



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS

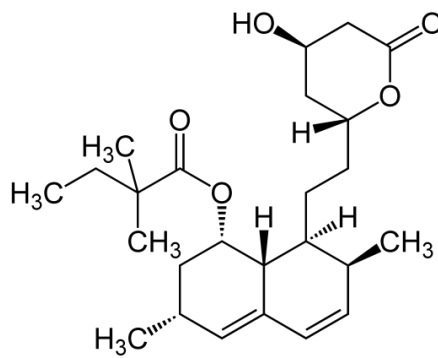
GRAO EN BIOLOXÍA

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Proba de resistencia a simvastatina en células sanas de próstata

Prueba de resistencia a simvastatina en células sanas de próstata

Simvastatine resistance test in prostate cells



Iria Janeiro Tato

06, 2018

Titoras Académicas:

Dra. Aida Ines Barreiro Alonso

Dra. María Esperanza Cerdán Villanueva

Dras. M^a ESPERANZA CERDÁN VILLANUEVA y AIDA INES BARREIRO ALONSO, Profesoras del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de A Coruña,

INFORMAN:

Que el presente Trabajo Fin de Grado realizado por Iria Janeiro Tato ha sido realizado bajo nuestra dirección y, considerándolo finalizado, damos el Visto Bueno para su presentación al Tribunal Calificador.

A Coruña, 21 de julio de 2018

Fdo.: M^a Esperanza Cerdán Villanueva

Fdo.: Aida Inés Barreiro Alonso

Alumno:

Fdo: Iria Janeiro Tato

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

RESUMO

INTRODUCCIÓN.....	1
1. PRÓSTATA	1
2. ESTATINAS Y PRÓSTATA.....	2
3. GEN VIGILIN (HDLBP).....	4
OBJETIVO	5
MATERIAL Y MÉTODOS.....	5
1. LÍNEA CELULAR.....	5
2. CULTIVO CELULAR	5
3. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ARN	6
4. CUANTIFICACIÓN DE ARN.....	8
5. DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ARN PURIFICADAS.....	9
6. PCR CUANTITATIVA CON TRANSCRIPTASA INVERSA (RT-qPCR)	10
7. TRATAMIENTO DE DATOS.....	11
RESULTADOS	12
1. CULTIVO CELULAR	12
2. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ARN	14
3. DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ARN PURIFICADAS.....	16
4. PCR CUANTITATIVA CON TRANSCRIPTASA INVERSA.....	16
5. CÁLCULOS	20
DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	23
CONCLUSIONS.....	23
CONCLUSIÓNS.....	23
BIBLIOGRAFÍA.....	24
ANEXO.....	26
1. PLACAS Y DATOS RESULTADO DE LA RT-QPCR	26
2. ANÁLISIS DE RESULTADOS	28
3. ABREVIATURAS.....	29

RESUMEN

El cáncer de próstata es considerado uno de los problemas médicos más importantes a nivel mundial, con una incidencia y prevalencia crecientes en la población masculina mayor de 65 años. Su patogénesis refleja tanto componentes hereditarios como ambientales no modificables, por lo que las terapias quimiopreventivas se consideran una de las mejores opciones para paliar sus efectos. Las estatinas son fármacos comúnmente utilizados para el tratamiento de la hipercolesterolemia que han sido descritos como potenciales agentes neutralizantes del cáncer de próstata. Sin embargo, resultados conflictivos entre estudios experimentales y epidemiológicos sugieren la necesidad de nuevas investigaciones que confirmen sus verdaderos efectos. En el presente estudio, se llevó a cabo un tratamiento con simvastatina sobre células sanas de próstata, con el fin de determinar si la adición del fármaco afectaba a su crecimiento. Los resultados obtenidos sugieren que no existen diferencias estadísticamente significativas entre células no tratadas y las tratadas con simvastatina.

Palabras clave: cáncer de próstata, PNT2, simvastatina, HDLBP, RT-qPCR.

ABSTRACT

Prostate cancer is considered one of the most important medical problems worldwide, with an increasing incidence and prevalence in the male population over the age of 65. Its pathogenesis reflects both non-modifiable hereditary and environmental components, so chemopreventive therapies are considered one of the best options to palliate its effects. Statins are drugs commonly used for the treatment of hypercholesterolemia and they have been described as potential neutralizing agents of prostate cancer. However, conflicting results between experimental and epidemiological studies suggest the need for new research to confirm their effects. In the present study, a treatment with simvastatin was carried out on healthy prostate cells, in order to determine if the drug affected its growth. The results suggest that there are no statistically significant differences between untreated cells and those treated with simvastatin.

Keywords: prostate cancer, PNT2, simvastatin, HDLBP, RT-qPCR.

RESUMO

O cancro de próstata é considerado un dos problemas médicos máis importantes a nivel mundial, cunha incidencia e prevalencia crecentes na poboación masculina maior de 65 anos. A súa patoxénese reflicte tanto compoñentes hereditarios como ambientais non modificables, polo que as terapias quimiopreventivas consideranse unha das mellores opcións para paliar os seus efectos. As estatinas son fármacos utilizados habitualmente para o tratamento da hipercolesterolemia que foron descritos como potenciais axentes neutralizantes do cancro de próstata. Non obstante, resultados conflitivos entre estudos experimentais e epidemiolóxicos suxiren a necesidade de novas investigacións que confirmen os seus verdadeiros efectos. No presente estudo, levouse a cabo un tratamento con simvastatina sobre células sanas de próstata, co fin de determinar se a adición do fármaco afectaba ao seu crecemento. Os resultados obtidos suxiren que no existen diferenzas estatísticamente significativas entre as células non tratadas e as tratadas con simvastatina.

Palabras crave: cancro de próstata, PNT2, simvastatina, HDLBP, RT-qPCR.

INTRODUCCIÓN

1. PRÓSTATA

La próstata es una glándula del aparato reproductor masculino que se encuentra situada bajo la vejiga, delante del recto (**Figura 1**). Posee una estructura compleja formada por un 30% de tejido fibromuscular y por un 70% de elementos glandulares (Mendoza, 2013). Se encuentra envuelta por una membrana conocida como cápsula prostática, que define su límite (Asociación Española Contra el Cáncer [AECC], 2018).

La función más importante de la próstata es la producción del líquido seminal, un fluido blanquecino que, junto con la secreción de las vesículas seminales, conforma y enriquece el semen, nutriendo a los espermatozoides con el fin de incrementar su viabilidad y facilitar su transporte (*Institute for Quality and Efficiency in Health Care*, 2016). Otras funciones conocidas de esta glándula son:

- **Control de la uretra y los conductos seminales** durante la eyaculación y la micción, respectivamente (evitando el contacto del semen con la orina).
- **Metabolismo hormonal masculino** mediante la transformación de la hormona sexual masculina testosterona en su forma biológicamente activa, la dihidrotestosterona (DHT).

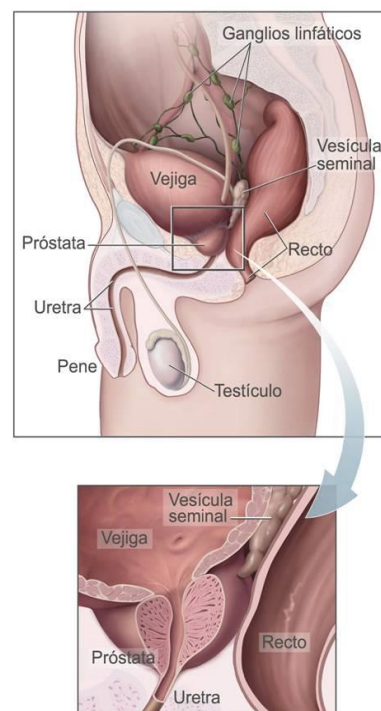


Figura 1. Esquematización de la posición de la próstata dentro del sistema urogenital masculino. Imagen recuperada de: <https://commons.wikimedia.org>

El cáncer de próstata (CP) es una enfermedad por la que se forman células malignas (cancerosas) en los tejidos de la próstata. Estas células presentan una división incontrolada que con el tiempo da lugar a un tumor o nódulo canceroso de crecimiento irregular, que puede aparecer en varios tejidos prostáticos. Eventualmente, estas células pueden diseminarse e invadir tejidos periprostáticos y órganos alejados, implantándose en ellos y produciendo metástasis (AECC, 2018).

El cáncer de próstata es el tumor maligno no cutáneo más común y la segunda causa principal de muerte por cáncer en varones en EE.UU. y Reino Unido, suponiendo respectivamente, un 9,5% y un 13% de los nuevos casos de cánceres detectados (National Cancer Institute, 2018; Cancer Research UK, 2018). En España, el cáncer de próstata supone el segundo tipo de cáncer más frecuente en varones y la segunda causa de muerte por este tipo de enfermedad (Sociedad Española de Oncología Médica [SEOM], 2018a), en ambos casos por detrás del cáncer colorrectal, con 30.076 casos diagnosticados en el año 2017 (SEOM, 2018b).

A pesar de su alta incidencia y prevalencia, la etiología y los agentes que condicionan la evolución del cáncer de próstata es poco conocida (Dawe *et al.*, 2018), aunque se han identificado tres

factores de riesgo, claramente establecidos en la literatura: aumento de edad (estableciéndose la edad crítica como los 65 años), ascendencia africana y antecedentes familiares de cáncer de próstata (De Marzo *et al.*, 2007; Dawe *et al.*, 2018). Además, se han postulado otros factores de riesgo de carácter modificable como la dieta, obesidad, hábito de fumar, enfermedades de transmisión sexual o prostatitis (inflamación de la próstata), aunque todavía continúan en estudio (De Marzo *et al.*, 2007; American Cancer Society, 2016).

Si bien la mortalidad producida por este tipo de cáncer ha disminuido en los últimos años (Wong *et al.*, 2016), la prevalencia de los factores de riesgo conocidos, sumados a la tendencia al envejecimiento de la población y al aumento del coste de los tratamientos (Dawe *et al.*, 2018) sugieren que la incidencia del cáncer de próstata seguirá aumentando, por lo que actualmente la investigación del cáncer de próstata se centra, sobre todo, en la identificación de nuevos métodos para diagnosticar y prevenir eficazmente esta enfermedad. Dentro de estos últimos, los tratamientos quimiopreventivos se han establecido como opciones potenciales en la lucha contra esta enfermedad (Dawe *et al.*, 2018).

