



UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

“Validación de genes de referencia para muestras de carcinoma renal del Banco de Tejidos Tumorales del INEN mediante RT-qPCR”

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

AUTOR(A)

Monge Pimentel, Claudia Lucero

(ORCID: 0000-0002-1215-5857)

ASESOR(A)

Cruz Neyra, Lidia Luz

(ORCID: 0000-0003-3902-4280)

Lima, Perú

2022

Metadatos Complementarios

Datos de autor(a):

Autor(a): Monge Pimentel, Claudia Lucero

Tipo de documento de identidad: DNI

Número de documento de identidad: 73109961

Código ORCID: 0000-0002-1215-5857

Datos del(a) Asesor(a):

Asesor(a): Cruz Neyra, Lidia Luz

Tipo de documento de identidad: DNI

Número de documento de identidad: 08406252

Código ORCID: 0000-0003-3902-4280

Datos de los Miembros del Jurado:

PRESIDENTE: Madrid Ibarra de Mejía, Flor de María

DNI: 07222631

ORCID: 0000-0002-4041-2718

MIEMBRO: Guerra Santa Cruz, Alcides

DNI: 28260663

ORCID: 0000-0002-5130-8190

MIEMBRO: Gonzales Molfino, Hugo Mauricio

DNI: 10252143

ORCID: 0000-0003-4320-2078

Datos de la investigación:

Campo del conocimiento OCDE: 1.06.07

Código del Programa: 511206

*A mis padres Carmen y Milton, quienes son
mi mejor ejemplo de esfuerzo y dedicación,
A mi hermano Diego por estar siempre
conmigo.*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Sandro Casavilca, Jefe del Banco de Tejidos Tumorales (BTT) del INEN, por confiar en mí, permitirme realizar mi tesis en su laboratorio y por su apoyo así como el de todo el equipo.

Al Dr. Stéphane Bertani, mi más profundo agradecimiento por todo el apoyo, motivación y las oportunidades que me ayuda a conseguir para el desarrollo de mi carrera profesional, por darme acceso al uso de los equipos necesarios para el desarrollo de este trabajo.

Al Mg. Juan José Contreras por su asesoramiento, ayuda, amistad, tiempo y paciencia a lo largo de la realización de esta tesis.

Al Dr. Juan Pablo Cerapio, por la amistad, consejos y apoyo constante en mi crecimiento profesional.

A mis queridos amigos del equipo del Banco de Tejidos Tumorales:

Macarena Farias, Mauricio Ramal, Rudy Liendo, Karina Cancino, Danny Córdova y Brayan Félix por la amistad, los buenos momentos y las enseñanzas que recibí desde el primer día en el BTT.

A mi asesora, la Dra. Lidia Cruz Neyra, por su ayuda durante el desarrollo de esta tesis

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo la validación de genes de referencia (GR) en muestras de carcinoma renal de células claras (CRCC) mediante la Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN).

Se evaluó la expresión de 11 genes de referencia candidatos previamente reportados en la bibliografía en otras poblaciones: GAPDH, GUSB, RPL13, TBP, HMBS, PPIA, HPRT1, ACTB, B2M, RPN1, y RNA18S mediante RT-qPCR en muestras tumorales y no tumorales de 21 pacientes del INEN con diagnóstico patológico de CR de células claras utilizando el software geNorm. Además, para presentar la importancia de la selección adecuada de genes de referencia, la expresión relativa de los genes de interés TP53 y EGFR fue calculada con los genes de referencia validados usando el método Delta-delta Ct.

El análisis de la expresión de los genes candidatos permitió determinar que, entre los genes evaluados, TBP, GUSB y HMBS presentaron estabilidad alta (valor geNorm $M \leq 0.5$) tanto en muestras tumorales como no tumorales. El cálculo de la expresión relativa de TP53 y EGFR resultó en una expresión significativamente más elevada en las muestras tumorales en comparación a las no tumorales para ambos genes.

En conclusión, los genes TBP, GUSB y HMBS son válidos como genes de referencia para la normalización de genes de interés en estudios de expresión génica del CR de células claras en la población peruana.

Palabras clave: Carcinoma renal, Genes de referencia, RT-qPCR.

ABSTRACT

The present study aimed to validate reference genes (GR) in clear cell renal carcinoma (CRCC) samples from the National Institute of Neoplastic Diseases (INEN) by means of the real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR).

The expression of 11 candidate reference genes previously reported in the literature was evaluated in other populations: GAPDH, GUSB, RPL13, TBP, HMBS, PPIA, HPRT1, ACTB, B2M, RPN1, and RNA18S by RT-qPCR in tumor samples and not tumors of 21 INEN patients with a pathological diagnosis of clear cell RC. Furthermore, to present the importance of proper selection of reference genes, the expression of the TP53 and EGFR genes of interest was normalized with the validated reference genes.

The expression analysis of the candidate genes by the geNorm software made it possible to determine that, among the evaluated genes, TBP, GUSB and HMBS presented high stability (geNorm M value ≤ 0.5) in both tumor and non-tumor samples. After normalization of the expression of TP53 and EGFR, a higher amplification was observed in tumor samples compared to non-tumor samples for both genes.

In conclusion, this study validated that the use of the reference genes TBP, GUSB and HMBS are suitable as factors for normalizing the expression of genes of interest in gene expression studies of clear cell CR in the Peruvian population.

Keywords: Reference genes, Renal carcinoma, RT-qPCR.

