadura intracelular entre los subdominios II y IV. El cambio conformacional también expone un “brazo de dimerización” presente en el subdominio II (residuos 242-259 en el EGFR), permitiendo la subsecuente homodimerización o heterodimerización [3, 4].

La dimerización también juega un papel importante en la estimulación de la actividad PTK intracelular del EGFR (**Figura 3**). En el estado monomérico, el subdominio PTK se encuentra en una conformación inactiva auto-inhibida [6, 7]. En el proceso de dimerización, la actividad de PTK aumenta localmente cuando se forman dímeros PTK asimétricos. El lóbulo C de un monómero (monómero 1) se une al lóbulo N de otro monómero (monómero 2), y el monómero 1 actúa como un activador alostérico del

monómero 2, induciendo cambios conformacionales que fuerzan al monómero 2 a adoptar la conformación correcta para la catálisis [7, 8]. Múltiples residuos tirosina en la región C-terminal del EGFR son *trans*-fosforilados por la actividad del subdominio PTK en el dímero de receptores, y actúan como sitios de anclaje para la unión de proteínas efectoras [9].

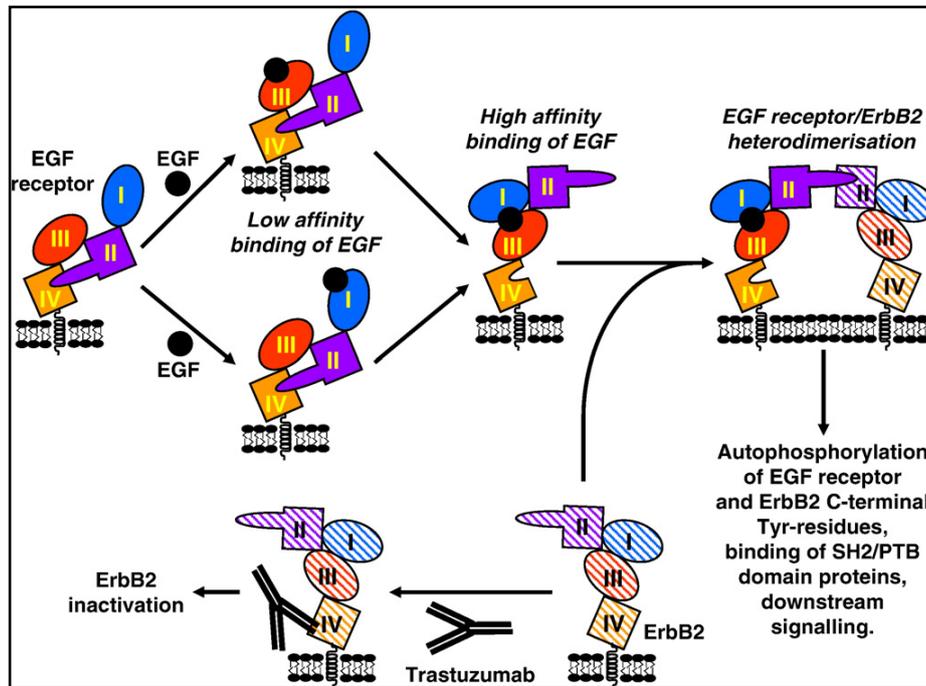


Figura 2: Rearreglo del dominio extracelular del EGFR y dimerización con el ErbB2. El cambio conformacional por la unión del ligando rompe la atadura intramolecular entre los subdominios II y IV y expone el brazo de dimerización. Este brazo interactúa con el brazo de otro receptor, y ocurre la dimerización.

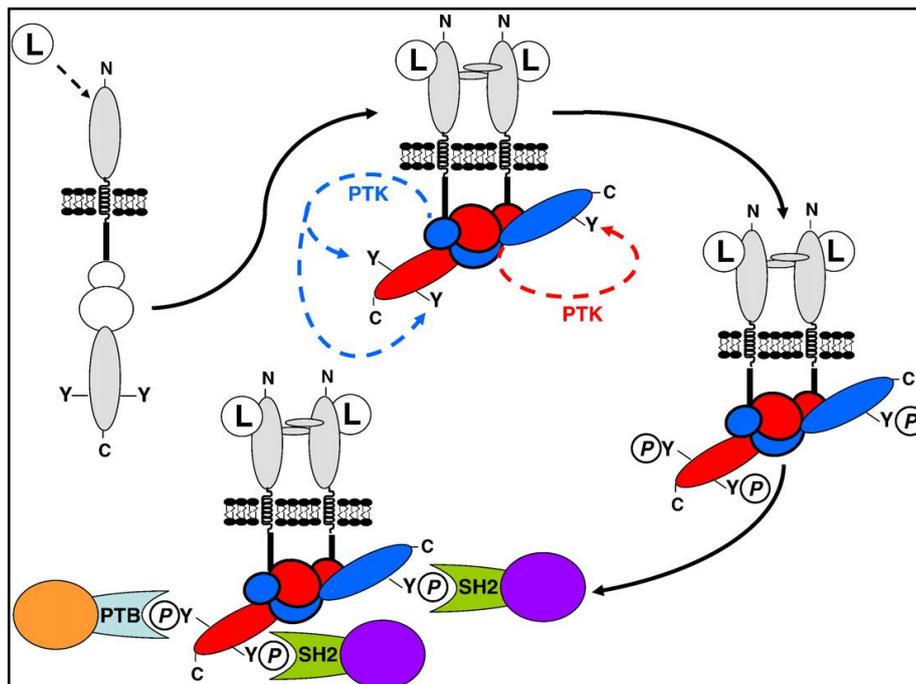


Figura 3: Dimerización y activación de los receptores ErbB. La unión de un ligando extracelular (L) expone el brazo de dimerización, los receptores dimerizan, y el dominio PTK del receptor 1 (rojo) transautofosforila residuos tirosina en la región regulatoria C-terminal del dominio intracelular del receptor 2 (azul) y viceversa. Subsecuentemente efectores que contienen dominios SH2 o PTB se unen a los residuos fosforilados.

4. Ligandos extracelulares de los receptores ErbB

Los 4 receptores ErbB presentan un gran número de ligandos peptídicos extracelulares que se unen a uno o más de los receptores (**Figura 1**). Los pro-ligandos son usualmente sintetizados como precursores transmembrana que son luego clivados proteolíticamente, para liberar los ligandos solubles [10, 11]. Los ligandos ErbB de elevada afinidad tienen un dominio “EGF-like” compuesto por 6 residuos Cisteína que forman tres puentes disulfuro intracelulares, definiendo una estructura secundaria con tres loops. El EGF (factor de crecimiento epidérmico), el TGF- α (factor de crecimiento transformante alfa), el HB-EGF (factor de crecimiento tipo EGF unido a heparina), la anfiregulina, la betacelulina y la epiregulina se unen al EGFR. Sin embargo, mientras que el EGF, el TGF- α y la anfiregulina se unen exclusivamente al EGFR, los otros 3 ligandos también activan al receptor ErbB4 (**Figura 1**). Una familia de ligandos, conocida colectivamente como neuregulinas (NRGs), se une al ErbB3 y al ErbB4.

5. Receptores ErbB y sus ligandos en el corazón

La mayoría de los receptores ErbB y muchos de sus ligandos son importantes en el desarrollo del corazón en etapas embrionarias. Los miocitos (células cardíacas) de ratas neonatas y adultas expresan transcritos de EGFR, ErbB2 y ErbB4, pero los transcritos del ErbB3 no han podido ser detectados. En cuanto a los ligandos, los miocitos de ratas neonatas expresan transcritos de EGF y NRG1 [12], y tanto los adultos como los neonatos expresan RNA mensajero del HB-EGF [13]. Una consideración adicional es que los receptores ErbB no están uniformemente distribuidos en la membrana plasmática de los miocitos cardíacos, sino que están localizados en regiones específicas.

1.B. El EGFR como parte de las señales intracelulares que conducen a la hipertrofia cardíaca (HC)

Durante casi dos décadas, diversos proyectos de investigación desarrollados en el Centro de Investigaciones Cardiovasculares (CIC) han centrado sus objetivos en la dilucidación de los mecanismos que subyacen al desarrollo de hipertrofia cardíaca (HC). En tal sentido, el descubrimiento de la hiperactividad del intercambiador Na^+/H^+ (NHE1) en el miocardio hipertrófico de ratas espontáneamente hipertensas en el año 1995 [14], planteó la inevitable pregunta de si dicha alteración era causa o efecto de la HC. Experimentos posteriores permitieron demostrar que el estiramiento del miocardio, considerado una señal temprana disparadora de HC, promueve la formación/liberación de factores neurohumorales pro-hipertróficos como Angiotensina II (Ang II), Endotelina-1 (ET-1) y Aldosterona (Ald), que activan vías de señalización intracelular que involucran el aumento de la producción de especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS), fundamentalmente de origen mitocondrial, y que confluyen en la activación del NHE1.

La actividad exacerbada del NHE1 en el miocardio ha sido vinculada al desarrollo de distintas patologías que se caracterizan por un anormal crecimiento del tejido, en particular el remodelamiento post-infarto de miocardio y la HC [15], condiciones ambas que pueden conducir a la insuficiencia cardíaca seguida de

muerte. Se ha demostrado que la hiperactividad del NHE1 conduce al aumento de la concentración intracelular de Na^+ y consecuentemente de Ca^{2+} a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, favoreciendo la activación de señales intracelulares disparadoras de transcripción génica y síntesis proteica, y determinando así el desarrollo de HC. Además de estos efectos a largo plazo, este aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular es el responsable en lo inmediato de la segunda fase de fuerza post-estiramiento del miocardio (SFR, del inglés slow force response) o efecto Anrep, que se manifiesta luego del aumento de fuerza inicial debido al mecanismo de Frank-Starling (**Figura 4**). La similitud entre los mecanismos agudos que conducen a la SFR y las señales intracelulares que conducen a la HC han hecho del efecto Anrep un modelo muy atractivo para analizar la fisiopatología cardiovascular [16-18]. Este concepto se refuerza en el hecho de que muchas de las intervenciones que cancelan la SFR y se enumeran en la **Figura 4** han sido usadas exitosamente para prevenir la HC [19-28].

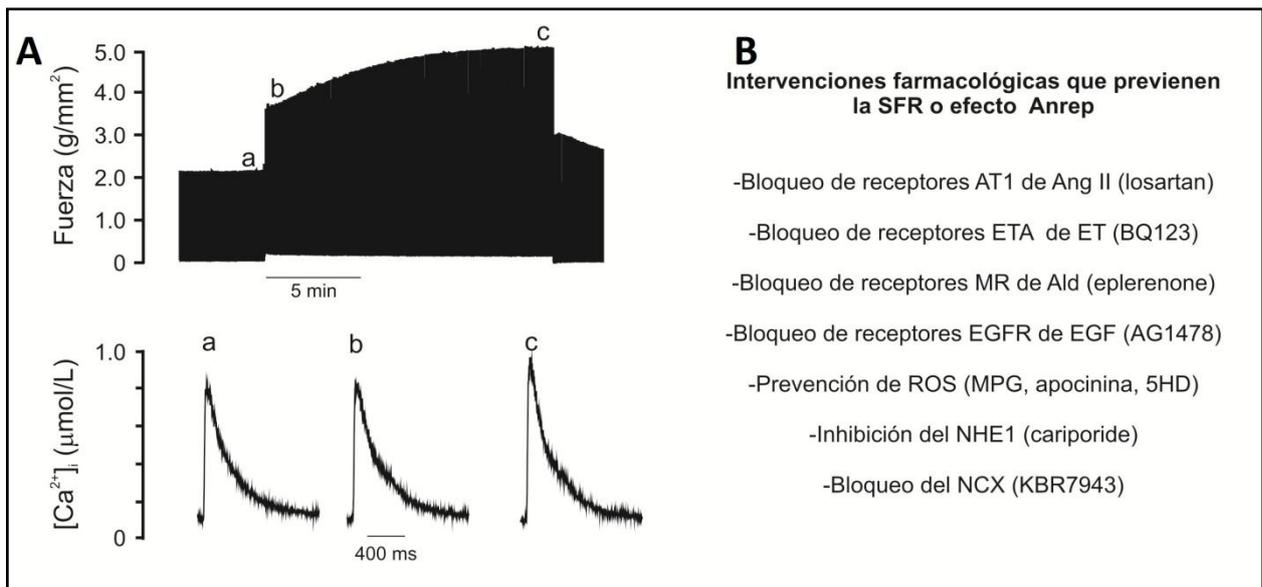


Figura 4: **A.** Trazado de fuerza contráctil de un músculo papilar aislado contrayéndose isométricamente mostrando la primera fase de aumento de fuerza post-estiramiento o mecanismo de Frank-Starling, de “a” a “b”, que se produce sin cambios en el transient de Ca^{2+} intracelular (panel inferior) y es atribuido a un aumento de la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos (Frank-Starling), y la SFR, de “b” a “c”, debida a un aumento del transient de Ca^{2+} intracelular. **B.** Intervenciones farmacológicas que previenen la SFR, muchas de las cuales han sido usadas con éxito para prevenir la HC.