2. ESTATINAS Y PRÓSTATA

Las estatinas constituyen una familia de fármacos de bajo peso molecular (Papadopoulos *et al.*, 2011) cuyo mecanismo de acción está relacionado con la inhibición específica de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (*HMG-CoA reductasa*), la enzima que cataliza la conversión de HMG-CoA a mevalonato, un paso temprano y limitante en la biosíntesis del colesterol (Figura 2). Además, esta vía también produce isoprenoides, los cuales a su vez activan proteínas como Ras y Rho. Estas últimas presentan funciones reguladoras importantes en la proliferación celular y se ha demostrado que contribuyen al inicio y progresión del cáncer (Walker & Olson, 2005).

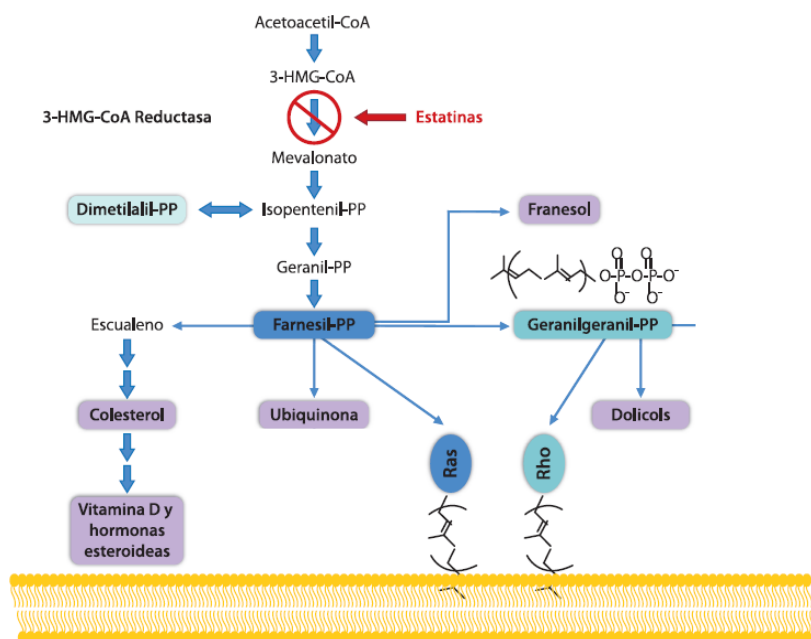


Figura 2. Acción de las estatinas sobre la vía de biosíntesis del mevalonato y derivados isoprenoides. PP: pirofosfato, 3- HMG- CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A. Imagen modificada de Rodríguez Perea *et al.* (2011).

En efecto, diversos estudios sugieren que las estatinas pueden ayudar a prevenir el desarrollo del cáncer de próstata (Dawe *et al.*, 2018) mediante acciones como la inhibición de señales de proliferación celular (Ras/Rho y andrógenos), minimización de la inflamación, sensibilización de las células cancerosas ante señales de muerte celular programada o reducción de la angiogénesis y la capacidad de invasión de estas células malignas mediante el bloqueo de señales de adhesión celular (Papadopoulos *et al.*, 2011; **Figura 3**). Por otra parte, algunos ensayos preclínicos y de laboratorio indican que estos fármacos promueven, en algunos casos, la agresividad del cáncer (Caro Maldonado *et al.*, 2018; Papadopoulos *et al.*, 2011; **Figura 3**).

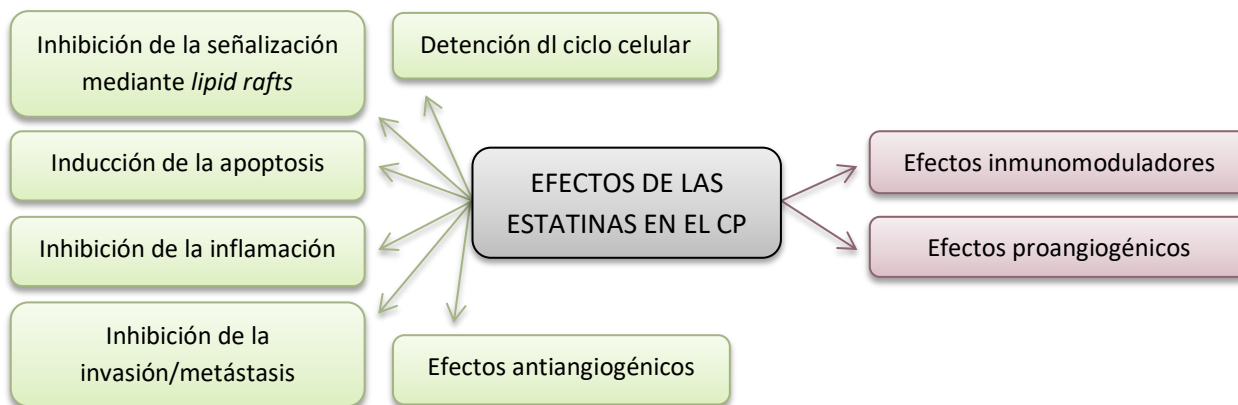


Figura 3. Efectos potenciales protectores (en verde) y dañinos (en rojo) de las estatinas en la tumorigénesis del cáncer. CP, cáncer de próstata. Imagen modificada de Papadopoulos *et al.* (2011).

Sin embargo, aunque los experimentos de laboratorio sobre células cultivadas *in vitro* destaquen el rol fundamental de las estatinas en la reducción de la incidencia y en el riesgo de recurrencia del cáncer de próstata (Papadopoulos *et al.*, 2011), los estudios epidemiológicos clínicos (de tipo caso-control o de cohortes) de la relación de estos fármacos con la reducción del riesgo a sufrir cáncer de próstata muestran resultados conflictivos (Dawe *et al.*, 2018) que suscitan dudas sobre el papel real de estos fármacos sobre este tipo de cáncer. En parte, estas discrepancias se deben a las propias limitaciones de dichos estudios, ya que se trata normalmente de ensayos de exposición al fármaco a corto plazo, con información muy limitada sobre las dosis, el momento y duración del uso de estatinas y con alta posibilidad de detecciones erróneas y sesgos de recuerdo (Babcock *et al.*, 2016).

En un estudio epidemiológico reciente, Dawe *et al.* (2018) concluyen que “*el uso de estatinas no se asocia con un efecto protector o perjudicial sobre el diagnóstico general del cáncer de próstata, independiente de la duración o la dosis de exposición*”. Sin embargo, establecen que “*el uso de estos fármacos puede reducir la probabilidad de un cáncer de próstata clínicamente significativo*”, siendo la evidencia clínica sobre su efecto protector todavía frágil e insuficiente. Por lo tanto, será necesario que futuros estudios clínicos sobre el uso de estatinas en cáncer incluyan historiales largos de prediagnóstico de estos fármacos y unas mejores técnicas de cribado antes de iniciar ensayos de quimioprevención (Babcock *et al.*, 2016; Dawe *et al.*, 2018).

2.1. SINVASTATINA

La simvastatina es un fármaco de la familia de las estatinas que se utiliza habitualmente en el tratamiento de la hipercolesterolemia (MedlinePlus, 2017), ya que debido a su acción inhibitoria sobre la enzima *HMG-CoA reductasa*, reduce los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y triglicéridos, y aumenta los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en sangre.

En 2011, Murtola *et al.* demostraron experimentalmente que la adición de simvastatina afecta al crecimiento celular en células epiteliales de próstata (tanto sanas como cancerosas) y que sus efectos difieren dependiendo de la concentración del fármaco y de la presencia extracelular de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Estos investigadores concluyeron que, a concentraciones terapéuticas del fármaco (0,1 μM), este posee efecto citostático sobre las células de próstata (siendo este mayor en células sanas), mientras que en presencia de LDL en el medio extracelular, solamente altas concentraciones de simvastatina (100 μM) suprimían el crecimiento celular.

3. GEN VIGILIN (HDLBP)

El gen Vigilin (también HBP o HDLBP, HUGO Gene Nomenclature Committee [HGNC], 2018) codifica una proteína de unión a lipoproteínas de alta densidad (HDL), que puede funcionar como reguladora de los niveles de exceso de colesterol en las células o bien unirse al ARN e inducir la formación de heterocromatina, entre otras funciones (Cheng & Jansen, 2017). Este gen se encuentra regulado positivamente por la presencia de hormonas esteroides y por altos niveles de colesterol en las células (Fidge, 1999; Figura 4).

También se ha demostrado que las estatinas regulan negativamente otras proteínas de unión a HDL (Fidge, 1999). Además, la sobreexpresión de este gen se ha relacionado con varios tipos de cáncer, entre ellos el de próstata ("Expression of HDLBP in cancer", 2018; Yang *et al.*, 2014).

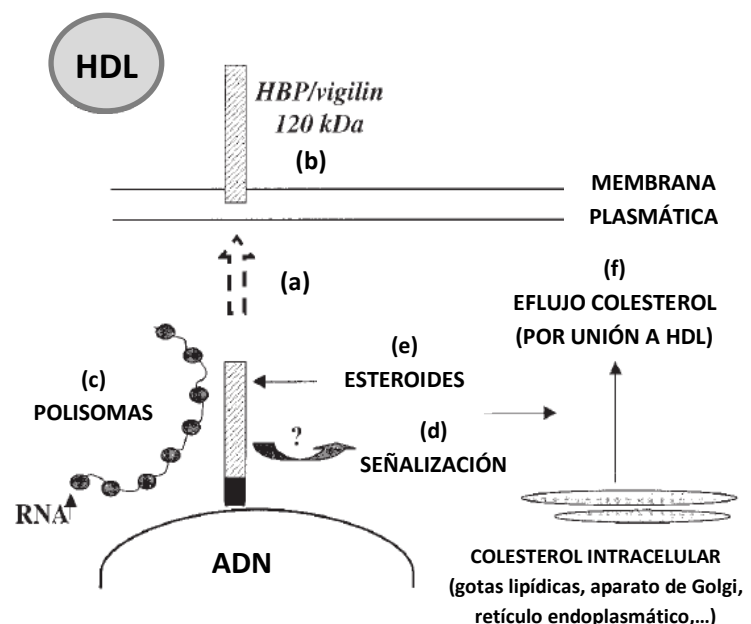


Figura 4. Funciones de La proteína HBP / vigilin en la célula. (a), translocación a la membrana plasmática; (b), unión a HDL; (c), unión a ARN mediante asociación con polisomas; (e), regulación por hormonas esteroides; (d) y (f), mecanismo de señalización desconocido para el control del eflujo de colesterol intracelular. Imagen modificada de (Fidge, 1999).