ABREVIACIONES

μL --- Microlitros

μm --- Micrómetro Micras

ADN --- Acido desoxirribonucleico

ADNc --- ADN complementario

ARN --- Ácido ribonucleico

ARNm --- ARN mensajero

B2M --- Microglobulina β_2

CA9 --- Anhidrasa carbónica IX

CRCC --- Carcinoma renal de células claras

dNTP --- Desoxirribonucleótido trifosfato

EDTA --- Ácido etilendiaminotetraacético

EGFR --- Receptor del factor de crecimiento epidérmico

g --- Gravedades

GAPDH --- Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GUSB --- Beta-glucuronidasa

HMBS --- Hidroximetilbilanosintasa

MKI67 --- Antígeno KI-67

OCT --- Resina criopreservante

PCR --- Reacción en cadena de la polimerasa

PPIA ---Peptidilprolilisomerasa A

qPCR --- PCR cuantitativa

RNA18S --- ARN ribosomal 18s

RNAsa --- Ribonucleasa

RPL13 --- Proteína ribosómica L13

RPN1 --- Proteína glicosiltransferasa subunidad 1

RT-qPCR --- PCR en tiempo real con transcripción inversa

TAE --- Tris, acetato y EDTA

TBP --- Proteína de unión a región TATA

TP53 --- Proteina tumoral p53

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. Planteamiento del problema	13
1.2. Justificación	14
1.3. Objetivos.....	14
1.3.1. Objetivo general	14
1.3.2. Objetivos específicos.....	14
2. MARCO TEORICO	15
2.1. PCR.....	15
2.2. RT-qPCR	15
2.2.1. Tipos de cuantificación	17
2.2.1.1. Cuantificación absoluta.....	17
2.2.1.2. Cuantificación relativa.....	17
2.2.1.2.1. Delta-Delta Ct.....	17
2.2.2. Genes de referencia	18
2.2.2.1. Análisis de la expresión de genes de referencia	19
2.2.2.1.1. GeNorm.....	19
2.3. Carcinoma renal.....	20
2.3.1. Subtipo células claras.....	21
3. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	21
4. LUGAR DE EJECUCIÓN.....	24
5. HIPÓTESIS.....	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
6.1. Diseño metodológico	24
6.2. Población y muestras	25
6.3. Operacionalización de variables	25
6.4. Procedimiento	25
6.4.1. Selección de muestras	25
6.4.2. Verificación del diagnóstico y estado de las muestras	26

6.4.3.	Diseño de cebadores.....	26
6.4.4.	Extracción de ARN	26
6.4.5.	Síntesis de ADNc	27
6.4.6.	PCR de gradiente de temperaturas para los cebadores.....	28
6.4.7.	Análisis de las curvas de fusión	28
6.4.8.	Ensayos de expresión de los genes de referencia candidatos	28
6.5.	Técnicas para el procesamiento de la información	30
6.6.	Consideraciones éticas	30
7.	RESULTADOS.....	31
7.1.	Verificación del diagnóstico y estado de las muestras	31
7.2.	Diseño de cebadores.....	32
7.3.	Extracción de ARN	33
7.4.	Determinación de las temperaturas de hibridación	34
7.5.	Análisis de la expresión de los genes de referencia	36
8.	DISCUSION.....	38
9.	CONCLUSIONES	43
10.	PERSPECTIVAS	44
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
12.	ANEXOS	52

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Resumen de los genes de referencia candidatos de CRCC	23
Tabla 2: Operacionalizacion de las variables	25
Tabla 3: Parámetros de la amplificación utilizados en la amplificación de genes de referencia candidatos y diana con el equipo LightCycler 96 (Roche)	29
Tabla 4: Características de los cebadores de los genes de referencia candidatos y genes diana.....	32
Tabla 5: Temperatura de hibridación (°C) para los cebadores de cada gen	35

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Confirmación del diagnóstico patológico de muestras de carcinoma renal de células claras (CRCC) de células claras por HE	31
Figura 2: Determinación de la integridad del ARN total extraído.....	34
Figura 3: Modelo de curva de fusión que confirmó la especificidad de los cebadores	35
Figura 4: Representación de los valores de Ct obtenidos para cada gen en muestras tumorales y no tumorales de CRCC	36
Figura 5: Valores geNorm M de estabilidad de expresión de los genes de referencia candidatos.....	37
Figura 6: Expresión relativa de los genes diana TP53 y EGFR calculada con los genes de referencia más estables.....	38

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Consentimiento informado.....	51
Anexo 2: Aprobación del protocolo por el comité revisor del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN).....	52
Anexo 3: Resultados de la evaluación histológica de las muestras	53
Anexo 4: Cuantificación de las extracciones de ARN.....	54
Anexo 5: Curvas de fusión y amplificación del gen <i>GAPDH</i>	54
Anexo 6: Curvas de fusión y amplificación del gen <i>B2M</i>	56
Anexo 7: Curvas de fusión y amplificación del gen <i>HPRT1</i>	57
Anexo 8: Curvas de fusión y amplificación del gen <i>RPL13</i>	58
Anexo 9: Curvas de fusión y amplificación del gen <i>TP53</i>	59
Anexo 10: Curvas de fusión y amplificación del gen <i>PPIA</i>	60
Anexo 11: Curvas de fusión y amplificación del gen <i>ACTB</i>	61
Anexo 12: Curvas de fusión y amplificación del gen <i>RNA18S</i>	62
Anexo 13: Curvas de fusión y amplificación del gen <i>HMBS</i>	63
Anexo 14: Curvas de fusión y amplificación del gen <i>EGFR</i>	64
Anexo 15: Curvas de fusión y amplificación del gen <i>RPN1</i>	65

1. INTRODUCCIÓN

En oncología, el análisis de expresión de genes proporciona datos importantes tanto para la búsqueda de marcadores de diagnóstico y pronóstico como para mejorar la comprensión básica de la carcinogénesis y el desarrollo de tumores.