La SFR ha sido el foco de interés de numerosas proyectos de investigación del CIC durante la última década. Esto ha permitido sugerir que el estiramiento dispara una compleja ruta de señalización cuyos principales pasos se esquematizan en la **Figura 5**, y ha proporcionado un escenario propicio para el desarrollo de nuevas líneas de investigación tendientes a explorar la posibilidad de hallar nuevas estrategias terapéuticas para prevenir la hiperactivación crónica del NHE1 y el consecuente desarrollo de HC, mediante intervenciones que afecten alguno de los eslabones de esta vía de señalización intracelular. En tal sentido, un trabajo reciente que ha sentado las bases para el desarrollo del presente proyecto de investigación, ha permitido sugerir que la activación post-estiramiento del EGFR es un paso clave en la ruta ROS-dependiente de activación de kinasas redox-sensibles (ERK1/2-p90RSK), cuyo blanco de fosforilación (y por lo tanto activación) es el NHE1, y cuyo resultado final es la SFR. Dado que estos resultados se han obtenido usando herramientas farmacológicas para bloquear al EGFR, y este tipo de intervenciones suelen tener un cierto grado de inespecificidad que no solo cuestiona la validez de los resultados sino que a su vez condiciona su potencial uso terapéutico, el desarrollo de un RNA de interferencia contra el EGFR que sea capaz de silenciarlo como se propone en este proyecto permitiría contar con una poderosa herramienta para probar de manera más específica que el EGFR se activa post-

estiramiento del miocardio. Esta estrategia no solo permitiría corroborar si el EGFR se encuentra en

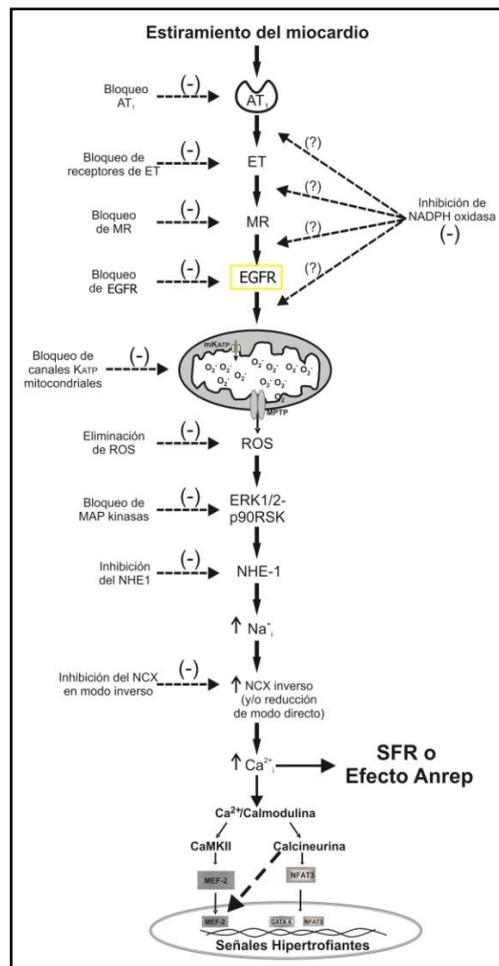


Figura 5: Representación esquemática de la hipotética cadena de señales intracelulares disparadas por el estiramiento miocárdico, así como de los potenciales sitios de inhibición de pasos intermedios que permitirían prevenir la SFR y eventualmente la HC. El comienzo es la liberación de Ang II, seguido de liberación de ET, activación del receptor de mineralocorticoide (MR), transactivación del EGFR, despolarización mitocondrial por apertura de los canales de potasio ATP-dependientes de la mitocondria (mKATP) y liberación de ROS mitocondriales, activación de quinasas redox-sensibles, estimulación del NHE1, aumento de la concentración intracelular de Na^+ y subsiguiente aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} a través del NCX, señal que conduce a la SFR o efecto Anrep. Además, el aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} es una señal hipertrofiante que promueve la migración al núcleo de factores desencadenantes de síntesis proteica. Como se menciona en el texto, es importante destacar que muchas de las intervenciones que cancelan la SFR también han sido efectivas para prevenir la HC [19-28]. Esto sustentaría la idea de que la cadena de eventos disparada por el estiramiento y que conduce al desarrollo de la SFR en lo inmediato (10-15 min), podría, de sostenerse en el tiempo, ser la causante del desarrollo de HC.

la ruta de activación del NHE1 en respuesta al mencionado estímulo mecánico (estiramiento) como se propone en la **Figura 5**, sino que además, como consecuencia de ello, podría sentar las bases para su utilización como herramienta terapéutica antihipertrófica.

I.C. Silenciamiento génico mediante RNA de interferencia

El RNA de interferencia (RNAi) es un fenómeno de silenciamiento génico post-transcripcional, específico de secuencia y evolutivamente conservado. Es disparado por moléculas de RNA doble cadena, tal como fue descrito por primera vez en *C. elegans* [29]. El silenciamiento por RNAi comprende una vía intracelular de múltiples pasos, que puede ser dividida en 2 fases: la fase de iniciación y la fase efectora. En la fase de iniciación, moléculas de RNA doble cadena de origen endógeno o exógeno presentes en la célula, son procesadas a través de la actividad de clivaje de una proteína tipo ribonucleasa III, denominada Dicer, en fragmentos nucleotídicos de 21-23 nt, denominados “small interference RNAs” (siRNAs) [30]. Estos siRNAs efectores son incorporados, en el comienzo de la fase efectora, a un complejo multiproteico denominado RISC (complejo de silenciamiento inducido por RNA) [31]. A través del desenrollamiento del siRNA por medio de una actividad RNA helicasa [32], el complejo se vuelve activo y utiliza el siRNA simple hebra como guía hacia el RNA blanco complementario. Luego de la unión del siRNA a su RNA mensajero blanco por hibridación, el complejo RISC cataliza el clivaje endonucleotídico de la hebra de RNA mensajero dentro del sitio blanco lo cual, debido a la generación de extremos desprotegidos en el RNA, provoca su rápida degradación. Dado que el complejo RISC se recupera para sucesivos ciclos de unión y clivaje, el proceso completo lleva a una reducción neta de los niveles de RNA específico, provocando una disminución de la expresión del gen correspondiente (**Figura 6**).

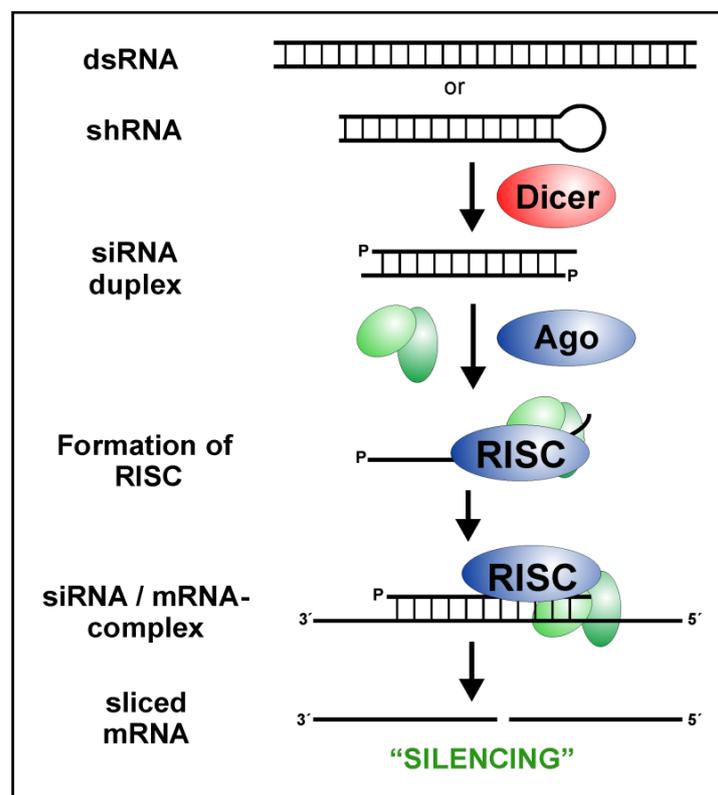


Figura 6: Mecanismo del RNA de interferencia en mamíferos.

En los mamíferos, los siRNAs pueden ser introducidos por transfección transitoria de siRNAs sintéticos [33, 34], o por transfección transitoria o estable de construcciones que expresan short hairpin RNAs (shRNAs) a partir de promotores de la RNA polimerasa III [35-37]. Los dos promotores más comúnmente usados para la expresión de hairpins son el H1 y el U6 dado que usualmente dirigen la síntesis de snRNA (small nuclear RNA) y que tienen elevada eficiencia y expresión ubicua. Están adaptados para expresar

shRNAs en un cassette de un tamaño aproximado de 60 nt, que incluyen una secuencia sense de 21-23 nt que es idéntica a la secuencia blanco en el RNA mensajero a ser degradado, seguida por un loop de 9 nt y una secuencia antisense de 21-23 nt. Un tramo de 5 timidinas proporciona la señal de terminación transcripcional. La expresión de esta construcción (**Figura 7**) resulta en un hairpin pequeño de 21-23 nt; el loop es clivado entonces por la endonucleasa Dicer y los siRNAs resultantes disparan la degradación del mensajero blanco [38].

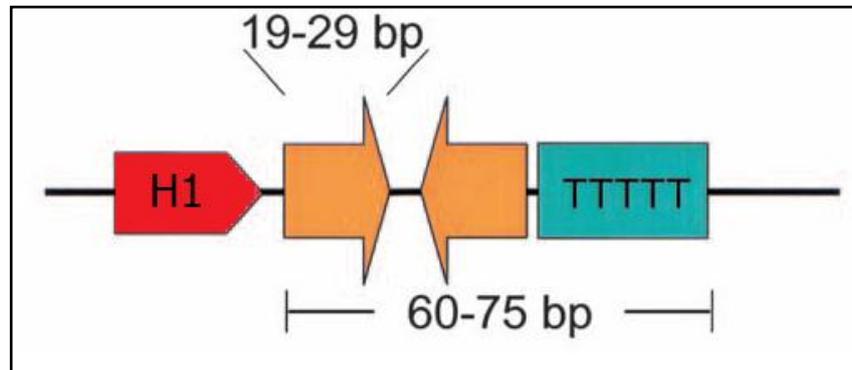


Figura 7: Esquema de la secuencia que codifica al shRNA, con los tramos de 19-29 pb de homología con la secuencia blanco separados por el loop, precedidos por el promotor de la RNA polimerasa III H1, y seguidos del terminador transcripcional.

- **Sistema de delivery: lentivirus**

Los vectores lentivirales derivados del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) son capaces de transducir una amplia variedad de células en división y terminales (que ya no se dividen), y se integran de forma estable en el genoma del huésped, permitiendo una expresión prolongada del transgen [39]. El genoma del HIV-1 contiene 9 marcos de lectura abiertos que codifican para al menos 15 proteínas distintas, incluyendo proteínas estructurales y regulatorias, que están involucradas en el ciclo de infección. La estrategia general usada para producir partículas de vector lentiviral ha sido eliminar del genoma del HIV-1 todos los elementos que son absolutamente indispensables para la producción de partículas virales, la infección y la integración [40].

Los vectores lentivirales de tercera generación más comúnmente utilizados (y que se usarán en el presente trabajo), consisten en 4 plásmidos (**Figura 8**). El vector de transferencia contiene el transgen de interés, y todos los elementos-*cis* requeridos para la producción de RNA y el empaquetamiento. El sistema de empaquetamiento involucra 3 plásmidos adicionales (**Figura 8**), que proveen los factores *trans* requeridos, llamados Gag-Pol, proteína de envoltura y Rev, respectivamente. Gag-Pol codifica para una integrasa, una transcriptasa reversa, y proteínas estructurales. Las proteínas estructurales son requeridas para la producción de las partículas, mientras que la integrasa y la transcriptasa reversa son empaquetadas dentro de la partícula viral y actúan más adelante en el proceso de infección e integración. Rev interactúa con el elemento de respuesta Rev (RRE), que es una secuencia contenida en el vector de transferencia, que aumenta la exportación del RNA genómico viral del núcleo, favoreciendo el incremento del título viral [40].

Las partículas virales pueden ser tipificadas con una gran variedad de proteínas de envoltura. Una de las más utilizadas es la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), la cual es incorporada en la membrana viral y le confiere la habilidad de transducir una gran variedad de tipos celulares (**Figura 8**) [40].

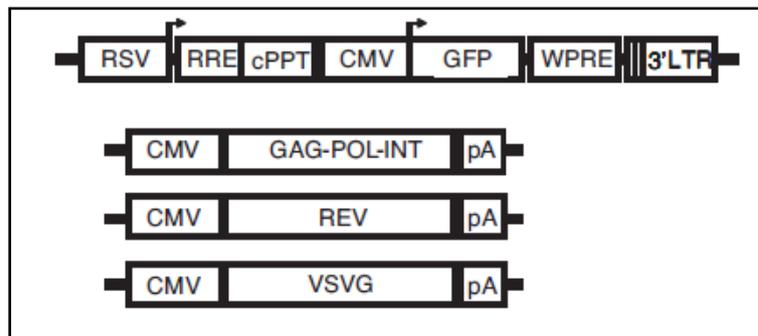


Figura 8: Vector lentiviral de tercera generación. El vector de transferencia (superior) contiene el transgen de interés y todos los elementos *cis* necesarios para la replicación y el empaquetamiento de las partículas virales. Los 3 plásmidos accesorios (inferiores) proveen los factores *trans* requeridos.

I.D. Objetivos

De acuerdo con lo expuesto hasta aquí describiremos a continuación el objetivo general del presente proyecto de investigación, así como los objetivos específicos que esperamos poder alcanzar.

1. Objetivo general

Inhibir de forma específica el EGFR en el corazón de rata usando una metodología que permita evitar los efectos colaterales no deseados de las intervenciones farmacológicas.

Para ello se usará la técnica del RNA de interferencia para silenciar de manera precisa la expresión de la isoforma 1 del receptor (EGFR, ErbB1) sin afectar los otros miembros de esta familia presentes en el corazón (ErbB2, ErbB4).

2. Objetivos específicos

En una primera etapa se proyecta:

- 1) Buscar la secuencia de EGFR para confeccionar el short hairpin RNA contra el EGFR (shRNA-EGFR) y diseñarlo con todos los elementos necesarios para su funcionamiento intracelular.
- 2) Clonar el shRNA-EGFR dentro de un plásmido vector lentiviral.
- 3) Confirmar la secuencia clonada en el vector a través de PCR, cortes con enzimas de restricción y secuenciación.
- 4) Confirmar funcionalidad del shRNA-EGFR en células HEK293T.

En una segunda etapa se apuntará a:

- 1) Generación purificación y cuantificación del lentivirus, para luego confirmar su funcionalidad.
- 2) Inyectar el lentivirus con el shRNA-EGFR en la pared antero-lateral del ventrículo izquierdo de corazones de rata y garantizarnos la total recuperación post-quirúrgica de los animales.
- 3) Probar la efectividad del tratamiento al cabo de un tiempo estipulado (1 mes), para lo cual se sacrificará a los animales, se les extraerá el corazón y se analizará la expresión (RNA mensajero y proteínas) y función del EGFR.

II. Materiales y Métodos

II.A. Diseño del shRNA-EGFR

Para diseñar el RNA de interferencia, lo primero que se hizo fue buscar en bibliografía secuencias que hubieran sido utilizadas para silenciar el EGFR con éxito. La secuencia elegida fue extraída del trabajo de Feng y col. [41], quienes la utilizaron para disminuir la expresión del EGFR en miocardio de rata:

5' - GCATAGGCATTGGTGAATT -3'

A continuación, se verificó mediante el programa BLAST (NCBI) que la secuencia elegida fuera específica del EGFR y no silenciara ningún otro componente del genoma de rata. El genoma elegido para el alineamiento fue el de la especie *Rattus norvegicus*, el set de búsqueda se limitó a la opción "RefSeq RNA" (secuencias de RNA que están alistadas y verificadas), y el programa elegido fue el "blastn", que busca todas las secuencias nucleotídicas similares. Una vez finalizadas las pruebas sobre la secuencia inhibidora, se procedió a la confección de la secuencia "scramble" (revolver) que denominaremos "SCR", la cual consiste en una secuencia de la misma longitud y con las mismas bases que la secuencia codificante pero en orden aleatorio, por lo que no debería ser específica para ningún elemento del genoma y por lo tanto se la puede utilizar como control "no silenciador". Para obtener la secuencia scramble se trabajó con la herramienta "online" "siRNA design center" de GenScript (www.genscript.com), programa que al introducir la secuencia inhibidora del EGFR sugirió la siguiente secuencia scramble:

5' - ATGGCATTGCGATAAGTTG -3'

Se realizó un análisis con el BLAST de la secuencia obtenida, para confirmar que no inhibiera ningún elemento de forma específica.

