



UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO

Facultad de Medicina

Escuela de Tecnología Médica

**"ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LAS
CITOQUINAS IL-1 β E IL-18 EN CULTIVO PRIMARIO DE
CÉLULAS EPITELIALES DE TROMPA DE FALOPIO HUMANA
INFECTADAS CON *NEISSERIA GONORRHOEAE*".**

Tesis de pregrado para optar al título de Tecnólogo Médico.

Autores:

Aracely Odalis Abarca Inostroza y Ruth Carolina Espinoza Martinez.

Profesor tutor: Paula Ivonne Rodas Garrido.

Santiago de Chile, República. Marzo 2018.

Dedicatorias:

Este trabajo va dedicado a nuestras familias por su fundamental apoyo económico y emocional en este periodo tan crítico e importante; con especial mención a nuestras madres, quienes continuaron inspirándonos para finalizar esta etapa.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDO	PÁGINA
1. Resumen	5
2. Introducción	6
3. Marco Teórico	7
3.1. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	7
3.2. Citoquinas	9
4. Hipótesis	12
5. Objetivo general	12
6. Objetivos específicos	12
7. Metodología	13
8. Resultados	15
9. Discusión	18
10. Conclusiones	24
11. Referencias Bibliográficas	25
12. Anexos	32
12.1. Protocolo SuperScript IV Reverse Transcriptase	32
12.2. Protocolo M-MLV Reverse Transcriptase	33

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
Tabla 1: Valor Ct	15

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Figura 1: Gráficos de expresión	16

1. RESUMEN

Neisseria gonorrhoeae es el agente causal de la gonorrea, una infección de transmisión sexual (ITS) que en mujeres generalmente es asintomática, por lo que puede derivar en diversas complicaciones e incluso infertilidad cuando la bacteria coloniza el epitelio de las trompas de Falopio. Esto se debería a la secreción de mediadores inflamatorios como las citoquinas IL-1 β e IL-18, que en conjunto: estimulan la secreción de otras citoquinas proinflamatorias, reclutan linfocitos T citotóxicos, neutrófilos y células natural killer (NK) al sitio de infección, activan moléculas de adhesión endotelial, entre otras actividades microbicidas protectoras contra agentes infecciosos. Esta amplia respuesta debe estar en equilibrio para efectuar la máxima capacidad microbicida con el menor daño posible hacia el tejido, sin embargo, la presencia de gonococo en la mucosa tubaria, estimula un reclutamiento masivo de componentes inflamatorios, agravando el daño con una excesiva inflamación no controlada que conlleva a infertilidad debido a los mecanismos de reparación del tejido afectado.

A diferencia de la vía del TNF-alfa, aquellas vías relacionadas a IL-1 β e IL-18 en la respuesta inflamatoria gatillada por gonococo no han sido estudiadas en profundidad, por lo cual en este trabajo se realizó un análisis de expresión génica para estas citoquinas a través de transcripción reversa y PCR en tiempo real (RT-qPCR) con muestras de RNA mensajero extraído de células epiteliales de trompa de Falopio humana infectadas con *N. gonorrhoeae* a distintos tiempos de infección.

Mediante la normalización de los resultados de cada gen de interés con el gen control de expresión ribosomal 18S se esperaba presenciar un aumento significativo de estas citoquinas en infección por gonococo, sin embargo, los niveles de expresión hallados en IL-18 refutan el motivo de la investigación al disminuir en función del tiempo transcurrido; esto aportaría información relevante para su posible proyección hacia tratamientos médicos alternativos a antibióticos.

Palabras Clave: *Neisseria gonorrhoeae*, RT-qPCR, Citoquinas pro-inflamatorias.

2. INTRODUCCIÓN

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) involucran un amplio grupo de patologías transmisibles y generan un problema de salud pública importante en Chile y el mundo. La Organización Mundial de la Salud estima que cada año unas 500 millones de personas contraen alguna de las cuatro ITS más prevalentes en el mundo: clamidia, gonorrea, sífilis o tricomoniasis ¹; con un número mayoritario de infecciones en los individuos activos sexualmente, considerando el grupo en situación de riesgo aquellos entre 15 y 39 años de edad ¹, sobre todo quienes mantengan relaciones sexuales con un individuo afectado y/o con muchas parejas sexuales, ya que su principal mecanismo de transmisión es por vía sexual, y sin embargo, también pueden transmitirse a través de agujas hipodérmicas y jeringas contaminadas que comparten los adictos a las drogas intravenosas ². Además, algunas ITS pueden dejar como secuela la infertilidad ² e incluso enfermedades que se transmiten de madre a hijo en caso de un diagnóstico tardío. Esto se debe a que presentan síntomas leves o incluso suelen ser asintomáticas.

Estas infecciones, como tales, son capaces de desencadenar diversos mecanismos, células y moléculas del sistema inmune. En el caso de la *Neisseria gonorrhoeae*, su pili es capaz de estimular la activación y proliferación de los linfocitos T CD4+, así como también la producción de IL-10 por estas ³. Además, este apéndice se encarga de mediar la interacción del gonococo con las células endometriales (invasión y adhesión) e induce la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (como la IL-1 y la IL-18) y quimiocinas, agregándose a que la bacteria por sí misma, es un gran inductor de la producción del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) ⁴. Incluso, la expresión de IL-1 (adicionalmente a la IL-8) se describe como un significativo predictor pronóstico y de severidad en las infecciones con *Neisseria gonorrhoeae* ⁵.

Hoy en día, el principal tratamiento para la Enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) es con antibióticos que abarquen tanto a *Neisseria gonorrhoeae* como a *Chlamydia trachomatis*, que son las bacterias más involucradas en esta enfermedad, y además se considera que el tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos como adyuvante, no mejora los resultados clínicos ⁶. Por lo que es una gran contribución investigar los mecanismos de infección y el gatillamiento inmunológico que provoca este gonococo en las Trompas de Falopio humanas, de manera que se pudieran ofrecer tratamientos mejor dirigidos para este tipo de condiciones.

Así mismo, para ayudar a esclarecer la participación de una de las vías, las relacionadas a la secreción de IL-1 β e IL-18, en esta unidad de investigación se cuantifica el nivel de expresión génica de ambas citoquinas a partir de RNA extraído de cultivos celulares infectados a distintos tiempos con *Neisseria gonorrhoeae*.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. *Neisseria gonorrhoeae*

Es una bacteria del género *Neisseria*, con forma cocácea agrupada de a pares (diplococo) que carece de cápsula y cuya superficie externa está compuesta por apéndices no flagelados (pili) y se tiñe como Gram-negativo. Tiene un diámetro de entre 0.6 a 1 μm , siendo su tamaño promedio 0.8 micrones ⁷, y bajo tinción de Gram, se observa al microscopio como dos estructuras arriñonadas o en granos de café, unidas por

la concavidad en pares adyacentes, casi siempre agrupadas en el espacio extracelular o en el citoplasma de polimorfonucleares abundantes ².