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real con transcripción inversa (*RT-qPCR por sus siglas en inglés*) es una herramienta ampliamente utilizada en el análisis de expresión de genes debido a su alta sensibilidad y especificidad. Para asegurar la validez de sus resultados es indispensable realizar un diseño experimental correcto el cual debe incluir genes de referencia que deben presentar una expresión estable y no verse afectada por las condiciones experimentales de la muestra.

A pesar de que se han identificado algunos genes de referencia en diversos estudios a nivel mundial, es importante que sean validados ya que se ha demostrado que no todos funcionan de manera adecuada para cada tipo de tumor y población. El carcinoma renal de células claras (CRCC) es una enfermedad cuyos mecanismos biológicos de desarrollo son muy variables y aun no se han estudiado en su totalidad.

En el Perú al igual que en el resto de Latinoamérica hay pocos estudios sobre esta enfermedad por lo que es necesario profundizar aún más la investigación. Si bien se han reportado algunos genes de referencia para esta enfermedad en algunos países, el uso de estos genes aún no se ha validado a partir de muestras peruanas.

En ese sentido el objetivo de esta investigación es validar genes de referencia previamente reportados, como GAPDH, GUSB, RPL13, TBP, HMBS, PPIA, HPRT1, ACTB, B2M, RPN1, y RNA18S5 mediante RT-qPCR en 21 muestras tumorales y 21 muestras no tumorales adyacentes de pacientes de CRCC en el INEN.

Finalmente, para validar su uso como genes de referencia óptimos, se normalizó la expresión de los genes de interés TP53 y EGFR con los genes de referencia seleccionados.

1.1. Planteamiento del problema

El carcinoma renal es la tercera neoplasia maligna genitourinaria más común y la más letal entre todas (Laird *et al.* 2013). A nivel mundial, el número de casos nuevos aumentó de 207,3 mil en 1990 a 393 mil en 2017 y se prevé que entre 2018 y 2030 aumente aún más a 475,4 mil casos (Du *et al.* 2020).

El subtipo de carcinoma renal más frecuente, el CRCC, tiene un peor pronóstico en comparación con los subtipos papilar y cromóforo, que representan el 10% y el 5% de los carcinoma renal, respectivamente (Lopez-beltran *et al.* 2006).

La normativa del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas, principal referente del cáncer en el Perú, indica que en estadios iniciales el carcinoma renal es oligosintomático y su hallazgo es incidental. En ese sentido, el diagnóstico por examen clínico tiene un alcance muy limitado y tardío por lo que en la institución se realiza mediante la técnica de imágenes. En estadios avanzados recién se presenta alertas clínicas notables que debutan con la hematuria. En esos casos, se realiza una radiografía de tórax, luego una tomografía axial computarizada (TAC) abdominal y pélvico con contraste para determinar el compromiso local y una TAC de tórax si la radiografía muestra lesiones avanzadas. (Departamento de oncología médica - INEN, 2013)

Además, otro de los problemas en el manejo del CRCC es que no se puede predecir con precisión la posibilidad de recurrencia de la enfermedad en un paciente debido a que los mecanismos biológicos son muy variables y aun no se han estudiado en su totalidad. Adicionalmente, la falta de marcadores tumorales para el diagnóstico y de agentes quimioterapéuticos eficaces complican el pronóstico de supervivencia de los pacientes (Laird *et al.* 2013).

Aunque se han propuesto numerosos marcadores pronósticos de CRCC (por ejemplo, *MKI67*, *TP53*, *CA9*), aun es necesario realizar estudios de expresión génica para encontrar marcadores de mayor precisión (Escudier *et al.* 2013), para lo cual es indispensable contar con genes de referencia para este tipo de tumores.

Si bien se han realizado algunos estudios de identificación de genes de referencia en muestras de CRCC (Wisnieski *et al.* 2013; Potashnikova *et al.* 2015; Rienzo & Schiano 2013), es importante considerar que estos han sido realizados a partir de muestras de otros países y por lo tanto a partir de una población diferente. En Perú, aun no se cuenta con un estudio que busque validar estos genes de referencia previamente identificados en otras poblaciones.

¿Los genes de referencia de carcinoma renal de células claras reportados en la bibliografía serán válidos para estudios de expresión génica mediante RT-qPCR a partir de muestras del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas?

1.2. Justificación

En el Perú el carcinoma renal representó el 1.7% de todos los tipos de cáncer entre 2006 y 2011 (MINSA 2013). Aproximadamente 7 de cada 10 pacientes que padecen esta neoplasia renal presentan el subtipo de células claras (Lopez-beltran *et al.* 2006), de los cuales el 95% se desarrolla de forma esporádica y el 5% está asociado a enfermedades hereditarias como Von Hippel-Lindau, esclerosis tuberosa, etc. (Muglia & Prando 2015)

Se ha reportado que la incidencia y el desarrollo de la enfermedad varía entre cada población. En Latinoamérica hay pocos estudios epidemiológicos y descriptivos que permitan conocer más la biología de la enfermedad (Medina-Rico *et al.* 2018) por lo que la identificación de genes de referencia para ensayos de RT-qPCR a partir de muestras de CRCC de pacientes del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas servirá como herramienta fundamental para el desarrollo de estudios de análisis de expresión génica confiables de este tipo de cáncer en la población peruana.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Validar genes de referencia para estudios de expresión génica del carcinoma renal de células claras mediante RT-qPCR a partir de muestras del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN).