Luego de obtenerse la secuencia silenciadora del EGFR y la SCR, se procedió a diseñar los shRNA, adicionando los elementos necesarios para su funcionamiento intracelular: una secuencia loop, fundamental para la formación del "hairpin"; un terminador de la transcripción, y los sitios de corte para las enzimas de restricción utilizadas en el proceso de clonado, BamHI y PacI. Dado que la estrategia de clonado consiste en tener al inserto ya cortado, los sitios de restricción incluidos no están completos, sino que tienen las bases que hubieran quedado luego del corte. Con todos estos elementos, la secuencia final del shRNA-EGFR es:

GATCC	c	GCATAGGCATTGGTGAATT	TTCAAGAGA	AATTCACCAATGCCTATGC	g	TTTTTCCAA	TTAAT
BamHI		target sense	loop	target antisense		terminator	PacI

Figura 9: secuencia completa del shRNA-EGFR.

Esta secuencia final fue utilizada para un análisis con la herramienta OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies) [42], a fin de simular el hairpin, y estudiar sus propiedades.

II.B. Construcción del vector lentiviral

1. Generación del inserto

- **Reacción de “annealing”**

La reacción de annealing es aquella mediante la cual secuencias complementarias de DNA o RNA simple cadena se unen mediante enlaces por puente de hidrógeno, para formar una molécula doble cadena.

En este trabajo, el inserto doble cadena se formó por annealing de 2 primers complementarios. Se utilizaron DNA primers preparados por la empresa Invitrogen con los sitios de restricción ya cortados para formar el shRNA-EGFR y el shRNA-SCR, de acuerdo a la siguiente secuencia:

EGFR sense: 5'- GAT CCC GCA TAG GCA TTG GTG AAT TTT CAA GAG AAA TTC ACC AAT GCC TAT GCG TTT TTT CCA ATT AAT -3'

EGFR antisense: 5'- TAA TTG GAA AAA ACG CAT AGG CAT TGG TGA ATT TCT CTT GAA AAT TCA CCA ATG CCT ATG CGG -3'

SCR sense: 5'- GAT CCC ATG GCA TTG CGA TAA GTT GTT CAA GAG ACA ACT TAT CGC AAT GCC ATG TTT TTT CCA ATT AAT -3'

SCR antisense: 5'- TAA TTG GAA AAA ACA TGG CAT TGC GAT AAG TTG TCT CTT GAA CAA CTT ATC GCA ATG CCA TGG -3'

Además se pidieron a la misma empresa las cadenas para formar un inserto de EGFR con los sitios de restricción completos:

EGFR sense: 5'- CCA CTC GGA TCC CGC ATA GGC ATT GGT GAA TTT TCA AGA GAA ATT CAC CAA TGC CTA TGC GTT TTT TCC AAT TAA TTA AGG TAC C -3'

EGFR antisense: 5'- GGT ACC TTA ATT AAT TGG AAA AAA CGC ATA GGC ATT GGT GAA TTT CTC TTG AAA ATT CAC CAA TGC CTA TGC GGG ATC CGA GTG G -3'

Inicialmente la reacción de annealing se realizó mezclando 20 µl de sense EGFR (50 µM), 20 µl de antisense EGFR (50 µM) y 2 µl de NaCl (50 mM). Se calentó la mezcla de reacción por 2 min a 95 °C en un baño termostático (*Vicking modelo Masson*) y se enfrió lentamente hasta llegar a temperatura ambiente. Se probó el agregado de DMSO en distintos porcentajes finales [38], para evitar la formación de estructuras secundarias que pudieran impedir la hibridización del DNA doble cadena.

Por otro lado, se realizó un annealing alternativo siguiendo las indicaciones del protocolo *BLOCK-iT™ Inducible H1 RNAi Entry Vector Kit* (Invitrogen) [43]. La mezcla de reacción se realizó colocando 10 µl de sense EGFR (50 µM), 10 µl de antisense EGFR (50 µM), 2 µl de NaCl (100 mM) y 0,4 µl de EDTA (1mM). Se calentó la mezcla a 95 °C por 4 min, y luego se enfrió rápidamente a temperatura ambiente (5-10 min). Se realizó una dilución 1/100 de la mezcla, que se utilizó para correr un gel de agarosa, y a su vez se realizó una dilución 1/100 de la primera dilución para llevar a cabo el clonado.

La formación del DNA doble hebra se verificó a través de geles de agarosa y de poliacrilamida.

- **Electroforesis de DNA en geles de agarosa**

La electroforesis es una técnica utilizada para describir la migración de una partícula cargada bajo la

influencia de un campo eléctrico. Como los fragmentos de DNA tienen carga negativa se mueven hacia el electrodo positivo cuando se aplica un campo eléctrico. Esta técnica permite analizar el tamaño del DNA contenido en una muestra dada. En nuestro caso fue empleada para analizar resultados de reacciones de annealing, de reacciones de PCR, de digestiones enzimáticas y de extracciones y purificaciones de plásmidos o fragmentos de DNA.

Los geles empleados variaron en los porcentajes de agarosa entre 0,5% y 4%, y fueron preparados en buffer TAE 1X (40mM Tris, 20mM ácido acético, 1mM EDTA, pH=8). Como marcador de peso molecular se utilizó *GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder* (Fermentas), *GeneRuler™ 1Kb DNA Ladder* (Fermentas) o *GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder* (ULR, Fermentas), según sea el tamaño del DNA a analizar. Se empleó como buffer de corrida TAE 1X, y el voltaje fue de 100V. Las muestras se prepararon para la corrida agregando distintos volúmenes de *Loading Buffer 6X* (Fermentas) y 1-2 µl del colorante *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium). Se analizó por transiluminación UV (*Chemidoc Imaging System*, Bio Rad).

- **Electroforesis de DNA en geles de poliacrilamida**

La electroforesis en geles de poliacrilamida presenta como técnica el mismo fundamento que la electroforesis en geles de agarosa: dado que el DNA contiene carga negativa, al aplicarse un campo eléctrico migrará al polo positivo. Esta clase de geles se utilizó para analizar las distintas variantes de annealing ensayadas, y se preparó de la siguiente manera: 1,5 ml de TAE 1X, 6 ml de acrilamida 30%, 6 ml de agua, 120 µl de persulfato de amonio (APS) y 10 µl de TEMED.

Como marcador de peso molecular se utilizó el *Ultra Low Range* (ULR, Fermentas), el buffer de corrida empleado fue TAE 1X y el voltaje promedio fue de 200 V. Las muestras se prepararon para la corrida agregando 6 µl de non-denaturing loading buffer (1 µl de GelRed) y se las llevó a 20 µl finales con agua. Para la visualización se utilizó el equipo *Chemidoc Imaging System* (Bio Rad).

- **Digestión enzimática del inserto**

En la variante de clonado que comprende la utilización de los primers con los sitios de restricción completos, es necesario digerirlos con las enzimas de restricción correspondientes para luego ligarlos al vector. Las enzimas de restricción son enzimas que hidrolizan el DNA doble hélice en posiciones específicas de su secuencia, permitiendo la generación de extremos cohesivos que pueden ligarse con otros fragmentos de DNA.

Las enzimas utilizadas en este trabajo fueron *BamHI* y *PacI* (New England Biolabs). El inserto fue digerido en primera instancia con *BamHI*, colocando por cada tubo 2 µl del inserto, 2 µl de Buffer NEB 3, 0,2 µl de seroalbúmina bovina (BSA, New England Biolabs), 2 µl de enzima y 13,8 µl de agua (para un volumen final de 20 µl). Se incubaron las muestras por 1 h a 37 °C y, previa purificación (explicada más adelante), se digirió con *PacI*, agregando 3 µl de buffer NEB 1, 0,3 µl de BSA y 2 µl de enzima, e incubando por 1 h a 37 °C.

- **Purificación del inserto digerido**

La purificación del inserto digerido se realizó empleando el kit comercial *HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction Kit* (BioAmerica). Se agregaron a la muestra de DNA 5 volúmenes de buffer DF y se mezcló con el vortex. Se introdujo una columna DF en un tubo de 2 ml y se transfirió la muestra. A continuación se centrifugó 30 s a 13.000 rpm (en una *centrífuga HERMLE Z 233M*), se descartó el eluato que quedó en el tubo y se volvió a colocar la columna. Se agregaron 600 µl de Wash Buffer (con etanol), se dejó reposar por 1 min, y luego se centrifugó 30 s a 13.000 rpm. Se centrifugó 3 min más para descartar todo el etanol y secar la columna, se pasó la columna a un nuevo tubo de 1,5 ml y se eluyó en 30 µl de Tris-HCl. Se dejó reposar durante 2 min y luego se centrifugó 2 min a 13.000 rpm. Así se obtuvo el inserto digerido y purificado, en un volumen final de 30 µl.

- **Cuantificación del producto digerido**

Los productos digeridos y purificados fueron cuantificados por espectrofotometría en el equipo *SmartSpec™ 3000* (Bio Rad), realizando para la medida una dilución 1/100 de la muestra (1 µl de muestra + 99 µl de H₂O). La densidad óptica se midió a 260 nm (la constante del equipo para el DNA doble cadena a esa longitud de onda es 1 DO = 50 µg/ml).

2. Generación del vector

- **Vector utilizado para el clonado**

El vector lentiviral utilizado en este trabajo se denomina pPPT, tiene un tamaño aproximado de 7.500 pb, y fue donado por el doctor Eduardo Marban, quien lo modificó en su laboratorio a partir del plásmido original creado por el laboratorio del doctor Inder Verma. Este plásmido contiene un cassette con una secuencia shRNA inhibitoria flanqueada por los sitios de corte para las enzimas *BamHI* y *PacI* y precedida por el promotor H1 de la RNA polimerasa III. Además, tiene un gen reportero que codifica para la proteína fluorescente roja dsRed, que se expresa bajo el promotor de citomegalovirus CMV. Por último y a fin de facilitar el proceso de selección, posee un gen que codifica para una proteína que confiere resistencia al antibiótico ampicilina.

- **Digestión enzimática del vector**

Para poder clonar el inserto dentro del vector de clonado pPPT es necesario digerir este último previamente. Las enzimas de restricción utilizadas para cortar el vector son las mismas que se utilizan para cortar el inserto, *BamHI* y *PacI*. Las reacciones de digestión se llevaron a cabo en volúmenes variables de entre 20 a 50 µl dependiendo de la concentración del DNA a digerir. Se emplearon en general entre 2 - 4 µg de DNA por tubo, y los cortes fueron secuenciales y no dobles, es decir que no se cortó el vector con las 2 enzimas en la misma mezcla, sino que primero se cortó con una, se purificó y se cortó con la otra. El orden empleado fue variando a lo largo de las distintas estrategias de clonado, y en función de la actividad que mostraba cada enzima.

Las digestiones fueron corroboradas en geles de agarosa de 0,5-0,8%, con el marcador de peso molecular *1Kb DNA Ladder* (Fermentas). La primera digestión genera una banda por encima de 7,5 kb, dado que corresponde al vector completo pero linealizado. Si la enzima no corta todo el molde, se observa una banda por debajo que corresponde al DNA superenrollado, que corre a la misma altura que el vector sin cortar (control).

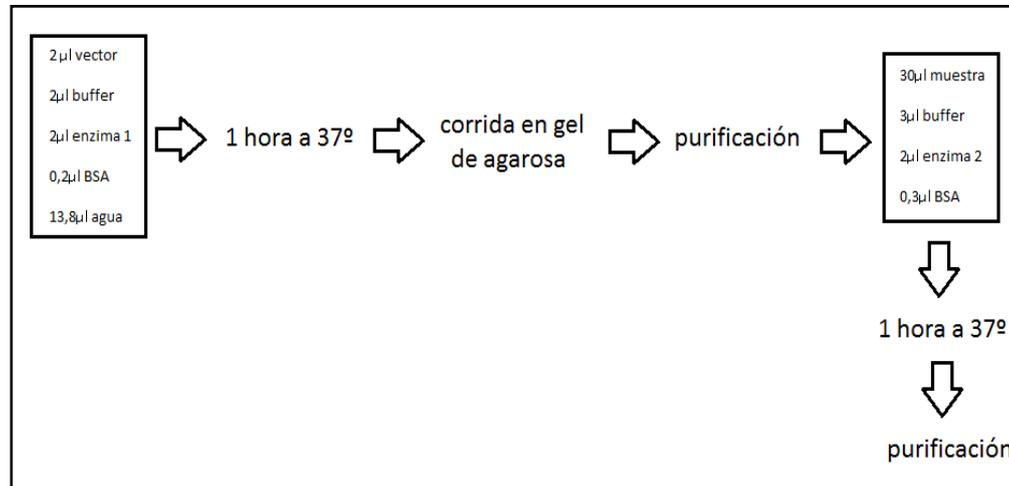


Figura 10: Esquema de la digestión secuencial del vector

- **Purificación del vector digerido**

La purificación de los productos digeridos se realizó con el kit comercial *HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction Kit* (BioAmerica). Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa (0,6%) de la mezcla de digestión, y luego por medio de transiluminación con UV se identificó la banda en el gel y se cortó el fragmento correspondiente. Se transfirió la banda a un tubo de 1,5 ml, se agregaron 500 µl de buffer de disolución y se incubó a 55-60 °C por 15 min (hasta disolución total de la agarosa). Posteriormente se transfirieron 800 µl de la muestra disuelta a una columna de purificación. Se centrifugó 30 s a 13.000 rpm, se descartó el eluato y se volvió a poner la columna en el tubo. Se lavó la muestra en la columna con 400 µl de Buffer W1, se centrifugó por 30 s a 13.000 rpm y se descartó el eluato. Se lavó por segunda vez con 600 µl de Wash Buffer (con etanol), se dejó reposar 1 min y se centrifugó por 30 s a 13.000 rpm. Luego se centrifugó otros 3 min a 13.000 rpm para eliminar todo el etanol y secar la columna. Se transfirió la columna a un tubo nuevo de 1,5 ml, y se agregaron 30 µl de buffer Tris-HCl para recuperar el DNA. Finalmente, se centrifugó por 2 min a 13.000 rpm, obteniéndose el vector purificado en un volumen final de 30 µl.

- **Desfosforilación del vector**

En el protocolo de clonado que comprende la digestión del inserto, es posible eliminar los fosfatos del vector para reducir su auto-ligación (no ocurre lo mismo cuando se utiliza el inserto ya cortado, dado que este no tiene los fosfatos 5´ terminales). Para desfosforilar el vector se utilizó la enzima fosfatasa alcalina CIP (calf intestinal alkaline phosphatase, New England Biolabs). Esta enzima remueve los fosfatos 5´ de fragmentos de DNA o RNA, para marcación con ³²P o para permitir las ligaciones en clonado molecular.

La mezcla para la desfosforilación se realizó agregando a los 30 μl de vector pPPT digerido y purificado, 3 μl de Buffer 10X y 0,4 μl de CIP (4 Unidades). Se incubó a 37 °C por 1 h, y luego se purificó el DNA con el kit comercial *HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction Kit* (BioAmerica).