Para su diagnóstico es necesario realizar un cultivo del gonococo en agar Thayer-Martin suplementado con los antibióticos vancomicina, colistina y nistatina, para inhibir la microbiota acompañante de la muestra. Esta bacteria es lábil al calor, a la refrigeración y a diversos antisépticos; además, es sensible a la desecación y resiste poco a la exposición al aire (una o dos horas), por lo que debe ser sembrado de inmediato en el medio indicado, bajo condiciones atmosféricas de CO₂ entre 3-5% ⁸, una temperatura entre 35-36°C y ph entre 7,2 y 7,6 ⁸. Esto se continúa con la identificación bioquímica utilizando azúcares, ya que es capaz de oxidar la glucosa, pero no lactosa, maltosa, sacarosa y fructosa ⁷.

Neisseria gonorrhoeae es denominada en la literatura como gonococo y corresponde a un patógeno exclusivo del ser humano y agente causal de la gonorrea, infección que, aunque en mujeres es asintomática en muchos casos (20 - 50%), debido en parte acción de la progesterona ⁹, otras pacientes podrían presentar como manifestación clínica disuria y secreción cervical (cervicitis gonocócica) ¹. Su periodo de incubación es de 3 a 5 días y puede haber invasión uterina en los primeros meses post infección, con síntomas de endometritis, salpingitis o peritonitis pélvica ya que produce supuración aguda de la mucosa; mientras que, a largo plazo puede llevar a invasión tisular, inflamación crónica y fibrosis ^{1,10} con un desenlace adverso del embarazo e infertilidad en caso de tratamiento inadecuado o ausente. Este patógeno también infecta las trompas de Falopio y los tejidos adyacentes ⁷, lo que conduce a la enfermedad inflamatoria pélvica (EIP), lo que ocurre entre el 10 - 20% de mujeres infectadas, y es una de las principales causas de esterilidad y de embarazos ectópicos, debido a la formación de cicatrices ². Gonococo tiene tropismo por mucosa genital y se une a la superficie de epitelio uretral, endocervical, vaginal y microvellosidades de las células de las Trompas de Falopio, a

través del pili y las proteínas Opa, de esta manera evita ser arrastrada por secreción vaginal normal o por la orina cuando coloniza la uretra⁷; a su vez, gatilla una respuesta inflamatoria potente y local, caracterizada por el reclutamiento de neutrófilos o polimorfonucleares (PMN); leucocitos presentes en grandes cantidades en sangre periférica humana, fagocitos profesionales, y componentes de primera línea en la defensa del sistema inmune innato del hospedero¹¹. Pese a que los PMN fagocitan a *N. gonorrhoeae*, no son suficientes para eliminar esta infección, ya que se ha propuesto que gonococo utiliza la variabilidad antigénica de su proteína Opa para interactuar con los leucocitos y así evadir una efectiva respuesta inmune, lo cual permite la persistencia de la infección y evita el desarrollo de memoria inmunológica en el hospedero¹². A ello se suma que la bacteria también puede ser fagocitada por macrófagos gracias a la interacción con el lipooligosacárido (LOS), que actúa como factor de virulencia y se encuentra expuesto en su superficie. Esta estructura se unirá posteriormente a un denominado potenciador de infectividad en la superficie del macrófago¹³. Finalmente, *N. gonorrhoeae* también es capaz de asociarse a través del pili, por su subunidad denominada PilC, a células epiteliales y endoteliales¹⁴.

3.2. Citoquinas

Las citoquinas son proteínas producidas por las células en respuesta a algunos estímulos, siendo el principal mecanismo de defensa del sistema innato frente a infecciones o daño tisular, y son las responsables de la respuesta inflamatoria que gatilla el gonococo en la mucosa tubaria^{15,16,17}. Las citoquinas son moléculas pleiotrópicas, es decir, su acción la pueden ejercer sobre varios tipos celulares, además pueden, según su efecto, ser redundantes (citoquinas que producen el mismo efecto), sinérgicas (citoquinas que potencian sus efectos) o antagónicas (citoquinas que se inhiben mutuamente); así, según la distancia que recorre la citoquina desde la célula que la

produce hasta la célula blanco, se pueden clasificar según su efecto autocrino (la citoquina actúa sobre la misma célula que la produce), paracrino (la citoquina actúa sobre células adyacentes) o endocrino (la citoquina actúa sobre células a distancia) ^{15,18}. Dentro de estas clasificaciones, las citoquinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18 actúan de manera sinérgica y son secretadas tanto de forma paracrina como endocrina, al ejercer su acción tanto local como sistémicamente ¹⁹. Ambas interleuquinas son parte de las 11 citoquinas que componen la familia de la interleuquina IL-1, siendo ambas proinflamatorias y secretadas tanto por células del sistema inmune como macrófagos/monocitos, células dendríticas, células natural killer (NK), linfocitos B y neutrófilos, así como por células endoteliales y epiteliales tales como los queratinocitos ^{16,20,21}.

Para la producción de IL-1 β e IL-18 se requiere que la célula reciba dos señales: la primera es la activación de la transcripción génica del precursor de estas citoquinas (pro-IL-1 β y pro-IL-18), y la segunda señal es por activación del inflamasoma, donde se va a escindir por proteólisis los precursores, formando las proteínas citoquinas activas, que en este estado ya pueden traspasar la membrana plasmática y salir de la célula ^{16,22}. El inflamasoma es activado al reconocer patrones moleculares asociadas a patógenos (PAMP) o patrones moleculares asociados a daño (DAMP), sensores que a su vez van a activar a la caspasa-1, perteneciente al complejo del inflamasoma, proteasa que junto con inducir piroptosis, su principal función va a ser escindir en el aminoácido aspartato a los precursores de estas citoquinas, convirtiéndolas a su forma activa ^{23,24}.

En cuanto a la acción de estas citoquinas, se describe que la IL-1 β es un potente inductor de inflamación, vasodilatación y extravasación de células inmunes, y también cumple un rol en la organización de la respuesta inmune adaptativa; mientras que la IL-18 promueve la producción del IFN- γ en las células Th1, células NK y células T citotóxicas, mejora el desarrollo de las células Th2, y promueve la inflamación local

^{24,25}. La producción de la IL-1 β es sólo inducida mediante un estímulo inflamatorio, por el contrario, la IL-18 es expresada constitutivamente, sin embargo, ambas producciones son reguladas por señales inflamatorias que aún han sido escasamente estudiadas ²⁶.