OBJETIVO

El objetivo de este estudio es determinar si la adición al medio extracelular de simvastatina en una concentración de 25µM afecta a la expresión del gen HDLBP o Vigilín en células sanas de próstata humana PNT2 en cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. LÍNEA CELULAR

Para llevar a cabo este trabajo, se utilizaron células prostáticas de la línea celular PNT2, *PNT2 Cell Line human* (Sigma-Aldrich®), establecida por inmortalización de células epiteliales de un cultivo primario de próstata humana adulta (proveniente de un hombre de 33 años), mediante transfección con un plásmido que contiene el genoma del virus SV-40.

2. CULTIVO CELULAR

Las células se cultivaron en medio RPMI 1640, suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS) y un 1% de penicilina-estreptomina (Thermo Fisher Scientific) en placas Petri p100 (7 ml de medio por placa). La inoculación de las células y sus respectivos pases (crecimiento y tratamiento) se llevaron a cabo bajo condiciones de esterilidad en una cámara de flujo laminar. El proceso de incubación se llevó a cabo en condiciones estándar de cultivo celular, 37 °C y con una concentración de CO₂ al 5 % en una incubadora de laboratorio a saturación de humedad.

2.1. PASES CELULARES

Las células de la línea PNT2 presentan un crecimiento adherente en la placa de cultivo, formando monocapas celulares. Cuando se observó una confluencia aproximada del 80% en la placa se eliminó el medio y las células se lavaron con 4 ml de PBS libre de cloruro y magnesio (*Phosphate Buffered Saline*, Thermo Fisher Scientific), tras lo cual se añadió tripsina-EDTA (0,25%) (Thermo Fisher Scientific), aplicando 1ml por placa, con el objetivo de levantar las células. Se incubaron las células a 37 °C durante 3 min. Tras este tiempo se comprobó bajo microscopio que las células no presentaban adherencia y se inactivó la tripsina con al menos 3 ml de medio RPMI. Tras esto se recogieron las células y se inocularon en nuevas placas con medio RPMI fresco, realizando un pase. Las células se incubaron en condiciones estándar de cultivo celular durante 30 h.

2.2. TRATAMIENTO CON SIMVASTATINA

Tras la incubación, se retiró el medio de todas las placas. Las destinadas al tratamiento con el fármaco fueron inoculadas con 7 ml de medio RPMI fresco más el volumen correspondiente a una concentración final de 25 μM de simvastatina, *Simvastatin* (Sigma-Aldrich®), calculado según la siguiente fórmula:

$$[\text{simvastatina}]_i \times V_i = [\text{simvastatina}]_f \times V_f$$

En cuanto a las placas a las que no se aplicó el tratamiento con simvastatina (controles), tras la incubación de 30 h se les extrajo el medio, que fue reemplazado por otros 7 ml de medio RPMI fresco.

La recolección de las células se realizó con tripsina-EDTA (0,25%) (Thermo Fisher Scientific) de la misma manera que la descrita anteriormente en el apartado **PASES CELULARES**. Tras este paso, las células fueron transferidas a un tubo de centrifuga Falcon® de 15 ml (Sigma-Aldrich®) y se centrifugaron a 1100 rpm durante 5 min en una centrifuga *Centrifuge 5804/5804 R* con rotor S-4-72 (Eppendorf), tras lo cual se descartó el sobrenadante. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta la realización de la extracción del ARN.

3. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ARN

Para realizar este paso se utilizaron, secuencialmente, los siguientes kits y productos comerciales:

- a. **GeneJET™ RNA Purification Kit** (Thermo Fisher Scientific) para la extracción del ARN total celular.
- b. **DNase I RNase-free (supplied with MnCl2) (1 U/ μL)** (Thermo Fisher Scientific) para eliminar los restos de ADN de las muestras extraídas.
- c. **GeneJET RNA Cleanup and Concentration Kit** (Thermo Fisher Scientific) para la purificación final del ARN.

3.1. EXTRACCIÓN DE ARN

El método llevado a cabo con el kit comercial *GeneJET™ RNA Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific) se basa en la separación de fragmentos de ARN (con longitud mayor a 200 pb) del resto de contenidos celulares mediante el paso de la muestra a través de una membrana de gel de sílice (silicagel) en la que queda retenida el ácido nucleico.

Tras su descongelación y con el objetivo de lisar las células recogidas y liberar su contenido celular estas se resuspendieron en 600 μl de tampón de lisis, *Lysis Buffer*, suplementado con 600 μl de β -mercaptoetanol, *β -mercaptoethanol* (Sigma-Aldrich®). A continuación, se añadieron 360 μl de etanol al 96% y se resuspendió la muestra con ayuda de una micropipeta, obteniéndose así el lisado celular.

Una vez completada la lisis celular, se transfirieron 700 μl del lisado a columnas de purificación de ARN, *GeneJET RNA Purification Column* (Thermo Fisher Scientific), que se acoplaron a sus tubos colectores de 1,5 ml y se centrifugaron en una microcentrífuga *Heracus Biofuge 13* (Marshall Scientific) durante 1 min a 12000 rpm. Tras este paso, se descartó la fracción eluída y se repitió el llenado del tubo colector (y consiguiente centrifugación y descarte del eluído) hasta agotar todo el volumen de lisado del tubo de centrifuga original. A continuación se añadieron 700 μl de tampón de lavado 1, *Wash Buffer 1* (Thermo Fisher Scientific), a la columna y se centrifugó a 1200 rpm durante 1 min. Se descartó el eluído, se añadieron 600 μl del tampón de lavado 2, *Wash Buffer 2* (Thermo Fisher Scientific), a la columna y se centrifugó a 1200 rpm durante 2 min. Tras esta, se descartó la fracción eluída y se volvió a centrifugar la columna acoplada al tubo colector a 1200 rpm durante 1 min. A continuación, se eliminó el tubo colector con el eluído y se colocó la columna en un tubo Eppendorf de 1,5 ml estéril y libre de RNAsa (Eppendorf), se añadieron 50 μl de agua libre de RNAsa (Thermo Fisher Scientific), al centro de la membrana incluida en la columna y se centrifugó a 12000 rpm durante 1 min para eluir el ARN contenido en la columna.

3.2. TRATAMIENTO CON DNAsa

Tras la extracción del ARN, es necesaria la digestión por parte de enzimas DNAsas del ADN que eluyera al tubo colector final del paso anterior y que pudiera interferir en la calidad y utilidad del ARN extraído para pasos posteriores (como la cuantificación de ARN o la PCR cuantitativa).

Para esta técnica se utilizó la enzima DNAsa I, *DNase I RNase-free (supplied with MnCl₂)* (1 U/ μL) (Thermo Fisher Scientific), una enzima endonucleasa que digiere ADN monohebra y bihebra por medio de la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster entre las bases de los nucleótidos en presencia de determinados cationes bivalentes (Figura 5).

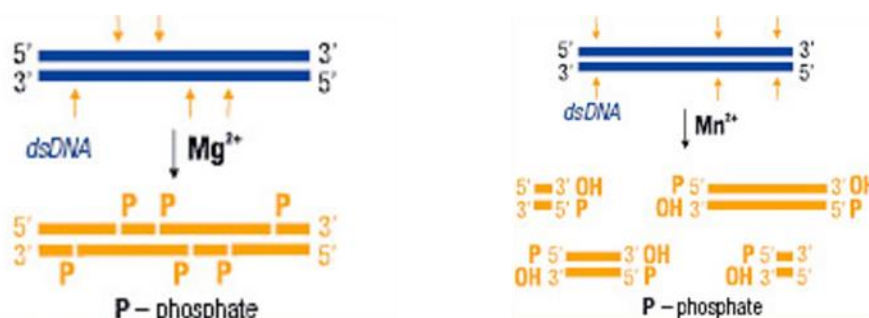


Figura 5. Actividad de la enzima DNAsa I en presencia de cationes Mg^{2+} (izquierda) o Mn^{2+} (derecha). Imagen tomada de: <http://www.thermofisher.com>

Para llevar a cabo este tratamiento, se preparó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml (Eppendorf) la mezcla de la reacción tal y como se indica en la **Tabla 1**, calculando el volumen necesario para cada reactivo en base a la mezcla para una sola muestra.

Tabla 1. Mezcla correspondiente al tratamiento con DNAsa de 1 única muestra. m_f , masa final necesaria para la reacción; m_i , masa inicial de la muestra de ARN total extraído; V_{AGUA} , volumen necesario de agua libre de RNAsa; V_i , volumen necesario de la muestra de ARN; V_f , volumen de la muestra de ARN.

REACTIVO	VOLUMEN (μ l)
Muestra con ARN total	Calculado mediante la fórmula: $m_i \times V_i = m_f \times V_f$
Tampón de reacción con $MgCl_2$ (10X)	5
DNAsa I 1 U/ μ l (libre de RNAsa)	2,5
Agua libre de RNAsa	Hasta completar 50 μ l. Calculado mediante la fórmula: $V_{agua} = 50 - (V_f + 5 + 2,5)$
V_{TOTAL}	50

Una vez realizadas las mezclas para cada muestra en tubos de microcentrífuga de 0,2 ml (Thermo Fisher Scientific), estas se incubaron a 37 °C durante 30 min en un termociclador, *T100™ Thermal Cycler* (Bio-Rad Laboratories Inc.).

3.3. PURIFICACIÓN DE ARN

En este paso se purifican y concentran las muestras de ARN extraído con el fin de separarlas de los restos de la degradación del ADN llevada a cabo en el paso anterior por la actividad de la enzima DNAsa I.

Tras la incubación de las muestras en el termociclador, se añadieron 250 μ l de tampón de unión, *Binding Buffer* (Thermo Fisher Scientific), seguido de 300 μ l de etanol (al 96%), resuspendiendo bien la muestra con ayuda de una micropipeta, con el fin de inactivar la enzima DNAsa remanente en la muestra tras el paso anterior. A continuación, se transfirió la mezcla a una columna de purificación de ARN, *GeneJET RNA Purification Micro Column* (Thermo Fisher Scientific), ensamblándola a su tubo colector de 1,5 ml y centrifugando el conjunto a 14000 g durante unos 30-60 s.