- **Cuantificación del producto digerido**

De la misma manera que para el inserto, el vector se cuantificó por medición de la densidad óptica a 260 nm en el equipo *SmartSpec™ 3000* (Bio Rad). Las muestras se diluyeron 1/100 para efectuar la medida.

3. Ligación del inserto al vector

El vector pPPT digerido con las enzimas apropiadas y purificado por medio del kit previamente citado, se ligó con el inserto diseñado con los extremos cohesivos complementarios, o digerido con las mismas enzimas (según la estrategia). La enzima utilizada para la ligación fue la T4 DNA ligasa (Invitrogen).

Las relaciones molares vector : inserto ensayadas fueron 1:600, 1:400, 1:100, 1:50, 1:10, 1:3 y 1:0. Los volúmenes de reacción fueron de 10-20 μl , utilizando entre 2-4 μl de Buffer de ligación 5X y entre 0,1-2 μl de T4 DNA ligasa (1U/ μl). Se ensayó la ligación con y sin el agregado de ATP extra (el buffer de ligación tiene ATP). De acuerdo a la estrategia utilizada se ligó toda la noche a temperatura ambiente, o 1 h a temperatura ambiente.

En todas las reacciones se incluyó un control positivo de ligación, que consistió en el vector pPPT cortado con una sola enzima de restricción (y por lo tanto con los extremos cohesivos complementarios) y re-ligado, sin el inserto y con la T4 DNA ligasa. Por otro lado, se incluyó un control negativo, que consistió en el vector pPPT cortado con las 2 enzimas de restricción (y por lo tanto con extremos cohesivos no compatibles), sin el agregado de inserto, y con el agregado de T4 DNA ligasa.

Las ligaciones se usaron directamente para transformar las bacterias, o se purificaron previamente, mediante el kit comercial *DNA Clean and Concentrator* (Zymo Research).

II.C. Producción y obtención del plásmido vector

- **Bacterias *E. coli* DH5- α**

E. coli DH5- α es la cepa de *E. coli* más usada para aplicaciones de clonado. Son bacterias de crecimiento lento pero que se transforman con elevada eficiencia. Al igual que otras cepas comúnmente utilizadas para clonado molecular, *E. coli* DH5- α tiene muchas características que la hacen útil para los métodos que implican la presencia de DNA recombinante: la mutación endA1 inactiva una endonucleasa intracelular que degrada el DNA plasmídico; la mutación hsdR17 elimina la endonucleasa de restricción del sistema de modificación-restricción EcoKI, y por lo tanto los fragmentos de DNA que poseen metilaciones en los sitios EcoKI no son degradados; y la mutación recA elimina la posibilidad de

recombinación homóloga.

Se guardan a -80°C , y se descongelan en hielo inmediatamente antes de usar.

- **Preparación de bacterias *E. coli* DH5- α electrocompetentes**

Con el objetivo de obtener células permeables al plásmido recombinante creado se procedió a la generación en gran cantidad de las mismas. Para ello se inocularon 50 ml de medio líquido YENB (extracto de levadura 0,75%, bacto triptona 0,8%), con 50-100 μl de bacterias electrocompetentes, y se dejó el cultivo creciendo a 37°C y con agitación (*Shaking Incubator*, LabTech) durante la noche.

Al día siguiente se inoculó 1 litro de medio YENB con 5-10 ml del precultivo y se incubó con agitación a 37°C , hasta alcanzar una densidad óptica entre 0,5-0,9. Luego, en tubos estériles, se centrifugó el cultivo en una centrífuga refrigerada (*Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge*, Du Pont Instruments), por 10 minutos a 5.000 rpm y a 4°C . Se descartó el medio y se invirtieron los tubos sobre papel para eliminar la mayor cantidad de medio posible. Con el objeto de obtener bacterias en un medio libre de sales que puedan interferir con el proceso de electroporación se lavaron las células varias veces. Se lavó 2 veces el precipitado, resuspendiéndolo en 10 ml de agua estéril fría, centrifugando por 10 min a 5.000 rpm, y descartando el sobrenadante. Luego se resuspendió el precipitado en 20 ml de glicerol 10% frío, se centrifugó por 10 min a 5.000 rpm y se descartó el sobrenadante. Finalmente se resuspendieron las bacterias en 2 ml de glicerol 10%.

Se midió la densidad óptica de 1 μl de bacterias en 600 μl de agua. Una unidad de DO a 600 nm es aproximadamente igual a 1×10^8 células/ml y la densidad celular terminado el proceso debe ser de 2×10^{10} células/ml. Para congelar las bacterias electrocompetentes, se las fraccionó en tubos de a 50 μl y se las guardó a -80°C .

Por último se realizó el cálculo de la eficiencia de transformación de las nuevas bacterias electrocompetentes. Para eso se transformaron bacterias con 0 ng, 1 ng y 10 ng de un vector de concentración conocida, se incubaron en 600 μl de LB líquido durante 1 h a 37°C con agitación, de donde se tomaron 100 μl de cada condición para sembrarlos en placas de medio LB agar (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5g/l, agar 15g/l) suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Las placas se dejaron en estufa a 37°C hasta el día siguiente, donde se contó la cantidad de colonias por placa, y se calculó la eficiencia de transformación como n° de colonias/ μg de DNA.

- **Transformación de bacterias electrocompetentes**

El proceso de transformación implica la introducción de DNA exógeno a una célula bacteriana. Para la transformación con la construcción recombinante obtenida se utilizaron las bacterias *E. coli* DH5- α electrocompetentes generadas como se explicó anteriormente.

El equipo utilizado para llevar a cabo la transformación fue un *Electroporador BioRad, modelo MicropulserTM*. Se tomó un volumen entre 2-4 μl de las ligaciones, se adicionó a tubos con 50-100 μl de bacterias, y se colocó la mezcla en cubetas de 0,1 cm de espacio entre electrodos, previamente enfriadas en hielo. Luego se introdujo la cubeta en el equipo y se dio un pulso eléctrico de 1,8 kVatios. Inmediatamente se resuspendieron las bacterias en 600 μl de medio SOC (bacto triptona 20%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl_2 10 mM y glucosa 20 mM) y se transfirieron a un tubo estéril. Se crecieron a 37°C

con agitación por 1 h, y luego se sembraron 100 µl de bacterias transformadas en placas de LB agar suplementadas con ampicilina (100 µg/ml). Se incubaron a 37 °C en estufa durante la noche.

En las ocasiones en las cuales las ligaciones se purificaron antes de la transformación, se utilizaron 5 µl para transformar 50 µl de bacterias electrocompetentes. El resto del protocolo fue igual al ya descrito.

- **Colony-PCR**

La PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) es una técnica de biología molecular, que sirve para amplificar un fragmento de DNA particular. Se fundamenta en la propiedad natural de las DNA polimerasas para replicar hebras de DNA, y emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas. Se preparan 2 oligonucleótidos sintéticos (primers), cada uno complementario de secuencias en las hebras complementarias del DNA molde, situadas justo en los extremos del segmento que se quiere amplificar. El DNA molde se calienta brevemente para desnaturalizarlo, y a continuación se enfría en presencia de un gran exceso de los oligonucleótidos sintéticos que actúan a modo de cebadores de la DNA polimerasa. El ciclo de calentamiento, enfriamiento y polimerización se repite de 30-35 veces. Las temperaturas usadas y el tiempo de duración de cada ciclo dependen de parámetros como la enzima usada para la síntesis de DNA, la concentración de iones divalentes y de dNTP en la reacción, la temperatura de unión de los primers y la longitud del DNA que se desea amplificar [44].

Para confirmar que el plásmido introducido y replicado en las bacterias es el correcto antes de pasar a los métodos de extracción, se realizó una variante de la técnica de PCR, conocida como Colony-PCR. En este ensayo, se toman colonias al azar de la placa, y se realiza una PCR del material genético de las mismas, con primers específicos de la secuencia plasmídica.

Se tomaron varias colonias al azar, y se las colocó en tubos con 25 µl de agua estéril, mezclando por pipeteo hasta disolución. Se tomó 1-2 µl de cada tubo y se los sembró en una placa de LB agar con ampicilina (para recuperar las colonias y tenerlas disponibles para estudios posteriores). Se agregó 3 µl de Buffer de PCR (DS-Bio) a cada tubo, y se los calentó a 96 °C por 5 min (para lisar las bacterias). Luego se centrifugó a 13.000 rpm por 30 s, y se utilizaron 5 µl del sobrenadante como molde para la PCR.

La enzima utilizada para la reacción fue la DNA Taq Polimerasa (DS-Bio), la mezcla se realizó en un volumen final de 25 y 50 µl, y se agregó DMSO al 7% (recomendado para evitar la formación del hairpin durante el proceso). Los primers utilizados fueron el H1F2 (complementario del promotor H1, izquierdo) y el T7 (derecho) (Invitrogen), cuyas secuencias son:

H1F2 5´- TCGCTATGTGTTCTGGGAAA -3´
T7 5´- TAATACGACTCACTATAGGG -3´

Estos primers no son específicos del shRNA-EGFR, sino que amplifican un fragmento de 867 pb dentro del cual está incluido el short hairpin. El programa de PCR utilizado fue el siguiente:

Ciclo	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	2 min
2 al 32	95 °C	30 s
	58,2 °C	30 s

	72 °C	1 min
33	72 °C	5 min

Los productos se corrieron en geles de agarosa 1,5%, con el marcador *1 Kb DNA Ladder* (Fermentas).

- **Aislamiento del vector: Miniprep**

Para extraer el DNA plasmídico de las bacterias en pequeña cantidad se utilizó la técnica de Miniprep. Para llevarla a cabo, una colonia aislada se inoculó en 1 ml de medio líquido LB con 100 µg/ml de ampicilina, y se incubó con agitación durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se centrifugó el cultivo bacteriano a 13.000 rpm por 30 s. Se agregaron 100 µl de solución 1 (buffer GTE: glucosa 50 mM, Tris 25 mM y EDTA 10 mM, pH 8), y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 200 µl de la solución 2 recién preparada, se mezcló por inversión y se dejó 5 min en hielo (lisis de bacterias y liberación del DNA). Se agregaron 150 µl de solución 3 (acetato de potasio 3M, pH 4,8), se mezcló por inversión 5 veces y se dejó en hielo por 5 min. En esta etapa se neutraliza la solución 2, se producen agregados de membranas y proteínas y se separa al DNA genómico, dejando el DNA plasmídico en solución. Se centrifugó a 13.000 rpm por 5 min, y se transfirió el sobrenadante a tubos estériles. Se agregó 1 ml de etanol 95% frío y se invirtió 5 veces para mezclar. Se centrifugó a 13.000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 400 µl de etanol 70% y se invirtió 5 veces para mezclar. Se centrifugó 10 min a 13.000 rpm y se eliminó el sobrenadante, invirtiendo los tubos sobre papel para secar el etanol lo máximo posible. Finalmente se resuspendió el DNA plasmídico en 30 µl de buffer Tris-HCl. Se agregó RNasa (DS-Bio) para una concentración final de 30 µg/ml.

- **Aislamiento del vector: Maxiprep**

Para obtener grandes cantidades del plásmido recombinante se llevó a cabo la técnica de Maxiprep, utilizando el kit *Axyprep™ Plasmid Maxiprep Kit* (Axygen Biosciences). Se inoculó un cultivo de 250 ml de LB-ampicilina con una colonia (o con un pre-cultivo de la colonia en 1 ml de LB-ampicilina, crecido ya 24 hs), y se lo creció toda la noche a 37 °C con agitación. Al día siguiente se centrifugó el cultivo bacteriano a 6.000 rpm por 10 min, en la centrífuga refrigerada (4 °C). Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 10 ml de solución 1 (buffer GTE: glucosa 50 mM, Tris 25 mM y EDTA 10 mM, pH 8). Se agregó 1 ml de lisozima, se mezcló por inversión y se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 min. A continuación se agregaron 10 ml de solución 2 (SDS + NaOH), se mezcló por inversión y se dejó estar a temperatura ambiente por 5 min. Se agregaron 10 ml de solución 3 fría (acetato de potasio 5M + ácido acético glacial, pH 5,5), se mezcló por inversión y se dejó por 20 min en hielo. Se centrifugó por 20 min a 13.000 rpm, transfiriendo luego con cuidado el sobrenadante a otro tubo estéril y descartando el precipitado. Se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol, se mezcló por inversión y se dejó 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó por 30 min a 10.000-11.000 rpm y se descartó con cuidado el sobrenadante. Luego se lavó el pellet con 10 ml de etanol 70% y se centrifugó a 10.000-11.000 rpm por 10 min. Por último, se eliminó el etanol, se dejó secar por completo el precipitado, y se disolvió en 500 µl de buffer Tris-HCl. A fin de eliminar el RNA que pudo haberse aislado en el proceso, se agregaron 2 µl de RNasa (DS-Bio).

- **Precipitación fenol-cloroformo**

Con el objetivo de purificar el DNA plasmídico obtenido tanto por Miniprep como por Maxiprep, se llevó a cabo una precipitación fenol-cloroformo. Esta técnica permite obtener un DNA libre de proteínas y enzimas, y se fundamenta en la formación de 2 fases y una interfase: en la fase acuosa queda disuelto el DNA, en la interfase quedan precipitadas las proteínas, y en la fase orgánica quedan disueltos los demás contaminantes.

Partiendo de X μ l de muestra a purificar, se agregaron X μ l de solución fenol-cloroformo y se mezcló hasta emulsión fina. Se centrifugó 1 min a 13.000 rpm y se transfirió la fase acuosa (donde está contenido el DNA) a un nuevo tubo. Luego se agregaron X μ l de cloroformo (para extraer el fenol que haya quedado en la solución), se mezcló y se centrifugó 1 min a 13.000 rpm. Se trasladó la fase acuosa con el DNA ya purificado a un nuevo tubo, y se procedió a precipitarlo. Para ello se agregaron 0,1*X μ l de acetato de sodio 3M, pH 5,2 (1/10 del volumen de la muestra) y 2-2,5*X μ l de etanol 95% (2-2,5 volúmenes de la muestra), y se incubó en hielo por 15 min. A continuación se centrifugó 15 min a 13.000 rpm y 4 °C, y se descartó el sobrenadante. Al pellet se le agregaron 500 μ l de etanol 70% frío, se centrifugó 10 min a 13.000 rpm, se descartó el etanol y se secó por 2-5 min. Finalmente se resuspendió el DNA purificado en 30-500 μ l de buffer Tris-HCl (dependiendo del volumen inicial de la muestra).

II.D. Análisis del plásmido vector generado

- **Digestión enzimática del plásmido recombinante**

Uno de los métodos utilizados para verificar que el plásmido extraído es efectivamente el correcto, consiste en digerir enzimáticamente el plásmido obtenido con las enzimas usadas para el clonado (en este caso *BamHI* y *PacI*). La ligación del inserto al vector pPPT debió haber reconstituido los sitios de restricción para ambas enzimas, y por lo tanto el plásmido vector debería cortarse.