Se ha reportado que *Neisseria gonorrhoeae* induce apoptosis en las células de trompa de Falopio humana, pero no aumenta la expresión de los genes relacionados a la apoptosis, infiriéndose, por tanto, la presencia de un mecanismo protector del gonococo que le permite colonizar ^{27,28}. Al hacerlo, desencadena una reacción inflamatoria, denominada en la mucosa tubaria como salpingitis, principalmente por reclutamiento masivo de neutrófilos, mediado por las citoquinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18, además del factor de necrosis tumoral alfa, que termina en un daño tisular que podría provocar infertilidad ²⁹. Otro factor que podría explicar la colonización del gonococo en el tracto genital femenino, es que se ha descrito en modelos murinos, que estimula moléculas y células reguladoras (o anti-inflamatorias) del sistema inmune adaptativo, principalmente la IL-10 y las células T reguladoras tipo I (Th1) respectivamente, lo que lo protegería de la fagocitosis, aunque aún no se describe exactamente su rol protector en la infección ^{30,31}, pero se relaciona a que encuentran un nicho replicativo o reservorio en los macrófagos³².

Siendo por tanto, un importante foco de investigación, el analizar la participación de moléculas pro-inflamatorias como la IL-1 β e IL-18 en la infección por gonococo en las trompas de Falopio humanas.

4. HIPÓTESIS

Neisseria gonorrhoeae induce un aumento en la expresión de los genes de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18 en células epiteliales de Trompa de Falopio humana infectadas.

5. OBJETIVO GENERAL

Medir la expresión de los genes de las citoquinas IL-1 β e IL-18 a partir de RNA mensajero previamente aislado de células epiteliales de trompa de Falopio humana infectadas con *Neisseria gonorrhoeae* mediante RT-qPCR.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar la expresión de los genes de las citoquinas IL-1 β e IL-18 a partir de RNA mensajero transcrito mediante RT-qPCR infectado y no infectado a los tiempos de 4, 8 y 24 horas.
- Cuantificar la expresión del gen ribosomal 18S a partir de RNA mensajero transcrito mediante RT-qPCR infectado y no infectado a los tiempos de 4, 8 y 24 horas.
- Normalizar los resultados mediante el método 'Delta Ct'.

7. METODOLOGÍA

Este trabajo está enmarcado dentro de un proyecto de investigación aprobado por Vicerrectoría de Investigación (UNAB regular DI-10-17/R).

7.1. Tipo de Estudio→ Estudio de tipo Cuantitativo.

7.2. Lugar de Realización→ Centro de Medicina Integrativa y Ciencia Innovativa (CIMIS) de la Universidad Andrés Bello.

7.3. Obtención RNA

Los RNA fueron obtenidos a partir de cultivos primarios de células epiteliales de trompa de Falopio humana (FTECs) infectadas con *N. gonorrhoeae* variante P9-17 (Pil+ Opa+) con un índice de multiplicidad de infección (MOI) de 50 por 4, 8 y 24 horas y mantenidas a 37°C y 5% CO₂. El control negativo consistió en células sin infectar. Se purificó el RNA total de las FTECs mediante el uso de Trizol Reagent (Ambion™, Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del proveedor. El RNA usado para el presente experimento fue tratado con RQ1 RNase-Free DNase (Promega), y medido con Qubit RNA BR Assay Kit con el fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen™, Thermo Scientific).

7.4. RT-qPCR

La síntesis de cDNA se realizó usando la enzima SuperScript IV Reverse Transcriptase (Invitrogen™, Thermo Scientific) para el primer ensayo, para los posteriores se utilizó M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™, Thermo Scientific), donde en ambas, según las instrucciones de sus fabricantes, fueron sometidos al ciclo de transcripción reversa en el Termociclador Mastercycler®

nexus gradient (Eppendorf, Arquimed). El PCR en tiempo real o cuantitativo para la detección de la expresión génica de las citoquinas IL-1 β e IL-18, además del gen *housekeeping* 18S, fue con el Kit KiCqStartTM SYBR[®] Green qPCR ReadyMixTM (Sigma-Aldrich) con el termociclador Eco 48 (PCRmax).

Los partidores utilizados fueron los siguientes:

18S-Fw, 5'-CTCAACACGGGAAACCTCA-3' ³³

18S-Rv, 5'-CGCTCCACCAACTAAGAAC-3' ³³

IL-1 β -Fw, 5'-CTGTCCTGCGTGTTGAAAGA-3' ³³

IL-1 β -Rv, 5'-TTGGGTAATTTTTGGGATCTACA-3' ³³

IL-18-Fw, 5'-CCTGGAATCAGATTACTTTGGC-3' ³⁴

IL-18-Rv, 5'-CCGGGGTGCATTATCTCTAC-3' ³⁴

La cuantificación relativa de los genes en estudio, fue analizado en base al threshold cycle (Ct) otorgado por el software Eco Study (PCRmax).

7.5. Controles

Se utilizaron dos controles:

- a. Un control sin la enzima transcriptasa reversa, que corrió en paralelo junto con su muestra de RNA respectiva desde el proceso de transcripción reversa hasta la medición en el PCR cuantitativo. Esto con el fin de descartar la presencia de contaminación de DNA en la muestra
- b. Un control de dímeros de primers o control sin templado (NTC: no template control), que fue utilizado para el qPCR, que consistía en agregar un tubo que no contuviera cDNA, esto se realizó para cada gen, cada vez que se realizó un ensayo de qPCR. Esto con el fin de descartar que los primers utilizados estuvieran formando dímeros que podrían confundir el resultado final.

8. RESULTADOS

Para determinar la expresión de los genes de las citoquinas IL-1 β e IL-18, se tomaron como muestra dos pacientes, identificadas como Paciente 6 y Paciente 7 (P6 y P7, respectivamente); además como control positivo se midió la expresión del gen *housekeeping* o de referencia 18S junto a las interleuquinas, y cuya medición se evaluó bajo las condiciones: control (células sin infectar) e infección (células infectadas con *Neisseria gonorrhoeae*), a diferentes tiempos (4, 8 y 24 horas). El valor correspondiente a la expresión génica en cada caso corresponde al Threshold cycle (Ct) otorgado por el Software Eco Study (PCRmax) y se puede observar en la Tabla 1.