1.3.2. Objetivos específicos

- Extraer el ARN de las muestras de carcinoma renal de células claras.
- Diseñar los cebadores de los genes de referencia reportados en la bibliografía.
- Amplificar las secuencias de los genes de referencia mediante RT-qPCR.
- Analizar la expresión de los genes diana *TP53* y *EGFR* con la normalización de los genes de referencia validados.

2. MARCO TEORICO

2.1. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica usada como gold-standard en la detección de una gran variedad de enfermedades. Esta técnica requiere de un par de cebadores sintéticos que van en ambos sentidos para hibridarse cada uno con una hebra de ADN diana. La unión de los cebadores a las hebras diana sirven como sustrato para que la enzima ADN polimerasa, la cual es derivada de la bacteria *Thermus aquaticus*, pueda sintetizar una hebra complementaria añadiendo una secuencia de desoxinucleótidos (Mackay *et al.* 2002).

El primer paso de la reacción de PCR es la desnaturalización del ADN, que consiste en el calentamiento a una temperatura superior a la del punto de fusión de las dos hebras de ADN complementarias del ADN para poder separarlas. Luego, una reducción de la temperatura permitirá la hibridación de los cebadores a los segmentos de ADN diana, lo cual ocurre por sus secuencias

complementarias. Enseguida, se aumenta la temperatura nuevamente para que la enzima ADN polimerasa agregue nucleótidos a la cadena de ADN en desarrollo como paso de extensión. Al final de cada repetición de estos tres pasos, ocurre una duplicación del número de moléculas de ADN copiadas (Garibyan & Avashia 2013).

2.2. RT-qPCR

La RT-qPCR es una variante de la PCR convencional que permite la amplificación y la detección de productos de amplificación de manera simultánea.

La primera parte consiste en la síntesis de ADNc a partir de una muestra de ARN mediante la enzima transcriptasa reversa y la segunda parte consiste en la amplificación de los genes de interés (Adams, 2020).

Durante el proceso, la amplificación se mide después de cada ciclo mediante la detección de señales fluorescentes. Dichas señales ocurren gracias a la acción de un agente intercalante fluorescente (ej. Sybr Green) que se une de manera no específica al ADN de doble hebra a medida que este se sintetiza, por lo que cuanto más ADN se genere en la reacción, más fluorescencia se emite (Adams 2020).

La técnica se basa en la detección del aumento de la señal de fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de ADN producida durante cada ciclo de PCR. La correlación entre las señales de fluorescencia y la cantidad de producto amplificado se cuantifica con el valor del ciclo umbral (Ct) que es el ciclo en el que la cantidad de fluorescencia detectada pasa por encima de un límite definido conocido como umbral (threshold). Cuanto mayor expresión del gen de interés haya en el material de partida, menor será el Ct. (Nolan *et al.* 2006). Esta función permite una cuantificación precisa de las moléculas diana conservando la sensibilidad y la especificidad de la reacción de amplificación.

Luego, con el resultado de la fluorescencia detectada en relación al número de ciclos se genera una gráfica que representa la acumulación de producto durante toda la reacción de PCR (Life technologies 2012).

Esta técnica tiene mayor ventaja en cuanto a velocidad, sensibilidad, reproducibilidad y la disponibilidad de una amplia gama reactivos comerciales en comparación con métodos convencionales de cuantificación como los análisis de Northern-blot ensayos de protección de RNAsas (*RPA, por sus siglas en inglés.*) (Kheirelseid *et al.* 2010).

Al realizar un ensayo de RT-qPCR es necesario garantizar la confiabilidad y reproducibilidad de los resultados para lo cual es necesario realizar la estandarización de todos los pasos del análisis, el control de calidad del ARN, el diseño de cebadores y sondas, la normalización de datos, el procesamiento de datos que implica el cálculo de la eficiencia de la reacción y el análisis estadístico(Krasnov *et al.* 2011).

En oncología esta técnica ha cobrado mayor importancia en las últimas dos décadas debido a un cambio de enfoque en la investigación hacia la actividad transcripcional de las células tumorales. Los estudios del microambiente tumoral permiten tener una visión más clara de los procesos moleculares que promueven la actividad de las células neoplásicas (Skrzypski 2008).

2.2.1. Tipos de cuantificación

2.2.1.1. Cuantificación absoluta

La cuantificación absoluta permite la determinación precisa del número de copias del gen por célula. Requiere la generación de una curva estandar que se realiza con diluciones sucesivas de la muestra y probando cada dilución por duplicado. Además, se debe agregar los controles positivos y negativos.

Se considera inválidos a los valores de Ct muy elevados o muy bajos debido a que se consideran error de pipeteo y los valores restantes se promedian para dar el valor final del Ct de cada dilución.

Finalmente, el número de copias del gen se calcula después del ensayo de amplificación por RT-qPCR a partir de la regresión lineal de la curva estándar (Bustin S. 2000)

2.2.1.2. Cuantificación relativa

La cuantificación relativa consiste en la cuantificación de los niveles de expresión de un gen diana en relación a la expresión de un gen de control interno o gen de referencia.

Este tipo de cuantificación representa una ventaja frente a la cuantificación absoluta ya que no requiere una curva de calibración previa de concentraciones conocidas. Además, esta cuantificación es adecuada para analizar experimentos relacionados a los cambios en la expresión génica por exposición a cambios fisiológicos (Pfaffl 2004).