Los pasos a seguir para la purificación fueron los mismos que en el apartado **EXTRACCIÓN DE ARN**. Finalmente, el ARN se eluyó junto con 15 μ l de agua libre de RNAsa (Sigma-Aldrich®) en un tubo Eppendorf de 1,5 ml estéril (Eppendorf).

4. CUANTIFICACIÓN DE ARN

Tras la extracción de ARN y su purificación, se llevaron a cabo dos mediciones del contenido en ARN de la muestra en un espectrofotómetro, *Eppendorf BioPhotometer® D30* (Eppendorf). Para ello, se utilizaron las muestras finales de estos procesos (diluídas en agua libre de RNAsa), añadiendo 1,5 μ l de cada una en la cubeta de metacrilato específica, *Eppendorf μ Cuvette® G1.0* (Eppendorf) para la medición.

Para la correcta cuantificación del ARN contenido en cada muestra se utilizaron dos parámetros distintos:

- a. **Abs260:** con esta medida se obtiene la concentración total de ácido nucleico que posee la muestra, ya que a una longitud de onda de 260 nm el ARN y el ADN muestran su mayor absorbancia.
- b. **Abs260/280:** esta relación de absorbancias se utiliza para medir la pureza del ácido nucleico de la muestra dependiendo del valor que se obtenga (**Tabla 2**). Se basa en la comparación de la capacidad de absorbancia máxima de los ácidos nucleicos con la de las proteínas, a longitudes de onda de 260 y 280 nm, respectivamente.

Tabla 2. Correspondencia entre los valores obtenidos con la relación Abs260/280 y la pureza del ARN (Pinto Labajo, 2015).

VALOR	PUREZA DE MUESTRA
2,0-2,1	Pureza óptima
≥1,8	Pureza aceptable

5. DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ARN PURIFICADAS

Con el objetivo de obtener una concentración de ARN de 1 ng/μl, necesaria para llevar a cabo la técnica de PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-qPCR), las muestras obtenidas de la purificación de ARN tuvieron que ser diluídas en distintas cantidades de agua libre de RNAsa (Sigma-Aldrich®) dependiendo de su concentración.

En primer lugar, se llevó a cabo una conversión de unidades de μg/ml a ng/μl. Tras esto se calculó, mediante la siguiente fórmula, el volumen de muestra purificada necesario para alcanzar la concentración de ARN de 1ng/ μl de manera que el volumen final de de la muestra diluída no permitiese el gasto excesivo de muestra purificada de partida (se tomó como válido el intervalo de volúmenes entre 2-5 μl de muestra de partida):

$$V_i \times [ARN]_i = V_f \times [ARN]_f ;$$
$$; V_i \times [ARN]_i = \sim 400 \mu l \times 1 ng/\mu l$$

El volumen de agua libre de RNAsa (V_{AGUA}) necesaria para la dilución se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$V_{AGUA} = V_i - V_f \quad (\mu l)$$

Una vez realizadas las diluciones en tubos Eppendorf de 1,5 ml (Eppendorf), estas se almacenaron en una cámara de frío a -80 °C.

6. PCR CUANTITATIVA CON TRANSCRIPTASA INVERSA (RT-qPCR)

En este estudio se llevó a cabo una cuantificación relativa de los niveles de ARNm mediante su conversión a ADNc (por acción de la enzima transcriptasa inversa). Tras ese paso, el ADNc se amplifica mediante PCR a la vez que se cuantifica en tiempo real (Schmittgen, 2006; Wong & Medrano, 2005). Para llevar a cabo esta técnica se utilizó el kit **One-step NZYSpeedy RT-qPCR Green kit** (NZYTech). Para ello, en primer lugar se prepara en un tubo Eppendorf de 1,5 ml (Eppendorf) una mezcla que contiene todos los reactivos necesarios para que se lleve a cabo la RT-qPCR, a los que posteriormente se les añade la muestra de ARN extraído (**Tabla 3**).

Tabla 3. Mezcla de reactivos necesarios para la técnica RT-qPCR. Tabla modificada de NZYTech (2017).

REACTIVO	VOLUMEN (μl)
Mezcla One-step NZYSpeedy qPCR Green Master mix (2x) ¹	5
Oligo universal (10 μM)	0,4
Oligo reverso (10 μM)	0,4
Agua libre de RNAsa	2,8
Mezcla NZYRT ²	0,4
Muestra de ARN	1
V_{TOTAL}	10

¹ Esta mezcla contiene: agente intercalante verde fluorescente, dNTPs, agentes estabilizadores, potenciadores y la enzima *Taq* polimerasa.

² Esta mezcla contiene: enzima transcriptasa inversa y un inhibidor de ribonucleasas.

Los oligonucleótidos utilizados para la retrotranscripción y posterior amplificación (**Tabla 4**) fueron previamente diseñados para evitar horquillas y autohibridaciones mediante el programa *NetPrimer* (PREMIER Biosoft) y comprobados por Barreiro Alonso (2018). La longitud de los amplicones generados tras la RT-qPCR se obtuvo utilizando las secuencias de los genes GAPDH (GenBank: AF261085.1) Y Vigilin (GenBank: BC001179.1) y la herramienta de diseño de oligos aportada por la base de datos *Nucleotide* (NCBI).

Tabla 4. Secuencia, características físicas y amplicón resultado de la retrotranscripción y amplificación llevada a cabo con los oligos utilizados en la técnica de RT-qPCR.

GEN	OLIGOS	SECUENCIA	T _m (°C)	AMPLICIÓN
GAPDH	DIRECTO	5'-CCTCCTGCACCACCAACT-3'	57,2	102 pb
	REVERSO	5'-TGGCAGTGATGGCATGGA-3'	57	
Vigilin	DIRECTO	5'-CGTTATTGGGCAGAAAGGAAG-3'	54,6	107 pb
	REVERSO	5'-CCGTGATGGCGATGATGAT-3'	55,1	

Una vez preparadas las mezclas y añadidas en sus respectivos pocillos de una placa de RT-qPCR, esta se centrifuga durante unos segundos a máxima velocidad (centrífuga Allegra® X-12 SERIE, Beckman Coulter), para eliminar posibles burbujas de aire en los pocillos que puedan interferir con los procesos de retrotranscripción y amplificación posteriores. Tras este paso, la placa se introduce en un termociclador, *Eco™ 48 Real Time PCR System* (Illumina®), estableciendo previamente el

programa que se muestra en la **Tabla 5**, para el cual se encuentra optimizado el kit One-step NZYSpeedy RT-qPCR Green kit (NZYTech) utilizado.

Tabla 5. Programa de termociclador aplicado en el experimento control de la técnica de RT-qPCR. Tabla modificada de NZYTech (2017).

PASO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO/ CICLO	CICLOS
Transcripción inversa	50	20 min	1
Activación enzimática de la polimerasa	95	5 min	
Desnaturalización del ADNc	95	5 s	40
Anillamiento de oligos/ Extensión del ADNc	60	30 s	

El ADNc amplificado fue cuantificado (a medida que transcurría la amplificación) mediante el programa *Eco™ Software v4.0.7.0* (Illumina®)

7. TRATAMIENTO DE DATOS

Una vez terminado el proceso de amplificación en el termociclador, los resultados (incluidos en el **Anexo 1.1**) obtenidos fueron analizados mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak & Schmittgen, 2001),. Para ello se establecieron previamente los siguientes parámetros:

- a. Se estableció al **gen GAPDH como gen de control interno** normalizador de los resultados de la amplificación del gen de interés (Vigilin) debido a que su expresión en las células es constitutiva (Livak & Schmittgen, 2001) y sus niveles de expresión no varían en las condiciones de estudio (es decir, sus expresiones no difieren más del 10% entre sí; Zhu *et al.*, 2011).
- b. Los datos obtenidos a partir de las **muestras del tratamiento control se utilizaron como calibrador** para identificar la expresión relativa del gen de interés.

En cuanto al procedimiento de análisis de los resultados, este se llevó a cabo en una hoja de cálculo (Excel) de la siguiente manera:

1. En primer lugar, se calculó la media correspondiente a cada réplica biológica utilizando los datos obtenidos tras la amplificación de cada gen para las tres réplicas técnicas utilizadas. Cada resultado viene expresados en forma de ciclo umbral (Cq), es decir, el número del ciclo de amplificación en la que la cantidad de ADNc obtenido alcanza un umbral fijo:

$$Cq_{RÉPLICAS\ BIOLÓGICAS\ (R.B)} = \frac{\sum Cq_{RÉPLICAS\ TÉCNICAS\ (R.T)}}{3}$$

2. Las medias de cada réplica biológica se agruparon por tratamientos.
3. Para ambos tratamientos, se calculó la diferencia en los ciclos umbral de amplificación para el gen objetivo (Vigilin) y control (GAPDH):

$$\Delta Cq_{TRATAMIENTO} = Cq_{(VGILIN)} - Cq_{(GADPH)}$$

4. A continuación, los datos normalizados anteriores se restaron por tratamientos:

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{SIMVASTATINA} - \Delta Cq_{CONTROL}$$

5. Por último, se calculó el parámetro $2^{-\Delta\Delta Cq}$ que hace referencia a la cantidad de ADNc amplificado del gen Vigilin normalizada al gen de referencia endógena (GAPDH) y relativa al calibrador (control):

$$Cantidad\ de\ ADNc_{VGILIN} = 2^{-\Delta\Delta Cq}$$

Tras estos cálculos, se añadieron a mayores los siguientes estadísticos:

- a. **Estadísticos descriptivos** → Se calculó la **media** y la **desviación típica** de los datos finales de cantidad de ADNc amplificada.
- a. **Estadístico comparativo** → Se aplicó una **prueba t de Student para dos muestras de igual varianza** (Student, 1908) para comprobar si la expresión del gen Vigilin de ambos tratamientos difería significativamente. Para ello se utilizaron como variables los datos normalizados de los dos tratamientos ($\Delta Cq_{CONTROL}$ y $\Delta Cq_{SIMVASTATINA}$) y se asumió que seguían una distribución de tipo Normal y que presentaban varianzas iguales (debido a que las células utilizadas provienen de una misma fuente). El contraste de hipótesis (con un nivel de significación $\alpha = 0.05$) planteado fue el siguiente:

$$\left[\begin{array}{l} H_0: \text{expresión del gen Vigilin no difiere entre tratamientos} \\ H_1: \text{expresión del gen Vigilin difiere entre tratamientos} \end{array} \right.$$

RESULTADOS

1. CULTIVO CELULAR

Se obtuvieron seis placas de un mismo pase 1:6 y se incubaron 30 h en condiciones estándar de cultivo celular (**PASES CELULARES, MATERIAL Y MÉTODOS**). Tras esto, se retiró el medio y se inoculó a tres de ellas RPMI fresco suplementado con una concentración final de 25 μ M de simvastatina (Sigma-Aldrich®). A las otras tres placas se les inoculó únicamente medio RPMI fresco. Posteriormente se incubaron todas las placas en condiciones estándar de cultivo celular (37 °C y 5% de CO₂) durante 48 h.