Posteriormente, los resultados expuestos en la Tabla 1 fueron ingresados a Microsoft Excel para su análisis estadístico: la aplicación del método delta Ct (Δ Ct), que consiste en normalizar cada valor del gen de referencia con el gen *housekeeping* (HK) 18S utilizando la siguiente fórmula:

$$\Delta\text{Ct: } \text{Ct}_{\text{citoquina}} - \text{Ct}_{18\text{S}}.$$

Paralelo a ello, utilizando las fórmulas de Excel, se calculó el error típico seleccionando para cada condición, el valor Ct correspondiente a cada interleuquina, por separado, con el gen 18S.

Ambos resultados se ingresaron al programa GraphPad Prism 7.03 en una tabla de datos agrupados para generar los gráficos que se muestran en la Figura 1.

*TABLA 1: Valores de Ct obtenidos en qPCR. Se observan los Ct obtenidos para la paciente 6 y 7, en los tiempos de infección de 4, 8 y 24 horas, para la expresión de los genes 18S, IL-1 β e IL-18. Para el gen 18S se utilizaron 1000 pg (1 ng) de cDNA inicial y se corrieron 30 ciclos del qPCR; y para las citoquinas se utilizaron 2000 pg (2 ng) de cDNA inicial, y se corrieron 40 ciclos del qPCR. * Muestra contaminada, mostró amplificación del NTC con un Ct de 26.75.*

Tabla 1: Valor Ct				
RNA	Condición	18S (1000 pg. 30 ciclos)	IL-1β (2000 pg. 40 ciclos)	IL-18 (2000 pg. 40 ciclos)
P6 4 horas	Control	15.04	31.11	31.71
	Infección	13.1	38.21	35.44
P6 8 horas	Control	12.83	19.08	33.97
	Infección	15.33	31.79	33.47
P6 24 horas	Control	22.8*	39.16	36.4
	Infección	17.73	37.64	0
P7 4 horas	Control	21.44	0	39.34
	Infección	18.27	36.72	35.06
P7 8 horas	Control	13.16	33.22	0
	Infección	22.99	33.97	36.1
P7 24 horas	Control	23.33	35.9	35.71
	Infección	15.04	0	0

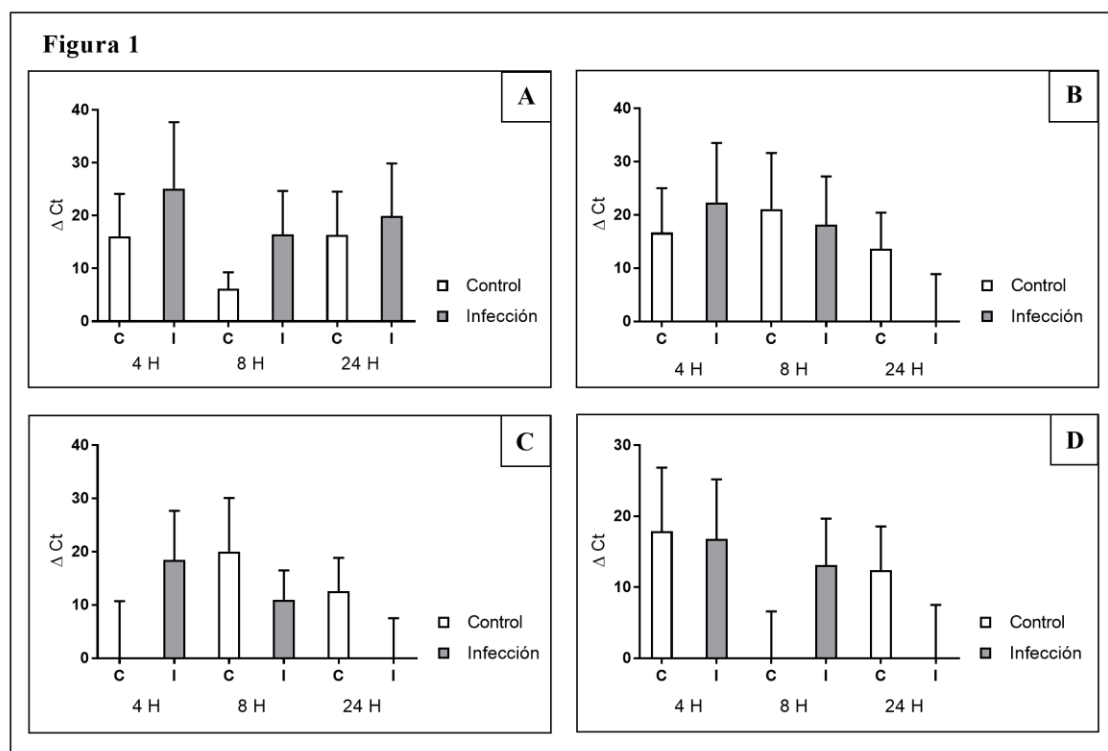


FIGURA 1. Gráficos de expresión génica de las citoquinas en FTECs bajo condición control o no infectada e infectadas con *N. gonorrhoeae* a 4, 8 y 24 horas, más el error típico positivo calculado: (A) Paciente 6 con IL-1 β , (B) Paciente 6 con IL-18, (C) Paciente 7 con IL-1 β y (D) Paciente 7 con IL-18. Muestras con valor cero en el gráfico corresponden a resultados negativos de ΔCt .

En la paciente 6 para la IL-1 β , se observa una tendencia a que el ΔCt aumente en la condición de infección en todas las horas, frente a la condición sin infectar. Situación que no se repite como tendencia general en los otros gráficos.

En la paciente 6 para la IL-18 se observa un aumento en el ΔCt en la condición infectada a las 4 horas frente a su control. Situación que va disminuyendo en las horas posteriores. Un fenómeno parecido se observa en la paciente 7, pero para la IL-1 β .

En el último caso de la paciente 7 para la IL-18, se observa que a las 4 horas, tanto la condición control como infección, muestran un similar nivel de expresión, que en la situación control es inhibida a las 8 horas, y levemente disminuye en la infección. Y por último a las 24 horas, esta citoquina se expresa en la condición control, pero en la infección es inhibida.

No se calculó la significancia, ya que se realizó un solo ensayo para cada muestra.