Se realizaron digestiones por separado de 1 μ g de vector pPPT con *BamHI* y *PacI*, en un volumen final de 10-20 μ l y colocando 1-2 μ l de enzima. Como control positivo se utilizó el plásmido pPPT original previo a todo el proceso de clonado, y los productos se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa 0,6-0,8%.

- **Reacción de PCR**

El plásmido obtenido también se analizó mediante la técnica de PCR, y en este caso se usaron varios formatos distintos. Se realizó una PCR inespecífica para el shRNA-EGFR, utilizando los primers H1F2 y T7 (cuyas secuencias se describieron previamente), con los cuales se obtiene un fragmento de 867 pb luego de la amplificación. El volumen de reacción fue de 25 μ l y la enzima usada fue la DNA Taq Polimerasa (DS-Bio). El programa utilizado fue el mismo que se describió para la Colony-PCR. Los productos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 1,5% con el marcador de peso molecular *1 Kb DNA Ladder* (Fermentas).

Además se realizó una PCR específica, utilizando como primers el T7 o el H1F2, y un primer específico de la secuencia del shRNA-EGFR. Este primer, también proporcionado por Invitrogen, tiene la siguiente secuencia:

Primer EGFR: 5'- CGCATAGGCATTGGTGAATT -3'

El volumen de reacción fue de 25 μ l y la enzima usada fue la DNA Taq Polimerasa (DS-Bio). Se trabajó con DMSO 7%, para evitar la formación del hairpin. En este caso el resultado es una mezcla de fragmentos de aproximadamente 47 pb y 137 pb cuando se usa el H1F2, y 47 pb y 777 pb cuando se usa el T7. Los productos se corrieron en un gel de agarosa 1,2% con el marcador de peso molecular *100 bp DNA Ladder* (Fermentas). El programa utilizado fue el siguiente:

Ciclo	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	2 min
2 al 40	94 °C	30 s
	56 °C	30 s
	72 °C	30 s
41	72 °C	5 min

Por último, se realizó una PCR anidada (*nested PCR*). Esta es una variante de la PCR convencional que comprende 2 rondas de amplificación con distintos pares de primers en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad de detección. Primero se realiza una reacción con los primers externos, para amplificar una región de DNA más extensa que contiene el segmento diana. Después, con este producto de amplificación, se realiza una segunda PCR con los primers internos, para amplificar la región específica [45]. Este tipo de PCR tiene la ventaja de brindar alta sensibilidad y especificidad. La especificidad aumenta porque al ser una amplificación sobre el amplicón obtenido previamente, los primers sólo van a hibridar en un sitio dentro de la molécula y el resultado será una única banda (o una combinación de bandas, de acuerdo a cuantas veces se encuentra la región de hibridización del primer en el amplicón). Así, se evitan posibles hibridaciones inespecíficas de los cebadores.

En este trabajo, la PCR anidada se realizó del siguiente modo: una primera reacción de PCR utilizando los primers H1F2 y T7 (Invitrogen) dio un amplicón de 867 pb, que a su vez se utilizó como molde para la segunda reacción de PCR, llevada a cabo con los primers T7 o H1F2 y el específico del EGFR (Invitrogen). El volumen de reacción en ambos casos fue de 25 μ l, la enzima usada fue la DNA Taq Polimerasa (DS-Bio), y se agregó DMSO al 7%. El programa utilizado fue el descrito para la Colony-PCR, y los productos de la reacción se corrieron en un gel de agarosa 1,3%, con el marcador de peso molecular *100 bp DNA Ladder* (Fermentas).

- **Transfección de células HEK 293**

El proceso de transfección implica la introducción de DNA exógeno a una célula eucariota. En este trabajo se utilizaron las células HEK (Human Embryonic Kidney), que son de cultivo fácil, y han sido ampliamente usadas en los últimos años en investigaciones de biología molecular, debido a su alta eficiencia de transfección.

Para llevar a cabo la transfección, se mezclaron en un tubo (tubo 1) 9 μ l de CaCl₂, 62 μ l de H₂O y 1 μ g de DNA. Al mismo tiempo, en otro tubo (tubo 2), se colocaron 72 μ l de buffer HEPES. Una vez preparados los 2 tubos, se tomó con pipeta todo el contenido del tubo 1 y se lo agregó al tubo 2, gota a gota para que las

soluciones se vayan mezclando bien. Se dejó estar la mezcla por 15 min a temperatura ambiente, y luego se la transfirió, también gota a gota, a las placas de cultivo de 60 mm de diámetro con las células (que se encontraban en un 80-90% de confluencia). Se incubaron a 37 °C por 72 hs.

El DNA usado en la transfección es un plásmido que contiene un gen reportero que codifica para la proteína fluorescente roja (dsRed). La integridad del plásmido se evaluó a través de la capacidad de expresar esta proteína fluorescente, y para ello se utilizó un microscopio de fluorescencia.

- **Secuenciación**

Como último paso para analizar el plásmido obtenido luego del proceso de clonado, y verificar que el inserto está correctamente incluido en el vector pPPT, se secuenció las muestras. La secuenciación fue encargada a la empresa MacroGen, que utiliza el método de secuenciación a gran escala desarrollado por *Applied Biosystems*, concretamente el modelo 3730XL. Las muestras se enviaron en una concentración de 100 ng/μl y un volumen mínimo de 20 μl.

Una vez obtenidos los resultados, además de analizarse la secuencia en sí se realizó un alineamiento entre los resultados de la secuenciación y la secuencia esperable por medio de la herramienta *Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW*, de la página www.genome.jp/tools/clustalw.

III. Resultados y Discusión

III.A. Diseño del shRNA-EGFR

- **BLAST de la secuencia específica del EGFR y del SCR**

Al introducir la secuencia utilizada para confeccionar el siRNA específico contra el EGFR en el programa BLAST (NCBI), los resultados fueron los siguientes:

Descriptions [Provide feedback](#)

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 1

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident
<input checked="" type="checkbox"/> Rattus norvegicus epidermal growth factor receptor (Egfr), mRNA	38.2	38.2	100%	0.001	100%
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus myosin IIIA (Myo3a), mRNA	28.2	46.6	89%	1.0	100%
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus myosin IIIA (Myo3a), mRNA	28.2	46.6	89%	1.0	100%
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus sulfatase 1 (Sulf1), mRNA	26.3	26.3	68%	4.0	100%
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus TD and POZ domain-containing protein 3-like (RGD1564313), mRNA	26.3	26.3	68%	4.0	100%
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus cytoskeleton associated protein 5, transcript variant 6 (Ckap5), mRNA	26.3	44.6	89%	4.0	100%
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14 (Tnfsf14), mRNA	26.3	26.3	68%	4.0	100%
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus mitogen-activated protein kinase 1 interacting protein 1 (Mapk1ip1), mRNA	26.3	26.3	68%	4.0	100%

Figura 11: Secuencias que producen un alineamiento específico con la secuencia del shRNA-EGFR.

Alignments

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Rattus norvegicus epidermal growth factor receptor (Egfr), mRNA
Sequence ID: [ref|NM_031507.1](#) Length: 4161 Number of Matches: 1

Range 1: 1169 to 1187 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
38.2 bits(19)	0.001	19/19(100%)	0/19(0%)	Plus/Plus

```

Query 1      GCATAGGCATIGGTC AATT 19
          |||
Sbjct 1169   GCATAGGCATIGGTC AATT 1187
  
```

Figura 12: Alineamiento del mRNA del EGFR de rata con la secuencia utilizada para construir el shRNA-EGFR.

Efectivamente la secuencia introducida en el programa tiene un alineamiento significativo con el EGFR en rata, y presenta un “E-value” de 0,001, que expresa la posibilidad de un alineamiento no específico. Por lo tanto, la secuencia con la que se construyó el shRNA-EGFR es específica para esa proteína en el genoma de la rata. El mismo análisis se realizó para la secuencia scramble (SCR), obteniéndose los siguientes resultados:

Descriptions		Provide feedback				
Sequences producing significant alignments:						
Select: All None Selected:0						
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus seizure threshold 2 homolog (mouse), transcript variant 1 (Szt2)	24.3	24.3	63%	16	100%	
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus seizure threshold 2 homolog (mouse), transcript variant 2 (Szt2)	24.3	24.3	63%	16	100%	
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus seizure threshold 2 homolog (mouse), transcript variant 2 (Szt2)	24.3	24.3	63%	16	100%	
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus EP300 interacting inhibitor of differentiation 2 (Eid2) mRNA >refl	24.3	24.3	63%	16	100%	
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus seizure threshold 2 homolog (mouse), transcript variant 1 (Szt2)	24.3	24.3	63%	16	100%	
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 5 (Slc6a6)	24.3	24.3	63%	16	100%	

Figura 13: Secuencias que producen un alineamiento específico con la secuencia del shRNA-SCR.

Los valores de “E-value” iguales o mayores a 16 obtenidos en este análisis indican que las secuencias de la lista pueden producir alineamientos no específicos con la secuencia SCR, pero esta última no inhibirá, en principio, ningún elemento del genoma de la rata de forma específica.

- **OligoAnalyzer para la cadena sense del shRNA-EGFR**

El hairpin formado por la secuencia sense del shRNA-EGFR, predicho por el programa OligoAnalyzer se muestra en la **Figura 14**.

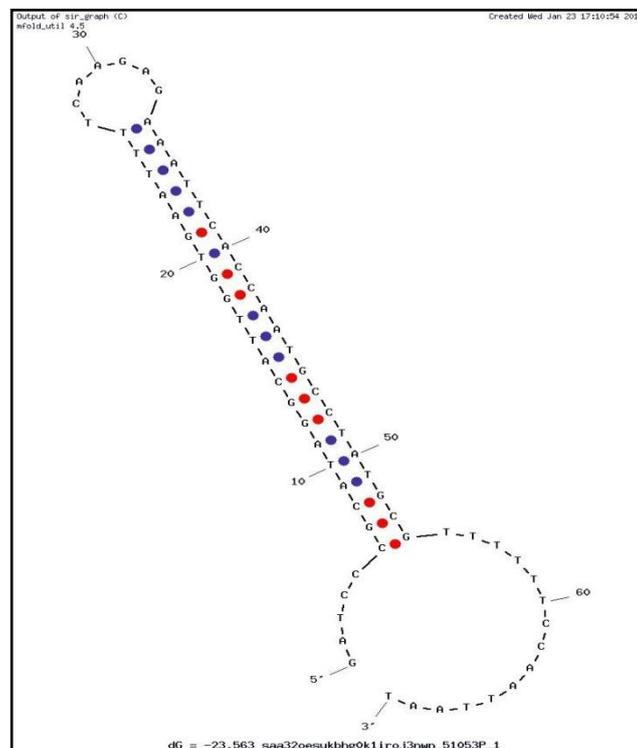


Figura 14: Hairpin formado por la cadena sense del EGFR.

Con el mismo programa se analizaron los valores de energía libre (ΔG) correspondientes a la formación

del hairpin, de los homodímeros (hibridación de 2 cadenas sense o 2 antisense) y de los heterodímeros (hibridación de una cadena sense con una antisense). Los resultados fueron los siguientes:

- ◆ ΔG hairpin = -23,99 kcal/mol
- ◆ ΔG homodímero = - 41,52 kcal/mol
- ◆ ΔG heterodímero = -123,86 kcal/mol

Estos resultados demuestran que la formación del DNA doble cadena es termodinámicamente más favorable que la formación del hairpin, y a su vez que dentro de las moléculas doble cadena, es mucho más favorable la formación del heterodímero que la del homodímero.

III.B. Construcción del vector lentiviral

El primer paso implicado en la construcción del vector fue la formación del inserto doble cadena, por “annealing” o apareamiento entre los primers sense y antisense. El primer protocolo utilizado (ver Materiales y Métodos) no dio los resultados esperados, dado que no aparecía la banda del peso esperado porque obteníamos geles en blanco, o se veían en posiciones correspondientes a pesos moleculares más elevados (150 pb) o no había diferencia entre los primers (ssDNA) y el dsDNA. Con el agregado del DMSO, recomendado para evitar la formación de estructuras secundarias, se logró obtener el inserto de forma correcta, verificándose el peso molecular adecuado en un gel de poliacrilamida 12% (**Figura 15**). La concentración del dsDNA utilizado para sembrar el gel fue 50 μ M. Para estos ensayos se utilizaron los primers que forman el inserto con los sitios de corte completos, lo que da una molécula de 85 pb.

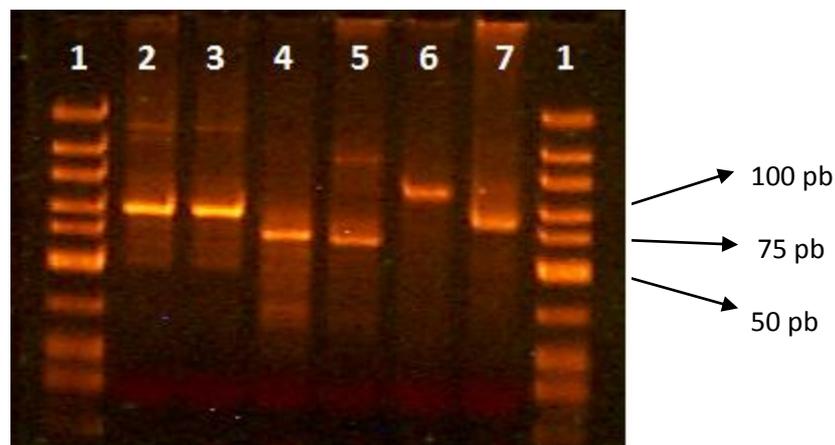


Figura 15: Annealing del inserto con y sin DMSO. Gel de acrilamida 12%. 1: marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder; 2: primer sense sin DMSO; 3: primer sense con DMSO; 4: primer antisense sin DMSO; 5: primer antisense con DMSO; 6: dsDNA sin DMSO; 7: dsDNA con DMSO.

A fin de mejorar la reacción de annealing, se siguió el protocolo recomendado por la compañía Invitrogen, donde no hay utilización de DMSO pero la velocidad de enfriamiento es más rápida. Además el dsDNA se diluye 1/100 antes de sembrarlo en el gel, lo que corresponde a una concentración 500 nM (a diferencia de la 50 μ M sembrada en el primer protocolo). Los productos se corrieron en un gel de agarosa 4%, y los resultados mostraron las bandas correspondientes a los primers y al dsDNA en el peso molecular adecuado (**Figura 16**).