De esta manera, a partir de este momento se trabajó con dos tratamientos distintos, formado cada uno por tres réplicas biológicas, cuyos códigos se indican en la **Tabla 6**. Estas réplicas se utilizan con el objetivo de calcular una respuesta más precisa (a partir de los resultados del estudio) y de asegurar la reproducibilidad del experimento llevado a cabo.

Tabla 6. Códigos de las réplicas biológicas de cada tratamiento utilizado.

TRATAMIENTO	RÉPLICAS BIOLÓGICAS
CONTROL	C1
	C2
	C3
SIMVASTATINA (25 μ M)	S1
	S2
	S3

Tras la incubación de las células durante 48 h, al observar las placas al microscopio se detectaron cambios aparentes en el crecimiento y adhesión de las células entre las placas control y las tratadas con el fármaco, detectándose mayor muerte celular en estas últimas (**Figura 6**).

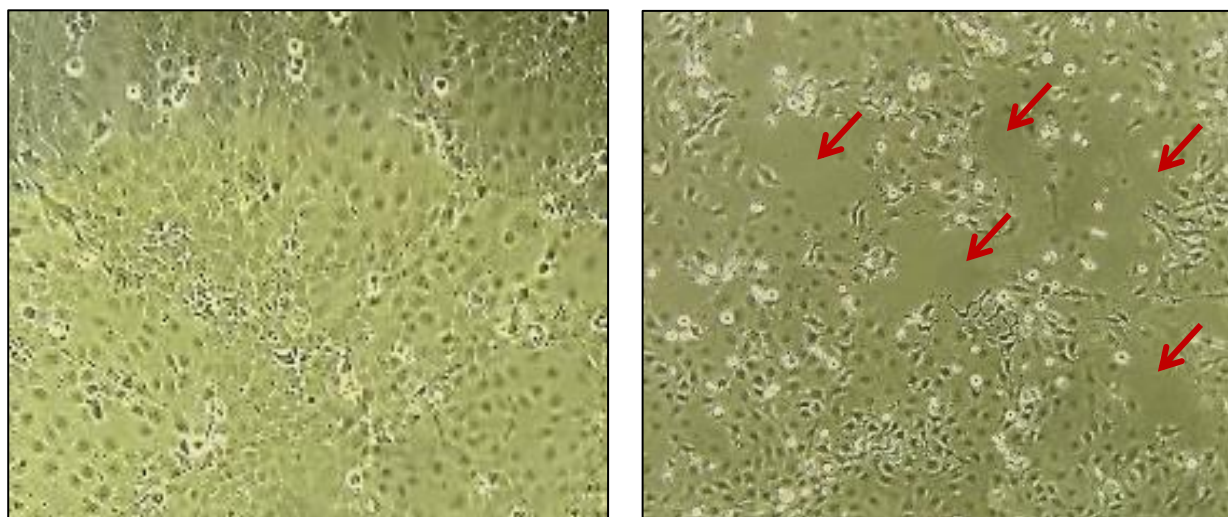


Figura 6. Diferencias entre los cultivos celulares control (izquierda) y tratado con simvastatina (derecha), visualizados al microscopio óptico. Se señalizan con flechas rojas las zonas de la placa en las que no se detecta crecimiento celular. También se detecta menor adhesión en la placa tratada con el fármaco (células suspendidas de color más claro y de forma esférica).

Tras observar las células, estas se recogieron con Tripsina-EDT (Thermo Fisher Scientific) tal y como se indica en el apartado **PASES CELULARES (MATERIALES Y MÉTODOS)** y se almacenaron a -80 °C hasta la extracción de ARN total.

2. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ARN

2.1. EXTRACCIÓN DE ARN

La extracción del ARN de las células cultivadas se llevó a cabo mediante la utilización del kit **GeneJET™ RNA Purification Kit** (Thermo Fisher Scientific, 2014), tal y como se explica en el apartado **EXTRACCIÓN DE ARN (MATERIALES Y MÉTODOS)**. Tras la obtención del ARN total, se cuantificó su concentración y su relación de absorbancias $Abs_{260/280}$ en cada muestra (**Tabla 7**), siguiendo los pasos descritos en **CUANTIFICACIÓN DE ARN (MATERIAL Y MÉTODOS)**. En el caso de las concentraciones, se puede observar una ligera disminución en las muestras tratadas con simvastatina (25 μ M) frente a las muestras control, aspecto que coincide con el hecho de que en las placas de cultivo tratado con simvastatina se observase un menor número de células (**Figura 6**).

Tabla 7. Concentraciones y relación de absorbancias $Abs_{260/280}$ de las muestras de extracción inicial de ARN.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (μ g/ml)	$Abs_{260/280}$
C1	894,8	2,0
C2	1045,2	1,9
C3	1077,3	1,9
S1	145,0	1,9
S2	274,6	2,0
S3	378,2	2,0

2.2. TRATAMIENTO CON DNAsa

Para llevar a cabo la eliminación de restos de ADN remanentes en las muestras de ARN total extraído se llevó a cabo el tratamiento con DNAsa, *DNase I RNase-free (supplied with MnCl₂) (1 U/ μ L)* (Thermo Fisher Scientific, 2016), primero fue necesario calcular el volumen de muestra necesario para añadir a la mezcla de la reacción 1,5 μ g de ARN total extraído (**Tabla 1**). Los volúmenes añadidos se recogen en la **Tabla 9**.

Tabla 8. Mezcla correspondiente al tratamiento con DNAsa de 1 única muestra. m_i , masa de la muestra de ARN; V_{AGUA} , volumen necesario de agua libre de RNAsa; V_f , volumen necesario de la muestra de ARN; V_i , volumen de la muestra de ARN.

REACTIVO	VOLUMEN (μ l)
Muestra con ARN total	Calculado mediante la fórmula: $m_i \times V_i = 1,5 \times V_f$
Tampón de reacción con MgCl ₂ (10X)	5
DNAsa I 1 U/ μ l (libre de RNAsa)	2,5
Agua libre de RNAsa	Hasta completar 50 μ l. Calculado mediante la fórmula: $V_{AGUA} = 50 - (V_f + 5 + 2,5)$
V_{TOTAL}	50

Tabla 9. Volúmenes calculados para cada muestra de los componentes necesarios para la mezcla del tratamiento con DNAsa. Se muestran en color gris los volúmenes de los reactivos que no tuvieron que ser calculados.

MUESTRA	VOLUMEN (μ l)			
	MUESTRA ARN (1,5 μ g)	AGUA LIBRE DE RNAsa	TAMPÓN REACCIÓN CON MgCl ₂ (10X)	DNAsa I (1U/ μ l)
C1	3,0	39,5	5	2,5
C2	1,4	41,1		
C3	1,4	41,1		
S1	10,3	32,2		
S2	5,5	37,0		
S3	3,9	38,5		

Tras la elaboración de las mezclas, estas se traspasaron a tubos de termociclador de 0,2 ml (Thermo Fisher Scientific) y se incubaron en un termociclador, *T100™ Thermal Cycler* (Bio-Rad Laboratories Inc.) para que la DNAsa I llevara a cabo la degradación del ADN remanente en las muestras.

2.3. PURIFICACIÓN DE ARN

Tras el tratamiento con DNAsa I, se llevó a cabo una purificación final de las muestras mediante la utilización del kit ***GeneJET RNA Cleanup and Concentration Kit*** (Thermo Fisher Scientific). Este paso (descrito en el apartado ***PURIFICACIÓN DE ARN, MATERIAL Y MÉTODOS***) permitió purificar y al mismo tiempo concentrar las muestras de ARN extraído en cada muestra, mediante la separación del ARN del resto de la muestra y su recolección final en un tubo Eppendorf de 1,5 ml (Eppendorf). A continuación, se realizó una última cuantificación de la concentración de ARN y de la relación de absorbancias $Abs_{260/280}$ (Tabla 10) siguiendo los pasos indicados en el apartado ***CUANTIFICACIÓN DE ARN (MATERIAL Y MÉTODOS)***. En ella, se puede observar una cierta variabilidad en la concentración de las muestras de ARN, aunque la pureza de las muestras se encuentra en un rango óptimo ($Abs_{260/280} \approx 2$).

Tabla 10. Concentración y relación $Abs_{260/280}$ de las muestras resultado de la extracción de ARN celular y su posterior purificación.

MUESTRAS	CONCENTRACIÓN (μ g/ml)	$Abs_{260/280}$
C1	196,5	2,1
C2	67,8	1,9
C3	39,6	2,0
S1	97,8	2,1
S2	143,0	1,9
S3	116,2	1,9

3. DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ARN PURIFICADAS

Tras el paso de purificación de las muestras de ARN extraídas y de manera previa a la realización de la técnica de RT-qPCR, estas tuvieron que ser diluidas para alcanzar una concentración final de 1 ng/ μ l (necesaria para llevar a cabo el experimento de RT-qPCR). Las concentraciones de ARN purificado y los parámetros necesarios para llevar a cabo esta dilución (cuyo cálculo se indica en el apartado

DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ARN PURIFICADAS, MATERIAL Y MÉTODOS) se muestran en la tabla (Tabla 11).

Tabla 11. Componentes del cálculo de las diluciones de las muestras de ARN purificadas.