9. DISCUSIÓN

Se han descrito previamente algunos de los procesos inmunitarios que se gatillan con la infección por gonococo, quien, según el tiempo transcurrido, puede estimular tanto la inmunidad innata como la adaptativa. Esta última se define como una respuesta inmune específica que representa la adaptación de un individuo como resultado de la exposición a un patógeno en particular, y por lo tanto está determinada por los desafíos inmunológicos con los que se encuentra una persona a lo largo de su vida; en cambio, la inmunidad innata se compone de una serie de barreras, constitutivas e inducibles con una amplia variedad de formas de reconocimiento y mecanismos efectores, que no dependen de la exposición previa a un patógeno específico para su respuesta, sino que es controlada por los productos de los genes de la línea germinal que se heredan y expresan en forma similar por toda persona sana ³⁵. Para los casos analizados en este trabajo, el epitelio de revestimiento de la mucosa tubaria actúa como primera línea de defensa contra el gonococo; y en ella se expresarán los dos genes estudiados (IL-1 β e IL-18) que participan de la inmunidad innata, y se demuestra que bajo las condiciones descritas para esta investigación, para ambas pacientes, a 4 y 8 horas de infección se expresa IL-18,

mientras que IL-1 β se expresa en los tres tiempos, por lo menos en la paciente 6. Respecto a esto, y debido a los tiempos de infección estudiados (hasta 24 horas), las secreciones de estas citoquinas se atribuyen a la inmunidad innata, principalmente por parte de histiocitos o macrófagos, ya que los elementos de la inmunidad adaptativa pueden tardar de 4 a 7 días en comenzar a actuar ³⁶, y las pacientes de las que se obtuvieron estas células no cuentan con antecedentes de infección por gonorrea.

Adicionalmente indicar que este es un estudio que busca dar una proyección sobre la expresión proteica de las citoquinas que finalmente mediarán con el gonococo, y aunque, si bien se describe que hay una fuerte relación entre RNA y expresión proteica ^{37,38}, sobretodo de los genes que se expresan de manera diferente a sus controles, con los genes *housekeeping* no tiende a haber tan marcada relación ³⁷, además, de que en general pueden haber diferencias por efectos mismos de la post-transcripción y traducción que aún no son muy bien estudiados para poder efectuar una correlación exacta ^{39,40}, por lo que la proyección de los niveles de RNA medidos en este estudio, no pueden ser ciegamente relacionados a la posterior expresión proteica. De hecho, estudios en líneas celulares humanas y de reacción a fármacos, reportan que la relación RNA/proteína dista mucho de ser significativa ^{41,42}, donde incluso en el primero se observó sólo un 33% de significancia entre los perfiles de RNA y proteínas ⁴². Por lo que los autores de dichas investigaciones mencionan que no se pueden usar los niveles de RNA como sinónimo de expresión proteica, sin una validación a posteriori de la expresión de esta última ⁴³. Pero como este proyecto está dentro de una investigación mayor, sabemos que hay experimentos de expresión de proteínas con los cuales se podrá correlacionar estos resultados.

Además mencionar que el universo muestral es demasiado acotado como para concluir que existe una relación entre las circunstancias biológicas y la expresión de citoquinas en el cuerpo, más considerando que los experimentos fueron realizados con RNA extraído de muestras resecadas, con células in vitro, por lo que la condición de las

células, y el estrés al que están sometidas por la manipulación, es diferente de su medio in vivo, por lo que los resultados, si se extrapolan a un organismo vivo, podrían variar.

Si bien en esta unidad de investigación el estudio estuvo centrado en la expresión de citoquinas a partir de células epiteliales de trompas de Falopio, existen antecedentes de expresión de los mismos genes analizados en este trabajo, pero bajo circunstancias patológicas distintas y en otros sitios del cuerpo, como la presencia de IL-18 en queratinocitos del cuello uterino infectados por Virus Papiloma Humano (HPV) tipo 16 en donde se observa que el virus inhibe la expresión de la citoquina ⁴⁴, o en líneas celulares epiteliales gástricas en presencia de *Helicobacter pylori* y gastritis, en donde, a diferencia del caso anterior, esta bacteria incrementa la producción de la IL-18 ⁴⁵. También en presencia de otros patógenos de transmisión sexual como *Chlamydia trachomatis*, la secreción de IL-1 β está directamente relacionada a la presencia de este microorganismo ⁴⁶. Todos estos escenarios son posibilidades de estudio para complementar la información que se conoce sobre la acción de las citoquinas en situación de infección y sus respectivos mecanismos de acción.

Respecto a los denominados genes *Housekeeping* o de referencia, son genes necesarios para la mantención de funciones en las células que son indispensables para su supervivencia, por lo que se espera se expresen siempre de forma constante, no importando tipo de tejido, etapa del ciclo celular, estado de maduración, o señal externa que reciba ⁴⁷. Bajo este concepto, es común que se normalice la expresión de otros genes en función de estos, pero es una práctica con la que algunos investigadores no concuerdan, porque hay ocasiones en que estos genes pueden no expresarse de la forma constante que se esperaría. Es el caso, de como se observó en la tabla 1, del gen 18S, que en algunas muestras se expresó de forma muy diferente en el caso control versus en el caso infectado, pudiéndose relacionar, de acuerdo a lo que se ha reportado, que la expresión de este gen puede variar según si las células han estado expuestas a estrés

oxidativo o a sustancias antioxidantes ⁴⁸, o también por el simple manejo y manipulación de las muestras ⁴⁹; siendo importante, por tanto, que al momento de elegir el gen *housekeeping* normalizador, se conozcan sus límites en el tejido y/o que se valide su expresión constante a priori ^{49,50}. Las razones anteriormente mencionadas, podrían explicar las diferencias de expresión encontradas, pese a que muchos autores califican este gen como el más constante dentro de los *housekeeping* ^{50,51,52,53}, también se señala, que por todas estas variaciones, para que los resultados sean confiables, no se debiera usar sólo un gen de referencia, sino que se debería normalizar con al menos dos, para que se consideren reproducibles y serios y minimizar al máximo el error ^{54,55}.

Es necesario mencionar que desde una de las muestras, correspondiente a P624hC (paciente 6, control sin infectar a las 24 horas) para el gen 18S, no se obtuvieron resultados confiables, puesto que el control de dímeros de primers o NTC, obtuvo amplificación; resultado que se volvió a repetir al rehacer el experimento, pero que sin embargo, no había ocurrido antes con las otras muestras de cDNA donde se quería medir la expresión del gen 18S, rechazándose, por tanto, la premisa de la presencia de dímeros formados por estos partidores. Cabe decir que este era justamente el último experimento, y que además, este control no contiene cDNA, descartándose una contaminación de este tipo, por lo que apuntamos nuestra explicación hacia una contaminación del agua de PCR utilizada, o bien del Kit KiCqStart™ SYBR Green qPCR ReadyMix, que por las múltiples manipulaciones y ciclos de congelación/descongelación, se pudo haber contaminado.