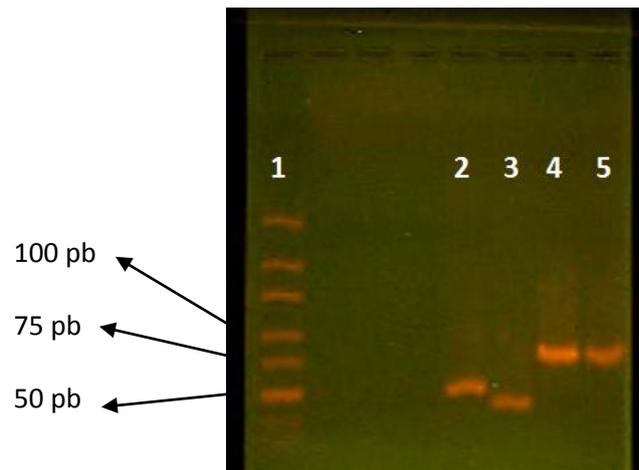


Figura 16: Annealing con el protocolo de Invitrogen. Gel de agarosa 4%.
1: marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder; 2: primer sense;
3: primer antisense; 4-5: dsDNA.

A partir de estos resultados, el protocolo utilizado para el annealing en todos los eventos de clonado posteriores fue el recomendado por Invitrogen.

Una vez generado el inserto, el paso posterior fue la digestión enzimática del vector pPPT. Inicialmente se cortó con *BamHI* dado que en experimentos previos se observó que esta enzima producía un corte incompleto. La electroforesis en gel de agarosa permite separar el vector no cortado de aquel que si lo está (**Figura 17**).

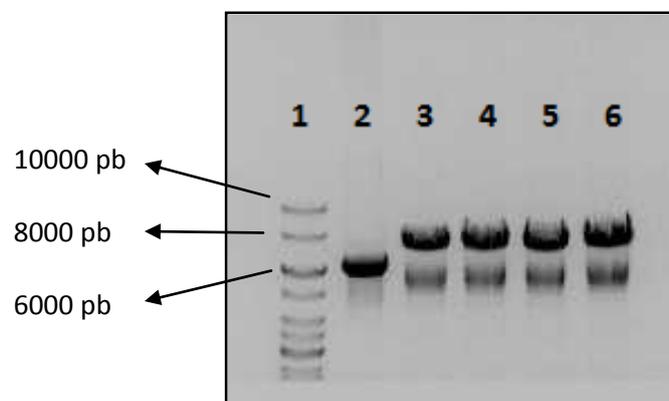


Figura 17: Vector pPPT cortado con BamHI. Gel de agarosa 0,8%.
1: marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder;
2: vector sin cortar; 3-6: vector cortado con BamHI.

Las bandas superiores corresponden al vector cortado, que al haberse linearizado corre menos en los geles de agarosa y aparece a un peso molecular superior. Las bandas inferiores corresponden al vector que quedó sin cortar que, al ser superenrollado y por lo tanto más compacto, tiene una mayor movilidad electroforética. Para continuar con el clonado, se extrajeron y purificaron las bandas superiores.

A continuación se cortó el vector pPPT con *PacI*. Este segundo corte no tiene un resultado visible en geles de agarosa, dado que el fragmento que se elimina al cortar con la segunda enzima es de apenas 68 pb, contra los aprox. 7.500 pb que tiene el vector pPPT lineal. Por lo tanto, el resultado del corte con *PacI* es una única banda (**Figura 18**).

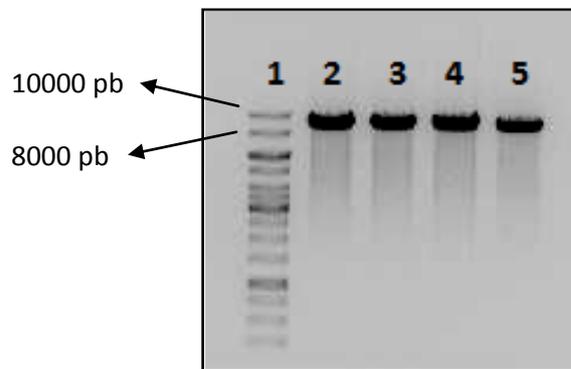


Figura 18: Vector pPPT cortado con *Bam*HI y *Pac*I. Gel de agarosa 0,8%.
 1: marcador de paso molecular *1Kb DNA Ladder*;
 2-5: vector cortado con *Bam*HI y *Pac*I.

Una vez obtenido el vector pPPT cortado con las dos enzimas de restricción, y formado el inserto doble cadena, se procedió a ligarlos. Las relaciones de ligación utilizadas fueron variando en los distintos clonados; en todos se utilizó como control positivo el vector pPPT cortado con una sola enzima, y ligado sin inserto, y como control negativo el vector pPPT cortado con las dos enzimas, y ligado sin inserto.

III.C. Producción y obtención del plásmido vector

Terminada la reacción de ligación, se utilizó el producto para transformar bacterias *E. coli* DH5- α electrocompetentes, y luego de crecerlas 1 h a 37 °C y con agitación, se sembraron 100 μ l en placas de LB con ampicilina. Se incubó las placas en estufa toda la noche. El proceso de transformación trajo grandes complicaciones, dado que en numerosas ocasiones, al mirar las placas 24 hs después, no tenían colonias. Varios son los factores que pueden afectar la eficiencia de la transformación. Dado que las bacterias electrocompetentes ya habían sido utilizadas en otros procesos de transformación, con resultados positivos, se descartó una incorrecta competencia de las células como motivo causal de la falta de obtención de colonias transformadas. La bibliografía reporta que la eficiencia de transformación de bacterias *E. coli* competentes disminuye linealmente con el tamaño del plásmido utilizado, y con la presencia de polietilenglicol (PEG), proveniente de la mezcla de ligación [46, 47].

Purificando las ligaciones para disminuir la concentración de PEG, se obtuvieron los resultados ilustrados en la **Figura 19**. El control negativo no creció, indicando que el plásmido pPPT cortado con ambas enzimas pero en ausencia de inserto no se re-ligó, aún en presencia de la T4 DNA ligasa. Al no circularizarse se degrada al ingresar a la bacteria, y por lo tanto no le confiere resistencia a ampicilina. El control positivo presentó una gran cantidad de colonias, indicando que la ligación fue efectiva, dado que consistía en el vector pPPT cortado una sola vez, y por tanto con extremos cohesivos compatibles. Las 3 relaciones vector : inserto ensayadas fueron 1:50, 1:10 y 1:3, y en los 3 casos crecieron colonias.

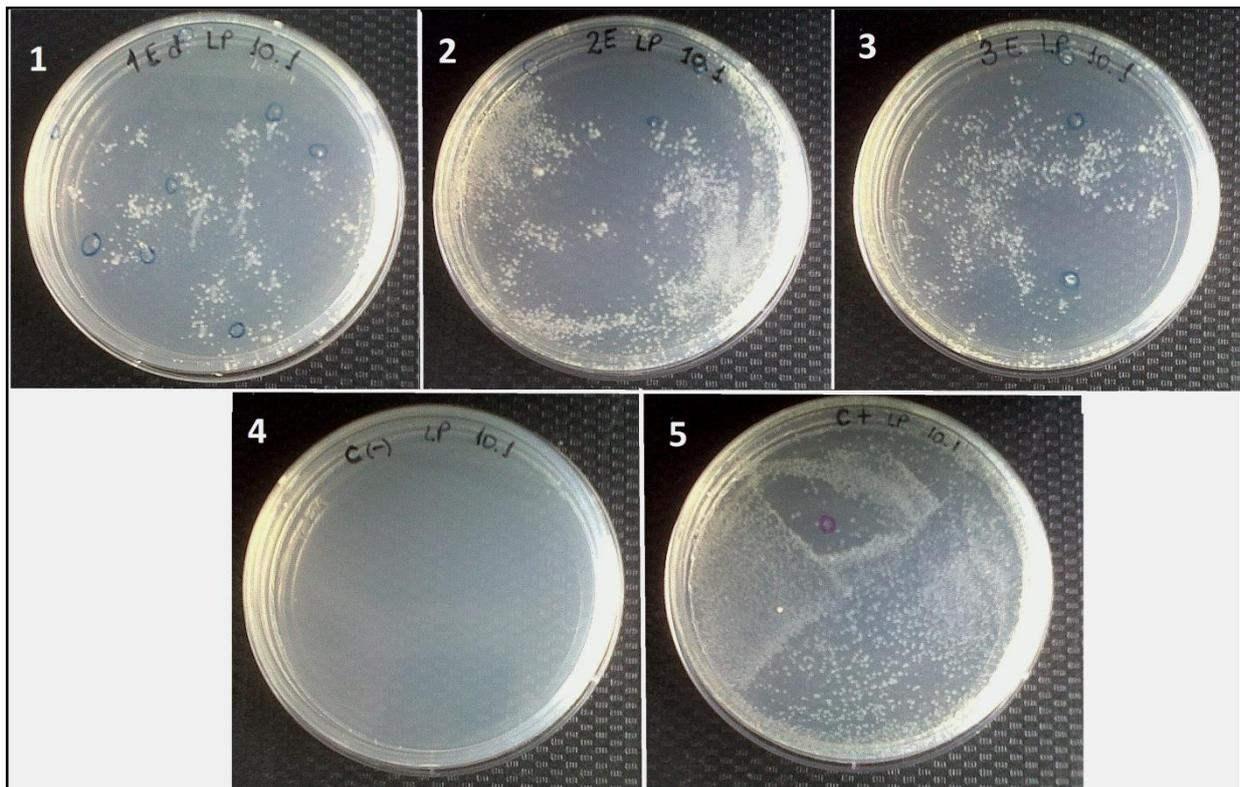


Figura 19: Transformación. Placas de LB agar con ampicilina, sembradas con bacterias que fueron transformadas con el producto de distintas relaciones de ligación. 1: relación de ligación vector : inserto 1:50; 2: relación de ligación 1:10; 3: relación de ligación 1:3; 4: control negativo; 5: control positivo.

El paso siguiente fue elegir colonias al azar de todas las placas, y tomarlas para realizar una colony-PCR, a fin de verificar la naturaleza y la integridad del plásmido presente en las bacterias, que les confiere la resistencia a ampicilina. El producto de la colony-PCR se analizó por electroforesis en un gel de agarosa 1,25%, y los resultados se muestran en la **Figura 20**. Dado que los primers usados para esta PCR fueron el H1F2 y el T7, el resultado debería ser un amplicón de 867 pb. La banda correspondiente al control positivo de la PCR, dado por el vector de clonado original pPPT (indicada con el nº 2 en la **Figura 20**), se encuentra en el peso molecular correcto. Las bandas numeradas del 3 al 20 en la **Figura 20**, correspondientes a las colonias tomadas al azar de las placas, dan un amplicón de aproximadamente el mismo tamaño que el control.

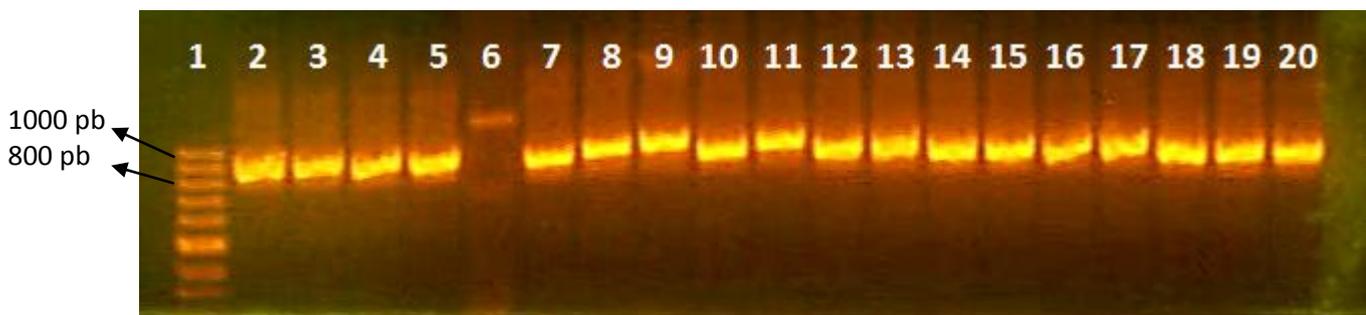


Figura 20: Colony-PCR. Gel de agarosa 1,25%. 1: marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder; 2: control positivo de la PCR, que consiste en el vector de clonado inicial pPPT; 3-20: colonias al azar tomadas de las placas.

Las 2 colonias que generaron las bandas más cercanas a la banda control (indicadas en la figura con los números 3 y 4, y llamadas de aquí en adelante “muestra 1” y “muestra 2”) fueron utilizadas para continuar con el proceso. Se armaron pre-cultivos de 24 hs, y luego con ellos se realizaron maxipreps, a fin de obtener DNA plasmídico. Luego de purificar los productos mediante precipitación fenol-cloroformo, se midió la cantidad de DNA de cada muestra, preparando para ello diluciones 1/100. Las

concentraciones obtenidas fueron:

- muestra 1 = 1,520 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- muestra 2 = 0,385 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

A continuación se procedió a realizar los análisis para verificar si el plásmido aislado contiene efectivamente el inserto clonado.

III.D. Análisis del plásmido vector generado

El primer experimento realizado para corroborar la naturaleza del plásmido aislado fue su digestión con las enzimas de restricción *BamHI* y *PacI*. Se cortó 1 μg de plásmido con cada enzima, y se analizó por electroforesis en un gel de agarosa 0,8%. Como control se digirió el vector pPPT con las mismas enzimas. Los resultados se muestran en la **Figura 21**. El control (indicado con los números 2, 3 y 4 de la **Figura 21**) mostro una banda entre 6000 y 8000 pb cuando se corrió sin cortar, y bandas superiores cuando fue cortado con las enzimas de restricción (debido a que se linearizó). Los dos plásmidos obtenidos por maxipreps analizados por electroforesis en el gel de agarosa dieron un patrón de bandas similar al control positivo sin cortar y cortado con las 2 enzimas de restricción utilizadas en el clonado. La diferencia de intensidad entre las bandas del control y las de las maxipreps puede deberse a algún error en la medida de las concentraciones de las maxipreps, que haya provocado que se corte menos de 1 μg de DNA. El gel de agarosa nos permitió observar que la muestra 2 presenta un mayor background fluorescente, lo cual indica que podría estar contaminada con algún otro tipo de DNA.