2.2.1.2.1. Delta-Delta Ct

2 Delta-Delta CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$) es un algoritmo utilizado en la cuantificación relativa de la expresión de genes de interés que usa directamente los valores de CT (ciclo del RT-qPCR en el cual la fluorescencia supera el umbral de detección) para calcular la expresión génica relativa en muestras utilizando la media geométrica de genes de referencia como factores de normalización. (Livak & Schmittgen 2001)

Este algoritmo desarrolla un cálculo en dos pasos, la primera parte, ΔCT , consiste en la diferencia de CT entre los valores Ct de los genes diana con el promedio de los valores Ct de los genes de referencia, luego se calcula el $\Delta\Delta CT$, que consiste en la diferencia entre ΔCT y el promedio de los valores de Ct de las muestras control. Finalmente se eleva 2 a la potencia del $-\Delta\Delta CT$ y se puede calcular el log 2 de estos valores para poder graficarlos.

Al finalizar el cálculo del $2^{-\Delta\Delta CT}$, se obtiene la cantidad de veces de cambio de la expresión del gen de interés en los distintos tipos de muestra. (Rao *et al.* 2014)

2.2.2. Genes de referencia

Es importante considerar la existencia de sesgos propios de la muestra relacionados con las condiciones biológicas (edad, sexo, estado de la enfermedad) y las condiciones experimentales (quimioterapias, radioterapias, etc.) que pueden afectar a la interpretación de resultados de un ensayo de RT-qPCR (Vandesompele *et al.* 2002).

En ese sentido, la guía de Información mínima para la publicación de experimentos de qPCR (MIQE *por sus siglas en inglés*) resalta el paso de la normalización como un componente esencial de un ensayo de qPCR confiable porque controla las variaciones en el rendimiento de la extracción de ARN, el rendimiento de la reacción de transcripción reversa y la eficiencia de la amplificación, permitiendo una comparación válida de las concentraciones de ARNm en diferentes muestras.

Dicho proceso de normalización consiste en evaluar las proporciones de las concentraciones de ARNm de los genes de interés con respecto a las de los genes de referencia (Bustin *et al.* 2009).

Estos genes de referencia presentan niveles de expresión relativamente constantes en la célula independientemente de las condiciones biológicas o experimentales en las que se encuentre, esto debido a que participan en procesos celulares fundamentales como la transcripción, producción de energía, mantenimiento del citoesqueleto, plegamiento de proteínas, etc (De Kok *et al.* 2005). Sin embargo, se ha reportado que en algunos casos su expresión individual podría cambiar como resultado de su participación en los procesos del crecimiento neoplásico (Goidin *et al.* 2001) , la hipoxia (Zhong & Simons 1999) o el tratamiento experimental (Schmittgen & Zakrajsek 2000; Wu & Rees 2000), lo que influye en la correcta interpretación de los resultados.

Adicionalmente, la identificación de genes de referencia requiere que se evalúe variación de los niveles de expresión en tejidos normales y tumorales (Krasnov *et al.* 2011). Por lo tanto, diversos autores (Wisnieski *et al.* 2013; Potashnikova *et al.* 2015; Rienzo & Schiano 2013) proponen el uso de varios genes de referencia combinados para obtener un factor de normalización para aumentar

la confiabilidad del análisis de los resultados de expresión génica evaluados en la RT-qPCR.

Si bien diversos genes de referencia han sido reportados, estos pueden presentar algunas variaciones a causa de las condiciones experimentales de la muestra por lo que es necesario realizar una validación antes de utilizarlos como control interno en un experimento de RT-qPCR.

La validación de un gen de referencia consiste en la evaluación de la expresión constante del gen de referencia candidato en las muestras y posteriormente una cuantificación del nivel de expresión con algún gen de interés normalizado con los genes de referencia propuestos. (Wisniewski *et al.* 2013)

2.2.2.1. Análisis de la expresión de genes de referencia

2.2.2.1.1. GeNorm

El algoritmo GeNorm calcula la estabilidad de la expresión de los genes de referencia en función de la variación por pares. Considera que si dos genes varían de manera similar en todas las muestras, entonces se deberían entender como los más estables para ese conjunto de datos.

En ese sentido, el análisis de GeNorm consiste en la identificación de los dos genes con la mayor estabilidad de expresión en todas las muestras con los cuales calcula un factor de normalización (M) basado en una media geométrica de sus valores Ct (Vandesompele *et al.* 2002). Luego, calcula la variación de expresión de cada uno de los otros genes de referencias candidatos con respecto a los dos genes elegidos previamente. De esta manera, la clasificación de este algoritmo siempre presentara dos genes de referencia en la parte superior con el mismo valor M seguido de otros genes de referencia candidatos con valores M más altos lo que indicara una estabilidad más baja (Sundaram *et al.* 2019)

2.3. Carcinoma renal

El carcinoma renal es la neoplasia urológica más letal en el mundo (Laird *et al.* 2013), aproximadamente el 40% de los pacientes muere por la acelerada progresión de la enfermedad (Muglia & Prando 2015).

Según el último reporte del Observatorio global del cáncer (*GLOBOCAN, por sus siglas en inglés*) de la Organización Mundial de la salud (OMS) aproximadamente ocurren más de 140 000 muertes al año por CR y esta neoplasia se considera la decimotercera causa más común de muerte por cáncer a nivel mundial (Ferlay *et al.* 2013).

Se ha reportado que la mayor incidencia y tasa de mortalidad se presenta en Europa, principalmente en República Checa y Dinamarca, seguidas de América del Norte, Australia, América del Sur y Asia.(Medina-Rico *et al.* 2018)

Los signos y síntomas de la enfermedad consisten principalmente en hematuria, dolor y la presencia de una masa en el flanco. Sin embargo, casi el 40% de los pacientes no los presentan y solo presentan síntomas que pueden confundirse con otras enfermedades como pérdida de peso, anorexia y fiebre. Además en el laboratorio se puede determinar que los pacientes presentan un aumento de las concentraciones séricas de fosfatasa alcalina, transaminasa y alfa-2-globulina (Ball R. 2005)

En ese sentido, la mayoría de los casos se diagnostican fortuitamente y un tercio de los pacientes, en promedio, al momento del diagnóstico ya presentan un estado metastásico (Figlin R. 1999).