En cuanto al RNA de la IL-1 β correspondiente a la paciente 7 control sin infectar para 8 y 24 horas, muestra una mayor expresión con respecto a los valores de infección en los mismos tiempos, lo que puede atribuirse a la interacción con la IL-10 que se describió en la introducción, que provocaría una disminución en la expresión génica de IL-1 β en situación de infección.

En IL-18 se muestran resultados parecidos entre ambas pacientes, porque la expresión en condición infectada disminuye a lo largo de las horas hasta las 24 horas donde ya no hay expresión. Lo diferente entre estos dos gráficos es el control de 8 horas donde no hubo expresión, más no imposible, ya que en condiciones normales bien podría no haber una expresión significativa debido a que no existe un antígeno que lo desencadene.

Tanto por disponibilidad de reactivos y por el tiempo asignado para la realización experimental de este trabajo, algunos tiempos de infección a analizar no fueron incorporados al estudio, por lo que se sugieren como trabajo futuro. Los tiempos de 0 y 12 horas son los que se proponen ya que son importantes para determinar qué sucedería en un tiempo inicial para conocer la cantidad de expresión basal; así también se podría realizar otro análisis (con delta delta Ct), para evaluar si esta expresión inicial es igual, más alta o más baja con respecto a la información obtenida a las 4 horas. Y lo mismo para el tiempo de 12 horas con respecto a las 8 y 24 horas.

Como se explica en la metodología, la síntesis de cDNA se realizó a partir de RNA tratado con DNasa y medido con fluorómetro para conocer el valor exacto de su contenido en ng/mL, ya que a partir de ello se calculó el volumen a extraer de cada muestra para completar los requerimientos de cada protocolo (los 1000 y 2000 pg mencionados anteriormente). Es así como se realizaron dos protocolos con enzimas diferentes: (a) SuperScript IV Reverse Transcriptase y (b) M-MLV Reverse Transcriptase. Para las muestras control e infección de la Paciente 6 a las 4 horas del gen *housekeeping* o de referencia (18S) se utilizó la primera enzima, que en su datasheet recomienda añadir como concentración de RNA entre 10 pg-5 µg (10 pg-500000 pg), se agregaron 1000 pg de RNA a la mezcla. Por otro lado, M-MLV RT se utilizó en los ensayos para genes de interés (IL-1β e IL-18) y muestras control e infección para los tiempos 8 y 24 horas del gen 18S de la paciente 6, y todas las muestras de la paciente 7; en este caso se necesita entre 1 ng a 5 µg (1000 pg-500000 pg) de RNA según

fabricante, y donde se agregaron 2000 pg para la medición de las citoquinas, y 1000 pg para el 18S. El cambio de enzima se realizó por el escaso reactivo de la primera (a) y la dificultad por tiempo, en volver a conseguir la misma; y el ajuste en la cantidad de RNA añadida a la mezcla para transcripción reversa es debido a que esta nueva enzima (b) en experiencias previas, con la cantidad inicial de RNA (1000 pg) se presentó una expresión de nula a mínima en el qPCR empleado a continuación, por lo que se tuvo que aumentar la cantidad de RNA para lograr obtener amplificación.

Con lo explicado en el párrafo anterior, los valores obtenidos como resultado para las muestras de 18S sintetizadas con la enzima (a) podrían haber sido usados al doble, ya que corresponde a un gen que se expresa de manera constante ⁴⁸, sin embargo esto sólo representaría un supuesto, y no a los valores reales obtenidos realizando la experiencia. Es por esto que se decidió calcular el ΔC_t para cada caso con los datos entregados en qPCR y concluir que se encuentran sobrevalorados.

Por otro lado, para disminuir la posibilidad de error por el cambio de protocolo para cada enzima e intentar estandarizar la técnica, se aumentó la concentración de Primer recomendada en la enzima (b), de esta forma se utilizaron las mismas cantidades de reactivos para ambos protocolos.

Respecto a esto último, Ståhlberg et al. menciona que los resultados en esta técnica sólo son comparables si todas las muestras contienen la misma cantidad de RNA ⁵⁶, quitando, por tanto, validez a nuestros resultados. Aun así, creemos importante repetir, que la expresión de RNA no necesariamente se condice con la expresión proteica, siendo necesario obtener datos de esta última.

10. CONCLUSIONES

En este trabajo se buscó medir el nivel de expresión de genes para la IL-1 β e IL-18 en infección por gonococo con la finalidad de evaluar su rol participando de la inmunidad innata, bajo este precepto, los resultados obtenidos en el caso de IL-1 β concuerdan con la hipótesis planteada en este trabajo, al menos a nivel de la Paciente 6 que en condición de infección su expresión aumenta. Sin embargo, se sugiere que esto se complemente con otras técnicas de estudio para la expresión como proteína, debido a que el universo muestral en este caso es muy acotado. Por otra parte, este es el primer trabajo en que se evidencia la expresión génica de IL-18 que es inversamente proporcional al tiempo transcurrido, en células epiteliales de trompa de Falopio humana infectadas con *Neisseria gonorrhoeae*, que si bien no es un modelo *in vivo*, sino cultivo primario, contribuye a la información conocida de otras interleuquinas que participan en el reclutamiento de elementos inflamatorios desencadenado frente a la infección por gonococo, y que generarán salpingitis e infertilidad en caso de no acceder a un tratamiento adecuado.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministerio de Salud de Chile [Internet]. Norma de Profilaxis, Diagnóstico y Tratamiento de las Infecciones de Transmisión Sexual (ITS). 2016. Disponible en:
<https://www.cemera.cl/sogia/pdf/2016/Norma%20de%20Profilaxis%20Diagnostico%20y%20Tratamiento%20de%20las%20Infecciones%20de%20Transmision%20Sexual.pdf>
2. Prescott L., Willey J., Sherwood L., Woolverton C., Gibert I., Harley J. and Klein D. Microbiología. 7° ed. Madrid.: McGraw-Hill; 2009.
3. Plant L, Jonsson A. Type IV Pili of *Neisseria gonorrhoeae* Influence the Activation of Human CD4+ T Cells. *Infection and Immunity*. 2006;74(1):442-448.
4. Christodoulides M, Everson J, Liu B, Lambden P, Watt P, Thomas E et al. Interaction of primary human endometrial cells with *Neisseria gonorrhoeae* expressing green fluorescent protein. *Molecular Microbiology*. 2000;35(1):32-43.
5. Singer M, Ouburg S. Effect of cytokine level variations in individuals on the progression and outcome of bacterial urogenital infections—a meta-analysis. *Pathogens and Disease*. 2016;74(2):ftv126.
6. Brunham R, Gottlieb S, Paavonen J. Pelvic Inflammatory Disease. *New England Journal of Medicine*. 2015;372(21):2039-2048.
7. Boletín Laboratorio y Vigilancia al Día, Instituto de salud pública de Chile- Departamento de Asuntos Científicos, N°. 12. Mayo 2012. Disponible en: <http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2012/06/BOLETIN%20N12.pdf>
8. Instituto de Salud Pública de Chile. Vigilancia de *Neisseria gonorrhoeae*. 2010-2016. Boletín de laboratorio y vigilancia al día 2016; 6 (12): 1-13.