MUESTRA	[ARN] _i (ng/ μ l)	V _i (μ l)	V _f (μ l)	V _{agua} (μ l)	[ARN] _f (ng/ μ l)
C1	196,5	2,0	400	398,0	1
C2	67,8	2,9	200	197,1	
C3	39,6	2,5	100	97,5	
S1	97,8	2,0	200	198,0	
S2	143	2,8	400	397,2	
S3	116,2	3,4	400	396,6	

4. PCR CUANTITATIVA CON TRANSCRIPTASA INVERSA

Con el objetivo de estudiar la expresión relativa del gen Vigilín en las muestras control y tratadas con simvastatina (25 μ M) se llevó a cabo una RT-qPCR (siguiendo el procedimiento indicado en el apartado *PCR CUANTITATIVA CON TRANSCRIPTASA INVERSA (RT-qPCR), MATERIAL Y MÉTODOS*). Para ello, se utilizó el kit *One-step NZYSpeedy RT-qPCR Green kit* (NZYTech).

Esta técnica se llevó a cabo en dos partes, primero se realizó una prueba control para determinar si existía contaminación en las muestras y en los reactivos y para testar posibles autohibridaciones en los oligonucleótidos. En segundo lugar se llevó a cabo la cuantificación relativa del ARN extraído y purificado mediante RT-qPCR. El método específico de realización de cada prueba y sus resultados se muestran a continuación:

3.1. CONTROL

La prueba control se realizó con el fin de confirmar que no existía contaminación en las muestras, oligonucleótidos y/o en los reactivos del kit utilizado. Para ello, la prueba control se dividió a su vez en dos partes, que se llevaron a cabo simultáneamente:

1. PRUEBA DE CONTAMINACIÓN DE MUESTRAS

La primera prueba control se llevó a cabo con el fin de determinar si las muestras de ARN extraído (y previamente purificado) contenían restos de ADN de las células, ya que estos últimos darían

lugar a amplificaciones no deseadas en el posterior experimento de RT-qPCR, modificando los resultados del experimento final.

Para esta prueba se preparó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml (Eppendorf) la mezcla de reactivos (Tabla 12) siguiendo las indicaciones del apartado *PCR CUANTITATIVA CON TRANSCRIPTASA INVERSA (RT-qPCR), MATERIAL Y MÉTODOS*. Los oligos añadidos fueron los correspondientes al gen Vigilin (Tabla 1) y se utilizaron todas las réplicas biológicas. La única modificación que se llevó a cabo en esta fue el intercambio de la mezcla NZYRT (que contiene la enzima transcriptasa inversa) por agua libre de RNAsa, evitando así la retrotranscripción del ARN de las muestras. De esta manera, de producirse amplificación, esta sería debida a la acción de la enzima Taq polimerasa sobre moléculas de ADN remanentes en las muestras.

Una vez obtenidas las mezclas, estas se introdujeron en una placa de RT-qPCR (junto con la prueba control siguiente, Figura 1 del Anexo 1.1) y se incubaron en el termociclador, *Eco™ 48 Real Time PCR System* (Illumina®), siguiendo el programa indicado en la Tabla 5.

Tabla 12. Mezcla para una única muestra correspondiente a la prueba control de determinación de contaminación de las muestras. Tabla modificada de NZYTech (2017).

REACTIVO	VOLUMEN (μl)
Mezcla One-step NZYSpeedy qPCR Green Master mix (2x)	5
Oligo universal VIGILIN (10 μM)	0,4
Oligo reverso VIGILIN (10 μM)	0,4
Agua libre de RNAsa	3,2
Muestra de ARN (1 ng/μl)	1
V_{TOTAL}	10

2. PRUEBA DE CONTAMINACIÓN DE REACTIVOS Y OLIGOS

Adicionalmente, con el objetivo de determinar si en los reactivos existía contaminación por ácidos nucleicos y/o si los oligos utilizados producían amplificación por autohibridación, se llevó a cabo una prueba de RT-qPCR (siguiendo las indicaciones incluidas en el apartado *PCR CUANTITATIVA CON TRANSCRIPTASA INVERSA (RT-qPCR), MATERIAL Y MÉTODOS*). En ella, las mezclas preparadas (una por cada par de oligos) no contenían muestra de ARN, por lo que se añadió un volumen equivalente de agua libre de RNAsa a cada una de las mezclas (Tabla 13).

De esta manera, de producirse amplificación, esta sería debida a contaminación de los reactivos y sería conveniente su reemplazo para poder llevar a cabo el experimento final de RT-qPCR.

Tabla 13. Mezcla para una única muestra correspondiente a la prueba control de determinación de contaminación de los reactivos y oligos. Se prepararon dos mezclas como esta, una para cada gen. Tabla modificada de NZYTech (2017).

REACTIVO	VOLUMEN (μl)
Mezcla One-step NZYSpeedy qPCR Green Master mix (2x)	5
Oligo universal (10 μM)	0,4
Oligo reverso (10 μM)	0,4
Agua libre de RNAsa	3,8
Mezcla NZYRT ²	0,4
V_{TOTAL}	10

Una vez obtenidas las mezclas, estas se introdujeron en una placa de RT-qPCR (junto con la prueba control anterior, **Figura 1 del Anexo 1.1**) y se incubaron en el termociclador, *Eco™ 48 Real Time PCR System* (Illumina®), siguiendo el programa indicado en la **Tabla 5**.

Los datos, obtenidos en estas pruebas control, gracias al programa *Eco™ Software v4.0.7.0* (Illumina®), son los siguientes:

- 1. Ausencia de amplificación en todas las muestras de ARN (Tabla 14)**, por lo que se determinó que no existía contaminación con ADN celular residual.

Tabla 14. Resultado de la prueba control para la determinación de contaminación en las muestras de ARN. N/A, amplificación no detectada.

GEN	MUESTRA	Cq
Vigilin	C1	N/A
	C2	N/A
	C3	N/A
	S1	N/A
	S2	N/A
	S3	N/A

- 2. Ausencia de amplificación de oligos y/o reactivos (Tabla 15)**, por lo que se determinó que no existía contaminación de los reactivos del kit o anillamiento entre los oligos para cada gen.

Tabla 15. Resultado de la prueba control para la determinación de contaminación de los reactivos y oligos. N/A, amplificación no detectada.

MUESTRA	OLIGOS	Cq
BLANCO	B _{VIGILIN}	N/A
	B _{GAPDH}	N/A

3.2. ENSAYO DE RT-qPCR

Con el fin de determinar los niveles relativos de expresión del gen Vigilin en ambos tratamientos (control y adición de simvastatina) se llevó a cabo una PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-qPCR). Para ello, se utilizaron tres réplicas técnicas (**Tabla 16**) de cada una de las réplicas biológicas indicadas en el apartado

CULTIVO CELULAR (RESULTADOS). Estas fueron utilizadas con el objetivo de determinar la variabilidad de la técnica del experimentador.

Tabla 16. Código de las réplicas biológicas y técnicas de cada tratamiento.

TRATAMIENTO	RÉPLICAS BIOLÓGICAS	RÉPLICAS TÉCNICAS
CONTROL	C1	C1 ₁ , C1 ₂ , C1 ₃
	C2	C2 ₁ , C2 ₂ , C2 ₃
	C3	C3 ₁ , C3 ₂ , C3 ₃
SIMVASTATINA (25µM)	S1	S1 ₁ , S1 ₂ , S1 ₃
	S2	S2 ₁ , S2 ₂ , S2 ₃
	S3	S3 ₁ , S3 ₂ , S3 ₃

Para llevar a cabo el ensayo de expresión se prepararon dos mezclas en sendos tubos Eppendorf de 1,5 ml (Eppendorf) con el volumen total de los reactivos necesarios para llevar a cabo la técnica de RT- qPCR para cada una de las muestras, una para el ensayo de expresión del gen GAPDH y otra para el gen Vigilin. Para ello se calculó el volumen necesario para cada reactivo en base a la mezcla para una sola muestra (**Tabla 17**).

Tabla 17. Mezcla de reactivos necesarios para la técnica de RT-qPCR. Tabla modificada de NZYTech (2017).

REACTIVO	VOLUMEN (µl)
Mezcla One-step NZYSpeedy qPCR Green Master mix (2x) ¹	5
Oligo universal (10 µM)	0,4
Oligo reverso (10 µM)	0,4
Agua libre de RNAsa	2,8
Mezcla NZYRT ²	0,4
Muestra diluída de ARN (1ng/µl)	1
V _{TOTAL}	10

Una vez introducidas las mezclas para cada muestra en su pocillo correspondiente de la placa de RT-qPCR para cada gen (**Figura 2** y **Figura 3** del **Anexo 1.2**), estas se incubaron en el termociclador *Eco™ 48 Real Time PCR System* (Illumina®) según el programa optimizado de RT-qPCR (**Tabla 5**).

Los datos, resultado de la cuantificación del ADNc amplificado para cada gen (obtenidos gracias al programa Eco™ Software v4.0.7.0, Illumina®), son los siguientes:

- 1. Gen GAPDH (Tabla 1 del Anexo 1.2.1):** se observan ciertas diferencias entre la amplificación de las muestras control y las muestras tratadas con simvastatina (25 µM), siendo los valores de esta última ligeramente más bajos. En general, los datos medios de ciclo umbral (Cq) de las réplicas dentro de cada tratamiento no presentan gran variación, acercándose a 20 en el caso de las muestras control y a 19 en el caso de las tratadas con simvastatina. No obstante, los resultados de las muestras correspondientes a las réplicas biológicas control 1 (C1) y simvastatina 3 (S3) muestran una gran variabilidad con respecto a los demás datos correspondientes al mismo tratamiento, probablemente producidos por fallos del experimentador durante el proceso de introducción de las muestras en la placa de RT-qPCR, por lo que deberían repetirse.
- 2. Gen Vigilin (Tabla 2 del Anexo 1.2.2):** en general, se observan diferencias entre la amplificación de las muestras control y las muestras tratadas con simvastatina (25 µM), siendo los valores medios de ciclo umbral (Cq) próximos a 22 en el caso de las muestras control y a 21 en el caso de las tratadas con simvastatina (25 µM). Además, se detecta una alta variabilidad en algunos resultados, como por ejemplo en el caso del tratamiento control, cuyos valores de ciclo umbral varían en gran medida, además de la presencia del valor atípico de la primera réplica técnica del control 3 (C3₁), muy superior a los obtenidos en las demás muestras (Cq= 25,251). Lo mismo sucede con el resultado correspondiente a la tercera réplica técnica del tratamiento con simvastatina 1 (S1₃), la cual presenta un valor de ciclo umbral menor que las demás réplicas del mismo tratamiento (Cq= 19,522). Como también ocurre en el caso del gen GAPDH, dichos datos atípicos probablemente hayan sido debidos a una mala praxis por parte del experimentador al realizar la inoculación de la mezcla o las muestras de ARN en la placa de RT-qPCR, por lo que para obtener resultados robustos en la prueba estadística sería conveniente repetir la el experimento de RT-qPCR.