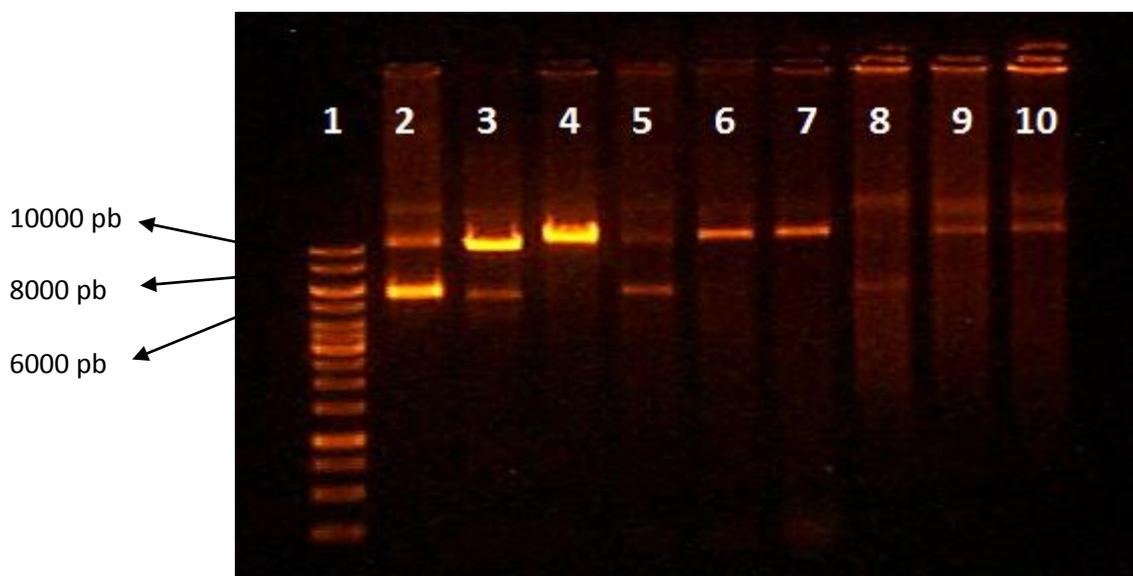


Figura 21: Digestión de las maxipreps. Gel de agarosa 0,8%. 1: marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder; 2: vector pPPT (control positivo) sin cortar; 3: vector pPPT cortado con *BamHI*; 4: vector pPPT cortado con *PacI*; 5: muestra 1 sin cortar; 6: muestra 1 cortada con *BamHI*; 7: muestra 1 cortada con *PacI*; 8: muestra 2 sin cortar; 9: muestra 2 cortada con *BamHI*; 10: muestra 2 cortada con *PacI*.

Otras pruebas que se realizaron con el plásmido vector aislado fueron distintos formatos de PCR. Lo primero que se hizo fue una PCR inespecífica para el shRNA-EGFR pero específica para el plásmido vector pPPT, con los primer H1F2 y T7, equivalente a la colony-PCR pero esta vez con el plásmido purificado como molde (y no directamente a partir de un lisado bacteriano). El resultado, mostrado en la **Figura 22**,

fue para las 2 muestras una banda de aproximadamente 867 pb.

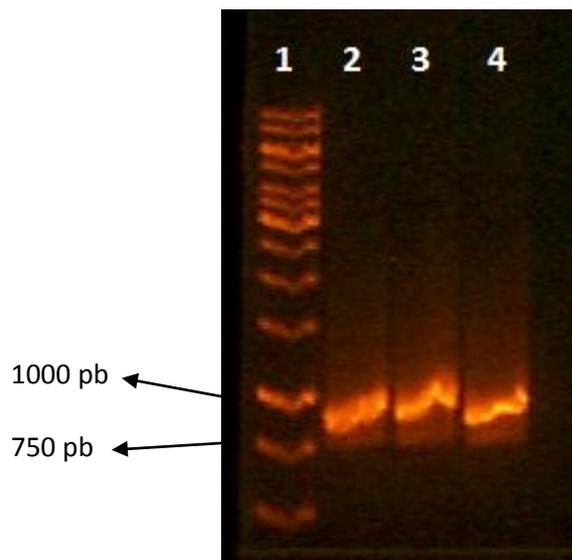


Figura 22: PCR con primers H1F2 y T7. Gel de agarosa 1,3%.

1: marcador de peso molecular *1Kb DNA Ladder*; 2: control positivo de la PCR con el vector de clonado pPPT intacto; 3: muestra 1; 4: muestra 2.

Por otro lado se realizó una PCR específica, con los primers H1F2 o T7, y el primer específico del shRNA-EGFR. Dado que este último primer es específico de la secuencia inhibidora del EGFR, solo debería verse una banda en el gel si el DNA molde (en este caso la muestra 1) tiene el inserto. El producto de esta PCR se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa 2,5% y con el marcador de peso molecular *GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder*. Como control negativo se utilizó el vector de clonado pPPT, que al no tener el inserto no debería dar una banda, dado que no puede hibridarse con el primer específico del EGFR. Los resultados se muestran en la **Figura 23**. Efectivamente el control negativo (indicado con el número 2) no mostró ninguna banda salvo las correspondientes a los primers y a algún producto de amplificación inespecífica. La muestra 1 (indicada con el número 3) presentó una banda cercana a los 200 pb, que corresponde al amplicón formado por hibridación de los primers H1F2 y el específico del EGFR. Dado que el gel no se resolvió bien, no pudimos comprobar la presencia de una banda de alrededor de 47 pb, correspondiente al annealing sobre las 2 cadenas complementarias del primer específico del EGFR.

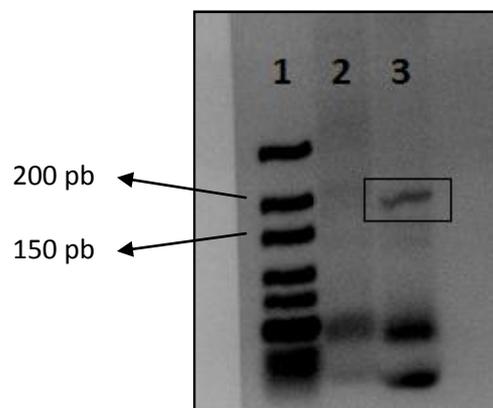


Figura 23: PCR con primer específico del EGFR. Gel de agarosa 2,5%.

1: marcador de peso molecular *GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder*; 2: control negativo de la PCR, vector de clonado pPPT; 3: muestra 1.

El último formato de PCR que se utilizó para analizar si los plásmidos obtenidos mediante el proceso de maxiprep tenían el inserto correctamente clonado fue la PCR anidada. Para eso se realizó una primera ronda de PCR con los primers H1F2 y T7, y luego una segunda ronda, utilizando como molde el producto de la primera, y como primers el H1F2 o el T7, y el específico del EGFR. Los resultados se muestran en la **Figura 24**. Como control negativo se utilizó el vector pPPT, que como no tiene la secuencia del shRNA-EGFR, no debería amplificar con el primer específico del EGFR como cebador. La primera ronda de PCR (calles 2, 5 y 8 en la **Figura 24**) dio un fragmento de peso molecular cercano a 1000 pb, tal como esperábamos.

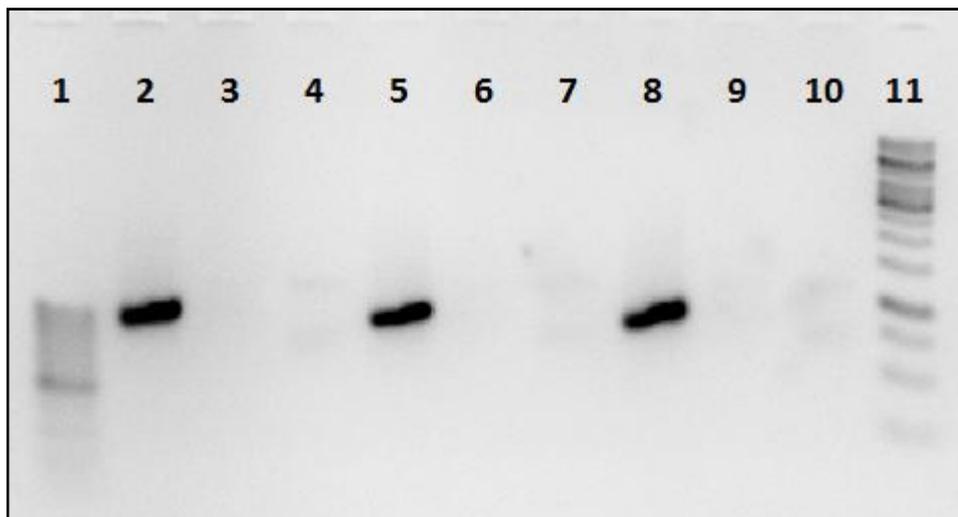


Figura 24: PCR anidada. Gel de agarosa 1,5%. 1: marcador de peso molecular GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder; 2: PCR con los primers H1F2 y T7 de la muestra 1; 3: PCR con los primers EGFR y T7 del amplicón de la muestra 1; 4: PCR con los primers EGFR y H1F2 del amplicón de la muestra 1; 5: PCR con los primers H1F2 y T7 de la muestra 2; 6: PCR con los primers EGFR y T7 del amplicón de la muestra 2; 7: PCR con los primers EGFR y H1F2 del amplicón de la muestra 2; 8: PCR del vector pPPT con los primers H1F2 y T7; 9: PCR con los primers EGFR y T7 del amplicón del vector pPPT; 10: PCR con los primers EGFR y H1F2 del amplicón del pPPT; 11: GeneRulerTM 1Kb DNA Ladder.

La segunda ronda de PCR no dio productos detectables en el gel, tanto cuando se usó con el primer H1F2 como cuando se usó con el T7 (en combinación siempre con el específico del EGFR). Este resultado puede interpretarse como que la secuencia del shRNA-EGFR no se encuentra clonada en las muestras 1 y 2, y por lo tanto el primer específico del EGFR no se hibridiza, y no se produce la reacción de PCR. Quedaría por realizar, como control positivo de la reacción, una PCR anidada con un primer específico de la secuencia que porta inicialmente el pPPT, y donde se deberían obtener las bandas propuestas para el caso del EGFR.

A lo largo del proceso de clonado se han puesto a punto las diversas variantes de los modelos de PCR, dado que se han corrido PCR con resultados nulos, y también se han obtenido varias bandas producto del annealing inespecífico de los primers. Muchas son las variables que afectan la especificidad y eficiencia en una reacción de PCR. La bibliografía reporta que la cantidad de DNA total empleado como molde en la reacción tiene un marcado efecto en el resultado obtenido. El uso de altas concentraciones de DNA molde puede provocar un empaquetamiento del material genético en el pequeño volumen de reacción, lo que genera hibridaciones inespecíficas de los cebadores e incluso bajas concentraciones de DNA sintetizado, debido a un problema de difusión de las moléculas de Taq polimerasa. Asimismo, debe existir un balance entre la concentración inicial de DNA molde y el número de ciclos de amplificación de la reacción. Generalmente se observa una acumulación de productos inespecíficos cuando se utiliza una elevada concentración inicial de DNA molde acompañada de un alto número de ciclos. La reducción del número de ciclos puede evitar dicho problema, pero la bibliografía recomienda disminuir las

concentraciones de cebador, DNA molde, polimerasa y/o nucleótidos ya que habitualmente aseguran la obtención de un producto más puro y un menor fondo [45, 48].

Otro experimento que se realizó para comprobar la naturaleza de los plásmidos aislados fue utilizarlos para transfectar células HEK. Dado que el vector de clonado pPPT codifica para la proteína DsRed, su introducción en células HEK provoca que estas fluorescan. Se transfectó con 1 μg de cada muestra, y los resultados a las 72 hs de la transfección se muestran en la **Figura 25** para la muestra 1 y en la **Figura 26** para la muestra 2. Efectivamente las células presentaron fluorescencia, confirmando que el plásmido aislado estaba íntegro (como para que la proteína fluorescente pueda expresarse).

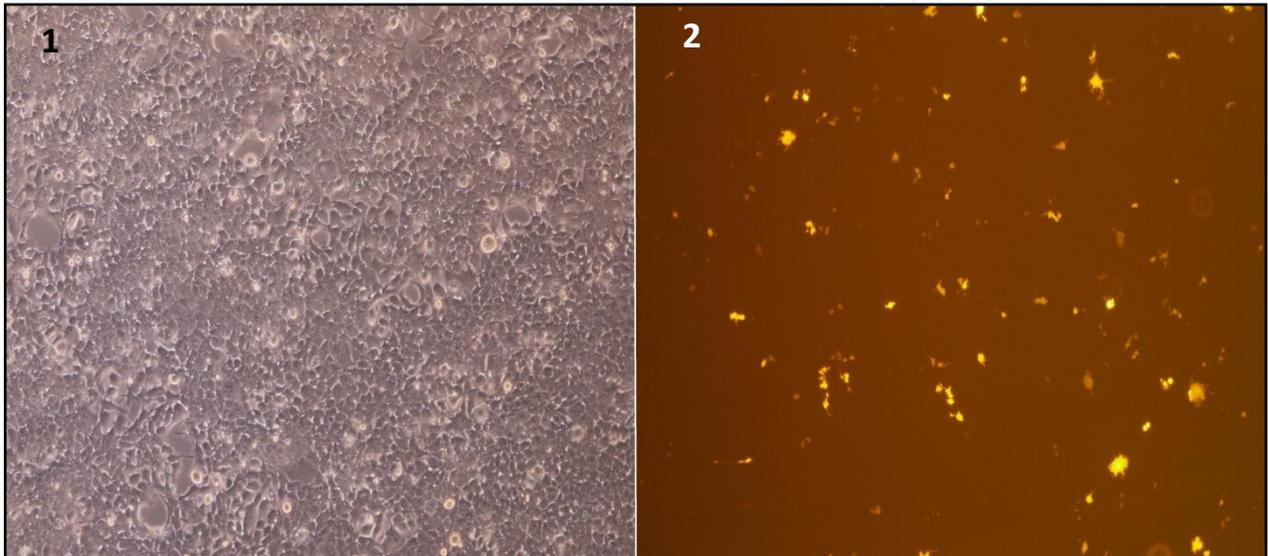


Figura 25: Transfección de células HEK con la muestra 1. 1: Células vistas con un aumento de 40X; 2: células vistas con el filtro fluorescente, con un aumento de 40X.

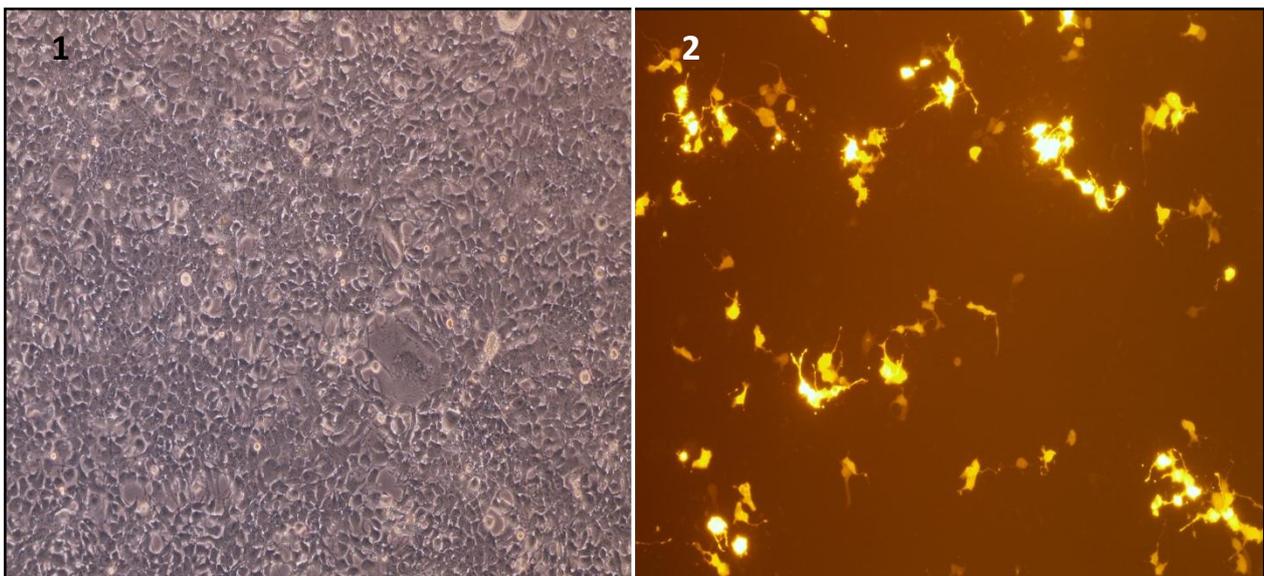


Figura 26: Transfección de células HEK con la muestra 2. 1: Células vistas con un aumento de 40X; 2: células vistas con el filtro fluorescente, con un aumento de 100X.