9. Xu L, Dong B, Wang H, Zeng Z, Liu W, Chen N et al. Progesterone suppresses Th17 cell responses, and enhances the development of regulatory T cells, through thymic stromal lymphopoietin-dependent mechanisms in experimental gonococcal genital tract infection. *Microbes and Infection*. 2013;15(12):796-805.
10. Aurelio Salvo L. Infecciones de transmisión sexual (ITS) en Chile. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2011;22(6):813-824.
11. Borregaard, N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010;33(5):657–670.
12. Sadarangani, M., Pollard, A., Gray-Owen S. Opa proteins and CEACAMs: pathways of immune engagement for pathogenic *Neisseria*. *FEMS Microbiology Reviews*. 2011;35(3): 498–514
13. Leuzzi R., Serino L., Scarselli M., Savino S., Fontan, M., Monaci E., et al. Ng-MIP, a surface-exposed lipoprotein of *Neisseria gonorrhoeae*, has a peptidyl-prolyl cis/trans isomerase (PPIase) activity and is involved in persistence in macrophages. *Molecular Microbiology*. 2005, 58(3):669–681.
14. Scheuerpflug I., Rudel T., Ryll R., Pandit J., & Meyer T. F. Roles of PilC and PILE Proteins in Pilus-Mediated Adherence of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* to Human Erythrocytes and Endothelial and Epithelial Cells. *Infection and Immunity* 1999, 67(2), 834–843.
15. Palomo G. I, Ferreira V. A, Sepúlveda C. C, Roseblatt S. M, Vergara C. U. *Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica*. Capítulo 11: Citoquinas. 1° ed. Talca, Chile.: Editorial Universidad De Talca; 2009.
16. Abbas A, Lichtman A, Pillai S, Abbas A. *Inmunología Celular Y Molecular*. Capítulo 4: Inmunidad Innata. 7° ed. Madrid, España.: Elsevier; 2012.
17. Maisey K, Nardocci G, Imarai M, Cardenas H, Rios M, Croxatto H et al. Expression of Proinflammatory Cytokines and Receptors by Human Fallopian Tubes in Organ Culture following Challenge with *Neisseria gonorrhoeae*. *Infection and Immunity*. 2003;71(1):527-532.

18. Ugr.es.[Internet]. Curso De Inmunología General: 14. Citoquinas. 1999 [citado 6 de Agosto 2017]. Disponible en: https://www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap_14.htm
19. Dinarello, CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 1996;87(6): 2095-2147
20. Dinarello C. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annual Review of Immunology*. 2009; 27(1):519-550.
21. Feldmeyer L, Werner S, French L, Beer H. Interleukin-1, inflammasomes and the skin. *European Journal of Cell Biology*. 2010; 89(9):638-644.
22. Dinarello, Charles A. Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process. *The American journal of clinical nutrition*. 2006; 83.2: 447S-455S.
23. Esquerdo K, Sharma N, Brunialti M, Baggio-Zappia G, Assunção M, Azevedo L et al. Inflammasome gene profile is modulated in septic patients, with a greater magnitude in non-survivors. *Clinical & Experimental Immunology*. 2017;189(2):232-240.
24. Man S, Karki R, Kanneganti T. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunological Reviews*. 2017;277(1):61-75.
25. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Inmunología celular y molecular*. Sección IV: Mecanismos efectores de las respuestas inmunitarias. 6° ed. Madrid, España: Elsevier; 2011.
26. Zhu Q, Kanneganti T. Cutting Edge: Distinct Regulatory Mechanisms Control Proinflammatory Cytokines IL-18 and IL-1 β . *The Journal of Immunology*. 2017;198(11):4210-4215.
27. Reyes P, Vargas M, García K, Rubilar P, Navarrete P, Fuentes P et al. Apoptosis related genes expressed in cultured Fallopian tube epithelial cells infected in vitro with *Neisseria gonorrhoeae*. *Biological Research*. 2007;40(3).

28. Morales P, Reyes P, Vargas M, Rios M, Imarai M, Cardenas H et al. Infection of Human Fallopian Tube Epithelial Cells with *Neisseria gonorrhoeae* Protects Cells from Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Apoptosis. *Infection and Immunity*. 2006;74(6):3643-3650.
29. Maisey K, Nardocci G, Imarai M, Cardenas H, Rios M, Croxatto H et al. Expression of Proinflammatory Cytokines and Receptors by Human Fallopian Tubes in Organ Culture following Challenge with *Neisseria gonorrhoeae*. *Infection and Immunity*. 2003;71(1):527-532.
30. Liu Y, Liu W, Russell M. Suppression of host adaptive immune responses by *Neisseria gonorrhoeae*: role of interleukin 10 and type 1 regulatory T cells. *Mucosal Immunology*. 2013;7(1):165-176.
31. Zhu W, Ventevogel M, Knilans K, Anderson J, Oldach L, McKinnon K et al. *Neisseria gonorrhoeae* Suppresses Dendritic Cell-Induced, Antigen-Dependent CD4 T Cell Proliferation. *PLoS ONE*. 2012;7(7):e41260.
32. Château A, Seifert H. *Neisseria gonorrhoeae* survives within and modulates apoptosis and inflammatory cytokine production of human macrophages. *Cellular Microbiology*. 2015;18(4):546-560.
33. García K, Escobar G, Mendoza P, Beltran C, Perez C, Arancibia S et al. ATP Induces IL-1 β Secretion in *Neisseria gonorrhoeae*-Infected Human Macrophages by a Mechanism Not Related to the NLRP3/ASC/Caspase-1 Axis. *Mediators of Inflammation*. 2016;2016:1-10.
34. Cendra M, Christodoulides M, Hossain P. Signaling Mediated by Toll-Like Receptor 5 Sensing of *Pseudomonas aeruginosa* Flagellin Influences IL-1 β and IL-18 Production by Primary Fibroblasts Derived from the Human Cornea. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017;7.
35. Firestein G. Kelley & Firestein's textbook of rheumatology. 10th ed. Philadelphia: Elsevier; 2017.