Sobre esta enfermedad se ha reportado una mayor prevalencia en hombres y en relación a la edad, se sabe que el carcinoma renal se da generalmente en adultos mayores. Además, se han identificado como factores de riesgo la hipertensión, diabetes, infecciones del tracto urinario, factores de exposición como tabaquismo, asbesto, radiación y factores relacionados al estilo de vida como la dieta inadecuada, obesidad y falta de actividad física (Pascual & Borque 2008).

2.3.1. Subtipo células claras

El carcinoma renal de células claras (CRCC) es el subtipo más frecuente y con peor pronóstico (Lopez-beltran *et al.* 2006). El 95% de los CRCC ocurren de manera esporádica y solo el 5% se relaciona a síndromes hereditarios como la enfermedad de Von Hippel-Lindau y la esclerosis tuberosa.

El CRCC se origina en el epitelio de los túbulos contorneados de la corteza renal y se le relaciona con un patrón de crecimiento tumoral principalmente expansivo (Decastro & Mckiernan 2008).

En la evaluación histológica, esta neoplasia cortical presenta un color amarillo brillante debido a la abundancia de lípidos en el tumor y su tamaño puede variar desde unos milímetros hasta tumores extensos de peso en kilogramos. Además, se puede observar en algunos casos necrosis, degeneración quística, hemorragia, calcificación, osificación, y cambios sarcomatoides (Grignon & Che 2005).

A pesar del uso de diversos esquemas terapéuticos como la quimioterapia combinada y/o la inmunoterapia con citocinas, la supervivencia de los pacientes con CRCC metastásico sigue siendo muy baja (Motzer & Russo 2000). Además, un número significativo de personas con enfermedad localizada tienen recurrencia después del tratamiento de resección quirúrgica local (Leibovich *et al.* 2003).

Actualmente, no se puede predecir con precisión la posibilidad de recurrencia en un paciente debido a que los mecanismos biológicos de esta enfermedad son altamente variables y poco conocidos (Laird *et al.* 2013), por lo que es necesario identificar genes de referencia específicos para este tipo de tumores que permitan desarrollar estudios de expresión génica confiables.

3. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Los análisis de la expresión de los genes diana de una enfermedad pueden ser cuantificados mediante la normalización con un gen de referencia expresado de forma estable e invariable (Bustin *et al.* 2013). Sin embargo, la validez de los genes de referencia pueden ser variables entre poblaciones ya que el cáncer, por su naturaleza, es una enfermedad que resulta de una interacción entre factores genéticos y ambientales propios de cada región (Talseth-palmer & Scott 2011).

En 2007, Glenn *et al.* evaluaron la estabilidad de la expresión de genes de referencia propuestos para muestras de riñón normal y muestras de carcinoma renal de células claras (CRCC). En este estudio se observó que incluso la forma de conservación del tumor es muy importante al momento de elegir los genes de referencia ya que cuando utilizo tejidos tumorales embebidos en parafina obtuvo como genes de referencia óptimos *ACTB*, *RPL13A*, *GUSB*, *RPLP0*, *HPRT1* y *SDHA*. Sin embargo, cuando utilizaron tejido fresco congelado los genes de referencia óptimos identificaron fueron *ACTB*, *RPL13A* y *GUSB* (Glenn *et al.* 2007).

Ese mismo año, Jung *et al.* evaluaron un panel de 10 genes de referencia previamente reportados en muestras de tejido tumoral y normal emparejadas de CR de células claras y concluyeron que los únicos genes que se expresaron de forma estable fueron *PPIA* y *TBP*, mientras que *ACTB*, *ALAS1*, *GAPDH*, *HMBS*, *HPRT1*, *RPLP0*, *SDHA* y *TUBB* tuvieron una variación de niveles de expresión significativamente alta (Jung *et al.* 2007).

En 2011 Krasnov *et al.* Realizaron un análisis bioinformático entre 1500 genes de referencia candidatos con el que identificaron al gen *RPN1*, el cual tiene una función muy importante en todos los tejidos que activamente sintetizan proteínas y se expresa también en células tumorales. (Wilson, Roebuck and High, 2008). Mediante un RT-qPCR evidenciaron que la variación de los niveles de expresión de *RPN1* era baja y comparable a la del gen *GUSB*, el cual ha sido anteriormente identificado como gen de referencia para este tipo de cáncer. Además, evaluaron la estabilidad y la ausencia de metilación de las regiones adyacentes a *RPN1* mediante la hibridación de microarrays NotI y determinaron que efectivamente la región 3q21, que alberga *RPN1*, es una de las regiones más estables del cromosoma 3 en el carcinoma renal. (Krasnov *et al.* 2011).

También en 2011, Bjerrgaard *et al.* Evaluaron la expresión génica de 8 genes de referencia candidatos en un panel heterogéneo de diferentes tejidos renales tanto tumorales y normales de los subtipos oncocitoma, papilar, cromóforo y de células claras. Concluyeron que solo *HMBS*, *PPIA*, *ATP5J* y *TBP*, se expresaron de manera estable cuando se compararon los diferentes subtipos de carcinoma renal, oncocitoma y tejido normal (Bjerregaard *et al.* 2011).

Así mismo, en 2014 Wierzbicki *et al.* evaluaron 15 genes de referencia candidatos en muestras de CRCC mediante RT-qPCR y luego de la normalización de los niveles de expresión del gen diana *TP53* concluyeron que los genes *GUSB* y/o *RPL13* pueden ser utilizados como genes de referencia y que debería evitarse el uso de *GAPDH* y *ACTB* debido a la alta variabilidad en su expresión (Wierzbicki *et al.* 2014).