Finalmente, la última y definitiva prueba para comprobar si el clonado había sido correcto, fue secuenciar las muestras (Macrogen, Korea) utilizando primers que permitieran una lectura del inserto desde el lado 5' o desde el lado 3' del cassette insertado, respectivamente H1F2 y T7. Los resultados mostraron una secuenciación incompleta o indeterminada. Aquellas regiones de la secuencia analizada limpias o coherentes fueron alineadas (CLUSTALW) con las secuencias cassette para el shRNA-EGFR

(Figura 27) o la secuencia del pPPT original. En ninguna de las dos muestras enviadas a analizar se encontró la secuencia del shRNA-EGFR. Según informó la empresa MacroGen, esto en parte fue debido a que las muestras estaban demasiado diluidas, lo que pudo haber impedido la correcta secuenciación de las mismas.

Secuencial	AAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATCAAGATACCAGGCGTT
SecuenciaEGFR	-----
Secuencial	TCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCT
SecuenciaEGFR	-----GGATCCCGCATAGGCATTGGTGAATTTTCAAGAGAAATTCACCAATGCCT * **** * * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
Secuencial	GTCCGCCTTTGCCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATACTCACGCTGTACGTATCT
SecuenciaEGFR	ATGCGTTTTTTCCAATTAATTAA----- * ** *** * ** **
Secuencial	CAGTTCGGAGGAGGTCGTTTCGCTCCTACCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAGCC
SecuenciaEGFR	-----

Figura 27: Ejemplo de alineamiento de la secuencia de la muestra 1 con el shRNA-EGFR.

IV. Conclusiones

IV. Conclusiones

El objetivo principal del presente trabajo fue desarrollar un lentivirus que pudiera expresar un shRNA capaz de silenciar el EGFR en el miocardio de rata. Para ello se procedió a clonar en un vector plasmídico la secuencia codificante del shRNA-EGFR. Al momento de esta presentación no se ha logrado cumplir con ese objetivo final, a pesar de que los pasos previos para el desarrollo del clon que se enumeran a continuación, fueron cumplidos satisfactoriamente:

1. Síntesis del inserto
2. Digestión del vector pPPT
3. Purificación del vector pPPT
4. Ligación de inserto en el vector
5. Transformación de bacterias electrocompetentes
6. Producción de plásmidos
7. Análisis de la integridad del plásmido producido
8. Transfección con el plásmido de células de mamífero HEK 293

Desafortunadamente, el último paso del proceso de clonación consistente en el análisis de la secuencia del plásmido, arrojó un resultado ambiguo. Por un lado, no permitió confirmar el clonado del shRNA-EGFR en el vector pPPT, pero por el otro, no fue lo suficientemente concluyente como para afirmar que la secuencia era incorrecta. Dicho de otro modo, existe la posibilidad de que la secuencia clonada haya sido efectivamente la correcta, pero inconvenientes de índole técnica tales como concentración inadecuada de las muestras y/o formación de estructuras secundarias hayan impedido su detección.

En este escenario, la tarea siguiente será ajustar determinados aspectos de la estrategia experimental para tratar de alcanzar el objetivo oportunamente planteado y poder pasar a la etapa de pruebas funcionales. En la siguiente sección del presente trabajo de investigación se resumen bajo el título “*Direcciones futuras*” algunas de las actividades programadas para tal fin.

V. Direcciones futuras

V. Direcciones futuras

En una primera etapa se tomarán medidas tendientes a evitar los inconvenientes técnicos que se plantearon durante la etapa de la secuenciación como aumentar la concentración de las muestras y repetir los pasos de purificación, para trabajar con un material no contaminado.

Si aún luego de mejorar estos aspectos el análisis de la secuenciación determinara la ausencia de la secuencia del shRNA-EGFR en el plásmido pPPT, se podría intentar la obtención de nuevos clones del mismo ensayo y la realización de todos los pasos posteriores ya descritos hasta llegar a una nueva secuenciación.

Por último, si fuera necesario descartar el proceso de clonado completo, se impondría inicialmente un cambio de estrategia menor como por ejemplo preservar los fosfatos del vector pPPT para favorecer la ligación con el inserto digerido con las enzimas de restricción. En segundo término utilizar un vector intermedio como el pGEM-T-Easy que nos permita trabajar con una sola enzima de restricción y agregue etapas de "screening".

VI. Bibliografía

VI. Bibliografía

1. Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A., and Hynes, N.E., *The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer*. EMBO J, 2000. **19**(13): p. 3159-67.
2. Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J.H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., and Yokoyama, S., *Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains*. Cell, 2002. **110**(6): p. 775-87.
3. Burgess, A.W., Cho, H.S., Eigenbrot, C., Ferguson, K.M., Garrett, T.P., Leahy, D.J., Lemmon, M.A., Sliwkowski, M.X., Ward, C.W., and Yokoyama, S., *An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors*. Mol Cell, 2003. **12**(3): p. 541-52.
4. Jorissen, R.N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T.P., Ward, C.W., and Burgess, A.W., *Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling*. Exp Cell Res, 2003. **284**(1): p. 31-53.
5. Fuller, S.J., Sivarajah, K., and Sugden, P.H., *ErbB receptors, their ligands, and the consequences of their activation and inhibition in the myocardium*. J Mol Cell Cardiol, 2008. **44**(5): p. 831-54.
6. Stamos, J., Sliwkowski, M.X., and Eigenbrot, C., *Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 46265-72.
7. Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P.A., and Kuriyan, J., *An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor*. Cell, 2006. **125**(6): p. 1137-49.
8. Niculescu-Duvaz, D., Whittaker, S., Springer, C., and Marais, R., *The EGF receptor Hokey-Cokey*. Cancer Cell, 2007. **11**(3): p. 209-11.
9. Jones, R.B., Gordus, A., Krall, J.A., and MacBeath, G., *A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays*. Nature, 2006. **439**(7073): p. 168-74.
10. Massague, J. and Pandiella, A., *Membrane-anchored growth factors*. Annu Rev Biochem, 1993. **62**: p. 515-41.
11. Singh, A.B. and Harris, R.C., *Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands*. Cell Signal, 2005. **17**(10): p. 1183-93.
12. Sundaresan, S., Roberts, P.E., King, K.L., Sliwkowski, M.X., and Mather, J.P., *Biological response to ErbB ligands in nontransformed cell lines correlates with a specific pattern of receptor expression*. Endocrinology, 1998. **139**(12): p. 4756-64.
13. Perrella, M.A., Maki, T., Prasad, S., Pimental, D., Singh, K., Takahashi, N., Yoshizumi, M., Alali, A., Higashiyama, S., Kelly, R.A., and et al., *Regulation of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor mRNA levels by hypertrophic stimuli in neonatal and adult rat cardiac myocytes*. J Biol Chem, 1994. **269**(43): p. 27045-50.
14. Perez, N.G., Alvarez, B.V., Camilion de Hurtado, M.C., and Cingolani, H.E., *pHi regulation in myocardium of the spontaneously hypertensive rat. Compensated enhanced activity of the Na(+)-H+ exchanger*. Circ Res, 1995. **77**(6): p. 1192-200.
15. Karmazyn, M., Gan, X.T., Humphreys, R.A., Yoshida, H., and Kusumoto, K., *The myocardial Na(+)-H(+) exchange: structure, regulation, and its role in heart disease*. Circ Res, 1999. **85**(9): p. 777-86.
16. Ennis, I.L., Cingolani, H.E., Garcarena, C.D., Camili6n de Hurtado, M.C., Villa-Abrille, M.C., Aiello, E.A., and P6rez, N.G., *From Anrep's Phenomenon to myocardial hypertrophy: Role of the Na+/H+ exchanger*. Current Cardiology Reviews, 2007. **3**(1): p. 149-164.
17. Cingolani, H.E. and Ennis, I.L., *Sodium-hydrogen exchanger, cardiac overload, and myocardial hypertrophy*. Circulation, 2007. **115**(9): p. 1090-100.
18. Cingolani, H.E., Ennis, I.L., Aiello, E.A., and Perez, N.G., *Role of autocrine/paracrine mechanisms*

- in response to myocardial strain*. Pflugers Arch, 2011. **462**(1): p. 29-38.
19. Camilion de Hurtado, M.C., Portiansky, E.L., Perez, N.G., Rebolledo, O.R., and Cingolani, H.E., *Regression of cardiomyocyte hypertrophy in SHR following chronic inhibition of the Na(+)/H(+) exchanger*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(4): p. 862-8.
 20. Cingolani, H.E., Rebolledo, O.R., Portiansky, E.L., Perez, N.G., and Camilion de Hurtado, M.C., *Regression of hypertensive myocardial fibrosis by Na(+)/H(+) exchange inhibition*. Hypertension, 2003. **41**(2): p. 373-7.
 21. Ennis, I.L., Escudero, E.M., Console, G.M., Camihort, G., Dumm, C.G., Seidler, R.W., Camilion de Hurtado, M.C., and Cingolani, H.E., *Regression of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy by Na+/H+ exchanger inhibition*. Hypertension, 2003. **41**(6): p. 1324-9.
 22. Ennis, I.L., Garcarena, C.D., Escudero, E.M., Perez, N.G., Dulce, R.A., Camilion de Hurtado, M.C., and Cingolani, H.E., *Normalization of the calcineurin pathway underlies the regression of hypertensive hypertrophy induced by Na+/H+ exchanger-1 (NHE-1) inhibition*. Can J Physiol Pharmacol, 2007. **85**(3-4): p. 301-10.
 23. Cingolani, O.H., Perez, N.G., Ennis, I.L., Alvarez, M.C., Mosca, S.M., Schinella, G.R., Escudero, E.M., Console, G., and Cingolani, H.E., *In vivo key role of reactive oxygen species and NHE-1 activation in determining excessive cardiac hypertrophy*. Pflugers Arch, 2011. **462**(5): p. 733-43.
 24. Sabri, A., Hughie, H.H., and Lucchesi, P.A., *Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes*. Antioxid Redox Signal, 2003. **5**(6): p. 731-40.
 25. Ito, H., Hiroe, M., Hirata, Y., Fujisaki, H., Adachi, S., Akimoto, H., Ohta, Y., and Marumo, F., *Endothelin ETA receptor antagonist blocks cardiac hypertrophy provoked by hemodynamic overload*. Circulation, 1994. **89**(5): p. 2198-203.
 26. Martin-Fernandez, B., de las Heras, N., Miana, M., Ballesteros, S., Valero-Munoz, M., Vassallo, D., Davel, A.P., Rossoni, L.V., Cachofeiro, V., and Lahera, V., *Spiroinolactone prevents alterations associated with cardiac hypertrophy produced by isoproterenol in rats: involvement of serum- and glucocorticoid-regulated kinase type 1*. Exp Physiol, 2012. **97**(6): p. 710-8.
 27. Kagiya, S., Eguchi, S., Frank, G.D., Inagami, T., Zhang, Y.C., and Phillips, M.I., *Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and hypertension are attenuated by epidermal growth factor receptor antisense*. Circulation, 2002. **106**(8): p. 909-12.
 28. Nagata, K., Obata, K., Xu, J., Ichihara, S., Noda, A., Kimata, H., Kato, T., Izawa, H., Murohara, T., and Yokota, M., *Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and failure in low-aldosterone hypertensive rats*. Hypertension, 2006. **47**(4): p. 656-64.
 29. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
 30. Aigner, A., *Delivery systems for the direct application of siRNAs to induce RNA interference (RNAi) in vivo*. J Biomed Biotechnol, 2006. **2006**(4): p. 71659.
 31. Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G.J., *An RNAdirected nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells*. Nature, 2000. **404**(6775): p. 293-296.
 32. Nyk"anen, A., Haley, B., and Zamore, P.D., *ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway*. Cell 2001. **107**(3): p. 309-321.
 33. Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 494-498.
 34. Oliveira, D.M. and Goodell, M.A., *Transient RNA interference in hematopoietic progenitors with functional consequences*. Genesis, 2003. **36**(4): p. 203-208.

35. Brummelkamp, T.R., Bernards, R., and Agami, R., *A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells*. *Science*, 2002. **296**(5567): p. 550-553.
36. Miyagishi, M. and Taira, K., *U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells*. *Nat Biotechnol*, 2002. **20**(5): p. 497-500.
37. Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstei, E., Hannon, G.J., and Conklin, D.S., *Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells*. *Genes & Development*, 2002. **16**: p. 948-958.
38. Tiscornia, G., Singer, O., and Verma, I.M., *Design and cloning of lentiviral vectors expressing small interfering RNAs*. *Nat Protoc*, 2006. **1**(1): p. 234-40.
39. Trono, D., *Lentiviral Vectors*. 2002.
40. Tiscornia, G., Singer, O., and Verma, I.M., *Development of lentiviral vectors expressing siRNA in Gene Transfer - Delivery and expression of DNA and RNA*. 2007, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Estados Unidos. p. 23-34.
41. Feng, M., Xiang, J.Z., Ming, Z.Y., Fu, Q., Ma, R., Zhang, Q.F., Dun, Y.Y., Yang, L., and Liu, H., *Activation of epidermal growth factor receptor mediates reperfusion arrhythmias in anaesthetized rats*. *Cardiovasc Res*, 2012. **93**(1): p. 60-68.
42. <http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer>.
43. *BLOCK-iT™ Inducible H1 RNAi Entry Vector Kit*, I. Corporation, Editor. 2010.
44. Sambrook, J. and Russel, D.W., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd ed. 2001: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
45. Roux, K.H., *Optimization and troubleshooting in PCR*. *PCR Methods Appl*, 1995. **4**(5): p. 185-194.
46. Chan, V., Dreolini, L., Flintoff, K., Ltoys, S., and Mattenley, A., *The effect of increasing plasmid size on transformation efficiency in Escherichia coli*. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology* 2002. **2**(1): p. 207-223.
47. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. *J Mol Biol*, 1983. **166**(4): p. 557-580.
48. Altshuler, M., *PCR troubleshooting, the essential guide*. 2006: Caister Academic Press.