36. Janeway C, Travers P, Walport M. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th ed. New York: Garland Pub.; 2001.
37. Koussounadis A, Langdon S, Um I, Harrison D, Smith V. Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. *Scientific Reports*. 2015;5(1).
38. Guo Y, Xiao P, Lei S, Deng F, Xiao G, Liu Y et al. How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2008;40(5):426-436.
39. Silva G, Vogel C. Quantifying gene expression: the importance of being subtle. *Molecular Systems Biology*. 2016;12(10):885.
40. Vogel C, Marcotte E. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics*. 2012;.
41. Karbownik M, Szemraj J, Wieteska Ł, Antczak A, Górski P, Kowalczyk E et al. Antipsychotic Drugs Differentially Affect mRNA Expression of Genes Encoding the Neuregulin 1-Downstream ErbB4-PI3K Pathway. *Pharmacology*. 2016;98(1-2):4-12.
42. Gry M, Rimini R, Strömberg S, Asplund A, Pontén F, Uhlén M et al. Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines. *BMC Genomics*. 2009;10(1):365
43. Kendrick N. A gene's mRNA level does not usually predict its protein level [Internet]. Madison, Wisconsin: Kendrick Labs, Inc; 2014 [citado 11 de Diciembre de 2017]. Disponible en: https://kendricklabs.com/wp-content/uploads/2016/08/WP1_mRNAsvsProtein_KendrickLabs.pdf
44. Cho Y, Kang J, Cho M, Cho C, Lee S, Choe Y et al. Down modulation of IL-18 expression by human papillomavirus type 16 E6 oncogene via binding to IL-18. *FEBS Letters*. 2001;501(2-3):139-145.
45. Tomita T, Jackson A., Hida N, Hayat M., Dixon M, Shimoyama T., Axon A., Robinson P, Crabtree J. Expression of Interleukin-18, a Th1 Cytokine, in Human

- Gastric Mucosa Is Increased in Helicobacter pylori Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 2001;183(4):620–627
46. Kavathas P, Boeras C, Mulla M, Abrahams V. Nod1, but not the ASC inflammasome, contributes to induction of IL-1 β secretion in human trophoblasts after sensing of Chlamydia trachomatis. *Mucosal Immunology*. 2012;6(2):235-243.
 47. Eisenberg E, Levanon E. Human *housekeeping* genes, revisited. *Trends in Genetics*. 2013;29(10):569-574.
 48. Hayashi R. Gene Expression and the Impact of Antioxidant Supplements in the Cataractous Lens. *Handbook of Nutrition, Diet and the Eye*. 2014;:517-524.
 49. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G et al. *Housekeeping* genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology*. 1999;75(2-3):291-295.
 50. Dheda K, Huggett J, Bustin S, Johnson M, Rook G, Zumla A. Validation of *housekeeping* genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*. 2004;37(1):112-4,116,118-9.
 51. Bas A, Forsberg G, Hammarstrom S, Hammarstrom M. Utility of the *Housekeeping* Genes 18S rRNA, beta-Actin and Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase for Normalization in Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Human T Lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2004;59(6):566-573.
 52. Kuchipudi S, Tellabati M, Nelli R, White G, Perez B, Sebastian S et al. 18S rRNA is a reliable normalisation gene for real time PCR based on influenza virus infected cells. *Virology Journal*. 2012;9(1):230.
 53. Schmittgen T, Zakrajsek B. Effect of experimental treatment on *housekeeping* gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2000;46(1-2):69-81.

54. Yang X, Hatfield J, Hinze S, Mu X, Anderson P, Powell B. Bone to pick: the importance of evaluating reference genes for RT-qPCR quantification of gene expression in craniosynostosis and bone-related tissues and cells. *BMC Research Notes*. 2012;5(1):222.
55. Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M et al. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single *housekeeping* genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Analytical Biochemistry*. 2002;309(2):293-300.
56. Stahlberg A, Håkansson J, Xian X, Semb H, Kubista M. Properties of the Reverse Transcription Reaction in mRNA Quantification. *Clinical Chemistry*. 2004;50(3):509-515.

12. ANEXOS

12.1. Protocolo para SuperScript IV Reverse Transcriptase:

12.1.1. Alineamiento entre Primer y RNA templado: Combinar los siguientes componentes para el tubo de reacción:

- a. 1 μ L de Primer reverso gen específico a concentración 2 μ M.
- b. 1 μ L de dNTP mix a concentración 10mM o RTU.
- c. RNA templado a concentración 1000pg.
- d. Agua DEPC según corresponda para alcanzar 13 μ L de volumen final.

Mezclar y centrifugar brevemente.

Calentar a 65°C por 5 minutos, luego incubar en hielo o 4°C por al menos 1 minuto.

12.1.2. Preparación de RT reaction mix.

Vortex y centrifugar brevemente el Buffer 5x SSIV.

Combinar los siguientes componentes para el tubo de reacción

- a. 4 μ L de Buffer SSIV a concentración 5x.
- b. 1 μ L de DTT a concentración 100 mM.
- c. 2 μ L de agua DEPC.

Mezclar y centrifugar brevemente.

12.1.3. Combinar ambas soluciones descritas.

12.1.4. Incubar a 50°C por 10 minutos.

12.1.5. Inactivar a reacción incubando a 80°C por 10 minutos.

12.1.6. Finalizar el programa del termociclador en 4°C por diez minutos y almacenar las muestras -20°C o realizar qPCR.

12.2. Protocolo para M-MLV Reverse Transcriptase

- 12.2.1. Combinar los siguientes componentes para el tubo de reacción:
 - a. 1 μL de Primer reverso gen específico a concentración $2\mu\text{M}$.
 - b. 1 μL de dNTP mix a concentración 10mM o RTU.
 - c. RNA templado a concentración 2000pg.
 - d. Agua DEPC según corresponda para alcanzar 12 μL de volumen final.
- 12.2.2. Calentar a 65°C por 5 minutos y rápidamente enfriar en hielo o 4°C .
Centrifugar brevemente y añadir:
 - a. 4 μL de Buffer First-Strand a concentración 5x.
 - b. 2 μL de DTT a concentración 0.1 M.
 - c. 1 μL de Agua DEPC.
- 12.2.3. Resuspender e incubar a 37°C por 25 minutos.
- 12.2.4. Añadir 1 μL de M-MLV RT y Resuspender.
- 12.2.5. Incubar a 37°C por 50 minutos.
- 12.2.6. Inactivar a reacción incubando a 70°C por 15 minutos.
- 12.2.7. Finalizar el programa del termociclador en 4°C por diez minutos y almacenar las muestras -20°C o realizar qPCR.