Tabla 1: Resumen de los genes de referencia candidatos de CRCC

Autores	Genes candidatos que evaluaron	Resultados
Glenn <i>et al.</i> 2007	<ul style="list-style-type: none"> • <i>GUSB</i> • <i>TFRC</i> • <i>TBP</i> • <i>ACTB</i> • <i>B2M</i> • <i>RPL13A</i> • <i>SDHA</i> • <i>HPRT1</i> • <i>RPLP0</i> 	<p>Los genes de referencia óptimos para tejidos embebidos en parafina fueron: <i>ACTB</i>, <i>RPL13A</i>, <i>GUSB</i>, <i>RPLP0</i>, <i>HPRT1</i> y <i>SDHA</i>;</p> <p>y para tejido fresco congelado fueron: <i>ACTB</i>, <i>RPL13A</i> y <i>GUSB</i></p>

Jung <i>et al.</i> 2007	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ACTB</i> • <i>ALAS1</i> • <i>GAPDH</i> • <i>HMBS</i> • <i>HPRT1</i> • <i>RPLPO</i> • <i>SDHA</i> • <i>TUBB</i> • <i>PPIA</i> • <i>TBP</i>, 	Solo los genes <i>PPIA</i> y <i>TBP</i> presentaron una expresión estable.
Krasnov <i>et al.</i> 2011	Mediante un análisis bioinformático evaluaron más de 1500 genes de referencia candidatos	El gen <i>RPN1</i> presentó una expresión estable y puede ser usado como gen de referencia en combinación con <i>GUSB</i> .
Bjerregaard <i>et al.</i> 2011	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ATP5J</i> • <i>HMBS</i> • <i>HPRT1</i> • <i>PPIA</i> • <i>TBP</i> • <i>GAPDH</i> • <i>POLR2A</i> • <i>RNA18S</i> 	Los genes <i>HMBS</i> , <i>PPIA</i> , <i>ATP5J</i> y <i>TBP</i> se expresaron de manera estable en todos los tejidos evaluados incluyendo tumores de CRCC de células claras.

Wierzbicki <i>et al.</i> 2014	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ACTB</i> • <i>B2M</i> • <i>GAPDH</i> • <i>GUSB</i> • <i>HMBS</i> • <i>HPRT1</i> • <i>IPO8</i> • <i>PGK1</i> • <i>PPIA</i> • <i>RPL13</i> • <i>RPI32</i> • <i>RPLP0</i> • <i>TBP</i> • <i>TRFC</i> • <i>UBC</i> 	Los genes <i>GUSB</i> y/o <i>RPL13</i> fueron validados como genes de referencia óptimos para este tipo de cáncer.
-------------------------------	---	--

4. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente proyecto de investigación se realizó en la plataforma de investigación del Banco de Tejidos Tumورales del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas y en el Laboratorio de Biología Celular y Genética Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma.

5. HIPÓTESIS

Los genes reportados en la bibliografía que se evaluarán en este estudio podrían ser válidos para estudios de expresión génica mediante RT-qPCR a

partir de muestras de carcinoma renal de células claras de pacientes del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Diseño metodológico

Investigación experimental

6.2. Población y muestras

La población objetivo son los pacientes con un diagnóstico anatomopatológico de carcinoma renal de células claras (CRCC), con muestras tumorales (n=21) y no tumorales de riñón (n=21) criopreservadas en OCT a -150°C en el Banco de Tejidos Tumorales del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas.

6.3. Operacionalización de variables

Tabla 2: Operacionalización de las variables

VARIABLE	INDICADOR	ESCALA DE MEDIDA	INSTRUMENTO	CATEGORIZACIÓN DE LA VARIABLE
Concentración	ng/ul	Razón	Nanodrop	Cuantitativa
Pureza	Absorbancia a 260/280 nm Y 260/230 nm	Razón	Nanodrop	Cuantitativa
Diseño de cebadores	Secuencia de Nucleótidos	Razón	PCR <i>in silico</i>	Cualitativa

Expresión de genes de referencia candidatos	Nivel de expresión	Razón	Análisis de cuantificación por RT-qPCR	Cuantitativa
Expresión de los genes diana EGFR y TP53	Nivel de expresión	Razón	Análisis de cuantificación por RT-qPCR	Cuantitativa

6.4. Procedimiento

6.4.1. Selección de muestras

Se procesaron 21 muestras pareadas (tejido tumoral y no tumoral) de CRCC conservados en el Banco de Tejidos Tumorales del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas en OCT a -150°C .

6.4.2. Verificación del diagnóstico y estado de las muestras

A todas las muestras se le realizaron cortes de $4\ \mu\text{m}$ en el criostato, y se colocaron en láminas porta objetos de vidrio y se congelaron inmediatamente a -150°C . Luego, se realizó una tinción de Hematoxilina-Eosina para lo cual se sumergió 5 veces la lámina en alcohol de 75° seguido de un enjuague con agua corriente por 30 segundos. A continuación, se colocó la lámina en Hematoxilina de Harris por 40 segundos y se lavó con agua corriente por 30 segundos. Luego, se sumergió la lámina 3 veces en agua amoniacal y se colocó en Eosina por 20 segundos. Inmediatamente se sumergió 5 veces en alcohol a 75° y luego 5 veces en alcohol de 96° . Finalmente se sumergió 5 veces en Xilol.