5. CÁLCULOS

Como ya se comentó anteriormente (apartado *CÁLCULOS, MATERIAL Y MÉTODOS*), los resultados obtenidos en el segundo ensayo de RT-qPCR fueron analizados mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak & Schmittgen, 2001), con el propósito de determinar cambios estadísticamente significativos en la expresión del gen Vigilin entre las muestras de ambos tratamientos.

En la observación de datos previa a la prueba estadística se encontraron diferencias en la expresión del gen Vigilin entre réplicas biológicas (Tabla 2 del Anexo 1.2.2). De hecho, el valor medio de la cantidad de ADNc normalizada final calculada (Tabla 18) indica que la expresión de este gen fue mayor en las muestras tratadas con simvastatina (25 µM). Sin embargo, la alta variabilidad de los datos de expresión del gen (expresada en forma de un alto valor de desviación típica) entre las distintas réplicas biológicas desestima la validez del promedio calculado.

Tabla 18. Tratamiento de los datos resultado del ensayo de RT-qPCR para ambos genes y estadísticos descriptivos calculados mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

TRATAMIENTO	GEN	Cq _{R.B}	$\Delta Cq_{SIMVASTATINA}$	$\Delta Cq_{CONTROL}$	$\Delta\Delta Cq$	$2^{-\Delta\Delta Cq}$	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
SIMVASTATINA (25 μ M)	Vigilin	19,9	0,8	2,2	-1,4	2,6	1,3	1,2
		20,6	1,5	1,4	0,1	0,9		
		20,8	4,3	2,6	1,7	0,3		
	GAPDH	19,0						
		19,0						
		16,4						
CONTROL	Vigilin	20,8						
		21,5						
		23,4						
	GAPDH	18,6						
		20,1						
		20,8						

Cuando se llevó a cabo el análisis estadístico de los resultados mediante la prueba t de Student (siguiendo el procedimiento indicado en el apartado **CÁLCULOS, MATERIAL Y MÉTODOS**), este indicó un valor $p=0.896$. Como este es mayor que el valor de significación $\alpha=0.05$ se consideró que el test no significativo, por lo que se acepta la hipótesis nula, que indica que la expresión del gen Vigilin no muestra diferencias significativas entre las células control y las tratadas con simvastatina (Tabla 19).

Tabla 19. Parámetros estadísticos y prueba t de Student aplicada a los datos de expresión de cada gen normalizados para cada tratamiento.

PRUEBA T	VARIABLES	$\Delta Cq_{SIMVASTATINA}$ y $\Delta Cq_{CONTROL}$
	ESTADÍSTICO T	0,140
	P valor ($T \leq T$) DOS COLAS	0,896

En cuanto al elevado valor de desviación estándar obtenido a partir de las cantidades normalizadas de ADNc para cada réplica biológica (Tabla 18), este probablemente sea debido a errores experimentales (mala praxis del experimentador), ya que como se puede observar en la Tabla 3 del Anexo 2.1, la varianza de las muestras tratadas con simvastatina (25 μ M) presentan altos valores, lo que en última instancia parece provenir de los datos del ensayo de RT-qPCR obtenidos para el gen GAPDH para las réplicas técnicas correspondientes al tratamiento simvastatina 3 (muestras con el código "S3" en la Tabla 1 del Anexo 1.2.1). Estas muestras tuvieron que ser repetidas luego de no obtenerse amplificación en el primer ensayo de RT-PCR, por lo que aparecen incluidas también en el esquema de la placa de RT-qPCR para el gen Vigilin (Figura 3 del Anexo 1.2.2).

DISCUSIÓN

En un estudio anterior sobre el efecto de la simvastatina en células epiteliales de próstata (sanas y cancerosas) llevado a cabo por Murtola *et al.* (2011) se concluyó que tras un tratamiento de 7 días, las dosis terapéuticas de este fármaco (0,1 μM) reducían eficazmente el crecimiento celular, mientras que dosis altas de simvastatina (10 μM) inhibían por completo el crecimiento de células sanas y en un 50-70% el de células cancerosas. En el presente estudio si bien la concentración del fármaco es ligeramente mayor a las utilizadas por Murtola *et al.* (2011), el tiempo de tratamiento fue mucho menor (únicamente de 2 días). No obstante, aun pasado este tiempo se observaron cambios aparentes en el crecimiento celular los cultivos de las células tratadas respecto de las no tratadas (**Figura 6**), por lo que no se descarta que con un tratamiento de mayor duración las células tratadas se vieran afectadas en mayor medida, siendo significativa la diferencia entre tratamientos.

En cuanto a la interacción entre la simvastatina y el gen Vigilín, pocas referencias se han encontrado en la literatura más allá de pruebas *in vivo* en ratas y conejos con otras proteínas de unión a HDL (HB₁ y HB₂, presentes en células hepáticas), que indicaban que los genes que las codifican se ven regulados negativamente (en un 50-60%) por la presencia de simvastatina (Fidge, 1999). Aunque dicho efecto no se testó en el gen Vigilín (o HBP), este tendría sentido teniendo en cuenta los mecanismos de acción tanto de la proteína que codifica este gen como de la simvastatina (y estatinas en general), ya que estas últimas, al inhibir la acción de la enzima *HMG-CoA reductasa*, provocan, en última instancia, la reducción de la síntesis de colesterol y derivados isoprenoides (Papadopoulos *et al.*, 2011). Como estos dos productos son, a su vez, reguladores positivos de la expresión del gen Vigilín (Fidge, 1999), cabe suponer que las estatinas disminuirán (o mantendrán en niveles basales estables) su expresión.

Por lo tanto, según los datos obtenidos, se puede afirmar que el tratamiento no provoca cambios significativos en los niveles de expresión del gen Vigilín de células sanas de próstata PNT2 en presencia del fármaco simvastatina (25 μM), aunque dada la gran variabilidad de los resultados obtenidos, sería conveniente repetir el estudio ampliando el tamaño muestral, para comprobar el resultado. Por otra parte, sería interesante realizar el mismo ensayo con otras concentraciones de simvastatina y tiempos de exposición al fármaco que hayan sido previamente testadas en otras líneas celulares, para determinar si los efectos de este fármaco en células sanas PNT2 son dependientes de su concentración o, por el contrario, no afectan de esta manera a estas células.

CONCLUSIONES

Mediante la realización de la técnica de PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-qPCR) se determinó si la adición de simvastatina (25 μ M) a cultivos de células sanas de próstata PNT2 afectaba significativamente a la expresión del gen Vigilín (o HDLBP). Los datos obtenidos, a pesar de mostrar una gran variabilidad, indican que esta expresión no difiere entre las células tratadas con simvastatina y las no tratadas. Posteriores estudios con distintas líneas celulares y concentraciones del fármaco podrán arrojar nuevos resultados sobre los efectos de la simvastatina sobre las células de próstata sanas y cancerosas.

CONCLUSIONS

By performing the technique of quantitative PCR with reverse transcriptase (RT-qPCR) it was determined whether the addition of simvastatin (25 μ M) to cultures of healthy prostate PNT2 cells significantly affected the expression of the Vigilín (or HDLBP) gene. The data obtained, despite showing great variability, indicate that this expression does not differ between the cells treated with simvastatin and those not treated. Subsequent studies with different cell lines and drug concentrations may yield new results on the effects of simvastatin on healthy and cancerous prostate cells.

CONCLUSIÓNS

Mediante a realización da técnica de PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-qPCR) determinouse se a adición de simvastatina (25 μ M) a cultivos de células sanas de próstata PNT2 afectaba significativamente á expresión do xen Vigilín (o HDLBP). Os datos obtidos, a pesar de mostrar una gran variabilidade, indican que a expresión do xen non difire entre as células tratadas con simvastatina e as non tratadas. Posteriores estudos con distintas líneas celulares e concentracións do fármaco poderán aportar novos resultados sobre os efectos da simvastatina sobre as células de próstata sanas e cancerosas.

BIBLIOGRAFÍA

- American Cancer Society. (2016). Prostate cancer risk factors. Recuperado de <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>
- Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). (2018). ¿Qué es el cáncer de próstata? Recuperado de <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-prostata/que-es-cancer-prostata>
- Babcook, M. A., Joshi, A., Montellano, J. A., Shankar, E., & Gupta, S. (2016). Statin use in prostate cancer: An update. *Nutrition and Metabolic Insights*, 9, 43–50. doi:10.4137/NMI.S38362
- Barreiro-Alonso, A. (2018). *Interactome of Ixr1, HMGB1 and HMGB2 proteins in relation to their cellular functions* (tesis doctoral). Universidade da Coruña, A Coruña. Recuperado de <http://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/20216>
- Cancer Research UK. (2018). Prostate cancer incidence statistics. Recuperado de <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/prostate-cancer/incidence>
- Caro Maldonado, A., Camacho, L., Zabala Letona, A., Torrano, V., Fernández-Ruiz, S., Zamacola Bascaran, K., ... Carracedo, A. (2018). Low-dose statin treatment increases prostate cancer aggressiveness. *Oncotarget*, 9(2), 1494–1504. doi:10.18632/oncotarget.22217
- Cheng, M. H. K., & Jansen, R. P. (2017). A jack of all trades: the RNA-binding protein vigilin. *WIREs RNA*, 8(6), e1448. doi:10.1002/wrna.1448
- Dawe, D. E., Ye, X., Czaykowski, P., Jassal, D., Singh, H., Skarsgard, D., ... Mahmud, S. M. (2018). The effect of statin use on the incidence of prostate cancer: A population-based nested case-control study. *International Journal of Cancer*, 143(1), 190–198. doi:10.1002/ijc.31295
- De Marzo, A. M., Nakai, Y., & Nelson, W. G. (2007). Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 25(5), 398–400. doi:10.1016/j.urolonc.2007.05.007
- Expression of HDLBP in cancer. (2017). En *The Human Protein Atlas* (version 18). Recuperado de <https://v18.proteinatlas.org/ENSG00000115677-HDLBP/pathology>
- Fidge, N. H. (1999). High density lipoprotein receptors, binding proteins, and ligands. *Journal of Lipid Research*, 40(2), 187–201. Recuperado de <http://www.jlr.org/content/40/2/187.full>
- HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC). (2018). HDLBP. Recuperado de https://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc_id=HGNC:4857
- Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG). (2016). How does the prostate work? Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0072475>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- MedlinePlus. (2017). Simvastatina. Recuperado de <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/meds/a692030-es.html>
- Mendoza, L. (2013). *Cáncer de próstata: Información actualizada sobre el cáncer de próstata y sobre las opciones terapéuticas*. Bloomington, IN: AuthorHouse.
- Murtola, T. J., Syväälä, H., Pennanen, P., Bläuer, M., Solakivi, T., Ylikomi, T., & Tammela, T. L. J. (2011). Comparative effects of high and low-dose simvastatin on prostate epithelial cells: The role of LDL. *European Journal of Pharmacology*, 673(1-3), 96–100. doi:10.1016/j.ejphar.2011.10.022
- National Cancer Institute (NCI). (2018). Cancer stat facts: Prostate cancer. Recuperado de <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html>

- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2018). *Nucleotide* [Base de datos]. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>
- NZYTech. (2017). One-step NZYSpeedy RT-qPCR Green kit. Recuperado de <https://www.nzytech.com/products-services/one-step-rt-qpcr-kits/mb346>
- Papadopoulos, G., Delakas, D., Nakopoulou, L., & Kassimatis, T. (2011). Statins and prostate cancer: Molecular and clinical aspects. *European Journal of Cancer*, 47(6), 819–830. doi:10.1016/j.ejca.2011.01.005
- Pinto Labajo, R. (2015). *Controles de calidad de ácidos nucleicos*. Comunicación presentada en el VI Congreso Red Nacional de Biobancos, Lleida, España. Recuperado de <http://www.fundacio.udl.cat/biobancos>
- Rodríguez Perea, A. L., Montoya Guarín, C. J., & Velilla Hernández, P. A. (2011). Actividad inmunomoduladora de las estatinas y su efecto potencial sobre las células T reguladoras FOXP3⁺. *Iatreia*, 24(3), 287–298. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180522550007>
- Schmittgen, T. D. (2006). Quantitative gene expression by real-time PCR: a complete protocol. In M. T. Dorak (Ed.), *Real-time PCR* (pp. 127–137). London: Taylor & Francis. doi:10.4324/9780203967317
- Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). (2018a). *Las cifras del cáncer en España* [Comunicado de prensa]. Recuperado de <https://www.seom.org>
- Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). (2018b). *España a la cabeza de diagnósticos de cáncer en Europa* [Comunicado de prensa]. Recuperado de <https://www.seom.org>
- Student. (1908). The probable error of a mean. *Biometrika*, 6(1), 1–25. doi:10.2307/2331554
- Thermo Fisher Scientific. (2012). *Thermo Scientific GeneJET RNA Cleanup and Concentration Micro Kit: #K0841, #K0842: Product information*. Recuperado de <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0841>
- Thermo Fisher Scientific. (2014). *Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit: #K0731, #K0732: Product information*. Recuperado de <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0731>
- Thermo Fisher Scientific. (2016). *DNase I, RNase-free: Product information*. Recuperado de <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EN0525>
- Walker, K., & Olson, M. F. (2005). Targeting Ras and Rho GTPases as opportunities for cancer therapeutics. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15(1), 62–68. doi:10.1016/j.gde.2004.11.001
- Wong, M. C. S., Goggins, W. B., Wang, H. H. X., Fung, F. D. H., Leung, C., Wong, S. Y. S., ... Sung, J. J. Y. (2016). Global incidence and mortality for prostate cancer: Analysis of temporal patterns and trends in 36 countries. *European Urology*, 70(5), 862–874. doi:10.1016/j.eururo.2016.05.043
- Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75–85. doi:10.2144/05391RV01
- Yang, W. L., Wei, L., Huang, W. Q., Li, R., Shen, W. Y., Liu, J. Y., ... Qin, Y. (2014). Vigilin is overexpressed in hepatocellular carcinoma and is required for HCC cell proliferation and tumor growth. *Oncology Reports*, 31(5), 2328–2334. doi:10.3892/or.2014.3111
- Zhu, L. H., Meng, H., Duan, X. J., Xu, G. Q., Zhang, J., & Gong, D. Q. (2011). Gene expression profile in the liver tissue of geese after overfeeding. *Poultry Science*, 90(1), 107–117. doi:10.3382/ps.2009-00616

ANEXO

1. PLACAS Y DATOS RESULTADO DE LA RT-QPCR

1.1. PRUEBA CONTROL

	1	2	3	4	5	6	7	8
A								
B	C1	C2	C3	S1	S2	S3	B _{VIGILIN}	B _{GAPDH}
C								
D								
E								
F								

Figura 1. Esquema de la posición de las muestras del ensayo control de RT-qPCR en la placa utilizada. C, muestra control; S, muestra de tratamiento con simvastatina (25 μ M); B_{GAPDH}, blanco para los oligos del gen GAPDH (color rojo); B_{VIGILIN}, blanco para los oligos del gen Vigilin (color verde).

1.2. RT-qPCR

1.2.1. GEN GAPDH

	1	2	3	4	5	6	7	8
A								
B								
C			C1	C1	C1	C2	C2	C2
D	C3	C3	C3	S1	S1	S1	S2	S2
E	S2	S3	S3	S3				
F								

Figura 2. Esquema de la posición de cada muestra en los pocillos de la placa de RT-qPCR utilizada para el ensayo de expresión del gen GAPDH (color rojo).

Tabla 1. Valores de ciclo umbral (Cq) de expresión del gen GAPDH para cada muestra utilizada en el ensayo de RT-qPCR.

MUESTRAS		Cq
CONTROL	C1 ₁	17,8
	C1 ₂	18,9
	C1 ₃	19,0
	C2 ₁	20,2
	C2 ₂	20,0
	C2 ₃	20,2
	C3 ₁	20,7
	C3 ₂	20,9
	C3 ₃	20,8
SINVASTATINA (25 μM)	S1 ₁	19,0
	S1 ₂	19,0
	S1 ₃	19,0
	S2 ₁	18,7
	S2 ₂	19,3
	S2 ₃	19,1
	S3 ₁	16,7
	S3 ₂	16,3
	S3 ₃	16,3

1.2.2. GEN VIGILIN

	1	2	3	4	5	6	7	8
A								
B								
C			C1	C1	C1	C2	C2	C2
D	C3	C3	C3	S1	S1	S1	S2	S2
E	S2	S3	S3	S3	S3	S3	S3	
F								

Figura 3. Esquema de la posición de cada muestra en los pocillos de la placa de RT-qPCR utilizada para el ensayo de expresión del gen Vigilin (color verde). Aparecen adicionalmente tres muestras repetidas para GAPDH (color rojo).

Tabla 2. Valores de ciclo umbral (Cq) de expresión del gen Vigilin para cada muestra utilizada en el ensayo de RT-qPCR.

MUESTRAS		Cq _{R.T}
CONTROL	C1 ₁	20,8
	C1 ₂	20,8
	C1 ₃	20,8
	C2 ₁	21,1
	C2 ₂	21,7
	C2 ₃	21,9
	C3 ₁	25,2
	C3 ₂	22,4
	C3 ₃	22,5
SINVASTATINA (25 μM)	S1 ₁	20,0
	S1 ₂	20,0
	S1 ₃	19,5
	S2 ₁	20,8
	S2 ₂	20,3
	S2 ₃	20,6
	S3 ₁	20,8
	S3 ₂	20,7
	S3 ₃	20,8

2. ANÁLISIS DE RESULTADOS

2.1. CÁLCULOS ESTADÍSTICOS

Tabla 3. Parámetros estadísticos y prueba de t Student realizado a los resultados del método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ para las muestras control y las tratadas con simvastatina (25 μM).

PARÁMETROS	VARIABLES	
	SINVASTATINA	CONTROL
Media	2,2	2,1
Varianza	3,4	0,4
Tamaño muestral	3	3
Datos (ΔCq)	0,8	2,2
	1,5	1,4
	4,3	2,6
PRUEBA T	Grados de libertad	4
	Estadístico t	0,1
	P(T≤t) dos colas	0,9

3. ABREVIATURAS

$2^{-\Delta\Delta C_T}$	Cantidad de ADNc objetivo amplificado
[reactivo] _f	Concentración de reactivo final
[reactivo] _i	Concentración de reactivo inicial
°C	Grados centígrados
α	Nivel de significación de la prueba estadística
ΔC_q	Ciclo umbral normalizado
$\Delta\Delta C_q$	Ciclo umbral normalizado relativo al calibrador
Abs ₂₆₀	Absorbancia a 260 nm de longitud de onda
Abs _{260/280}	Relación entre absorbancias a 260 nm y 280 nm de longitud de onda
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
CP	Cáncer de próstata
Cq /Ct	Ciclo umbral de amplificación
Cq _{R.B}	Ciclo umbral de amplificación de la réplica biológica
Cq _{R.T}	Ciclo umbral de amplificación de la réplica técnica
DHT	Dihidrotestosterona
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EE.UU.	Estados Unidos de América
FBS	Suero bovino fetal
g	Aceleración de la gravedad
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
h	Horas
H ₀	Hipótesis nula
H ₁	Hipótesis alternativa
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
LDL	<i>Low density lipoproteins</i> (lipoproteínas de baja densidad)

HDL	<i>High density lipoproteins</i> (lipoproteínas de alta densidad)
min	Minutos
ml	Mililitros
nm	Nanómetros
ng	Nanogramo
µg	Microgramo
µl	Microlitros
µM	Micromolar
oligo	oligonucleótido
p (valor)	Probabilidad del estadístico utilizado de ser posible bajo la hipótesis nula.
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real con transcriptasa inversa
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
s	segundos
T _m	Temperatura de fusión
U	Unidad de masa atómica
V	Volumen
V _f	Volumen final
V _i	Volumen inicial