La lamina se dejó secar y se montó con unas gotas de resina entellan (Merck). Posteriormente el Dr. Sandro Casavilca, médico patólogo del INEN, reviso las láminas histológicas para determinar el porcentaje de células tumorales y el porcentaje de superficie ocupada por necrosis y fibrosis.

6.4.3. Diseño de cebadores

Se utilizó la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para obtener la secuencia de 9 genes constitutivos en tumores de CRCC reportados en la bibliografía (*TBP*, *B2M*, *HMBS*, *GAPDH*, *GUSB*, *EGFR*, *RNA18S5*, *HPRT1*, *ACTB*).

A partir de las secuencias obtenidas, se diseñaron cebadores utilizando el software Primer3 web, los cuales pertenecieron a exones diferentes, evitando la presencia de intrones para asegurar la especificidad y no permitir la amplificación de ADN genómico. Además, se consideró que la longitud de los cebadores se encuentre entre 20-24 nucleótidos, el porcentaje de guanina y citosina sea cercano a 50% y tenga una temperatura media de hibridación entre 60-65 °C.

Luego se realizó un PCR *in silico* en <http://www.genome.ucsc.edu/> para verificar que la amplificación del producto fue la correcta.

Además, se incluyeron cebadores previamente reportados para los genes *RPN1*, *TP53*, *RPL13*, *PPIA* para medir los niveles de expresión de estos genes en comparación con lo reportado en la bibliografía.

6.4.4. Extracción de ARN

Se realizó un corte del tejido de CRCC de 160µm en el criostato, se colocó en un micro tubo de 1.5ml y se congeló inmediatamente a -150°C. Luego, se añadió 1 ml de Trizol y se homogenizó en el vortex por 5 segundos 3 veces con intervalos de 2 minutos en hielo. Se centrifugó a 12000 g a 4°C por 5 minutos y se dejó incubar en hielo por 5 minutos.

El sobrenadante se transfirió a un micro tubo de 1.5ml, se añadió 200µL de cloroformo y se dejó incubando por 3 minutos en hielo. Luego, se centrifugó a 12000 g a 4°C por 15 minutos y se transfirió la fase acuosa superior sin tocar la interface a un nuevo micro tubo de 1.5 ml. Posteriormente, se añadió 500µL de Isopropanol y se incubó en hielo por 10 minutos. Al cabo de ese tiempo se centrifugó a 12000 g por 10 minutos a 4°C. A continuación, se realizó el lavado del pellet con 1ml etanol al 75% y una posterior centrifugación a 12000g a 4°C por 7 minutos. Este paso se repitió 3 veces.

El ARN fue eludido en 20 μ L de agua libre de nucleasas y cuantificado por espectrofotometría en el Nanodrop 2000 utilizando 1 μ L de muestra.

La muestra se trató con DNAsas utilizando el kit comercial DNase I Amplification Grade de Invitrogen de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Brevemente, en un micro tubo de 1.5 ml se colocó 1 μ g de ARN junto con 1 μ L de 10 X DNase I Reaction buffer, 1 μ L de DNase I Amplification Grade 1U/ μ L y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 10 μ L y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se añadió 1 μ L de 25mM de EDTA para inactivar las DNAsas y se incubó por 10 minutos a 65°C.

Finalmente se validó la integridad del ARN extraído en un gel de agarosa al 1% (buffer TAE 1X) a 70 voltios por 45 minutos.

6.4.5. Síntesis de ADNc

La mezcla para la reacción de transcripción reversa consistió en 1 μ L de primer mix de Qiagen, 1 μ L de dNTP-mix 10 μ M de la marca Invitrogen, 4 μ L de 5x RT Bufer de Invitrogen. 0.5 μ L de RNase Inhibitor (200/ μ L) de ab, 1 μ L de la enzima RevertAid Premium Reverse Transcriptase de Invitrogen, 10ul de ARN a concentración 1000 ng/ μ L y 2.5 μ L de Agua PCR para obtener un volumen final de reacción de 20 μ L.

Luego, se colocó en el Termociclador Eppendorf a 25°C por 10 minutos, seguido de un paso de 50°C por 30 minutos y luego a 85°C por 5 minutos.

6.4.6. PCR de gradiente de temperaturas para los cebadores

Se realizó un PCR de gradiente de temperaturas para determinar la temperatura óptima de hibridación de cada par de cebadores. Para la preparación de la reacción se utilizó 2.5 ul de ADNc, 1ul de cada cebador 12,5 ul de 2x Hotstart PCR Master Mix (abm) y 8 ul de agua libre de nucleasas para completar un volumen final de 25 ul. El protocolo de amplificación consistió en un ciclo inicial de denaturación de 94°C por 10 minutos seguido de 33 ciclos que constó de 3 pasos, un paso de denaturación de 94°C por 30 segundos, uno de hibridación donde la temperatura varió entre 55-61 °C por 30 segundos y una extensión a 72°C por 1 minuto. Finalmente, una extensión final a 72°C por 5 minutos.

Los productos de PCR se evidenciaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% en bufer TAE 1X a 70 V durante 1 hora y 10 minutos.

6.4.7. Análisis de las curvas de fusión

Se comprobó la especificidad de la hibridación de los cebadores mediante la evaluación de las curvas de fusión. El qPCR se realizó en micro tubos strips de 0.1 ml.

La mezcla de amplificación consistió en 10ul de Fast Essential DNA Green Master Mix2x, 1μL de cada cebador 10nM, y 1μL de ADNc y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 20μL. La amplificación se realizó en un termociclador Light Cycler 96 (Roche) con una etapa de denaturación inicial a 95 ° C durante 3 minutos seguidos de 33 ciclos de 95°C durante 15 segundos, la temperatura de hibridación, que varío en cada gen, estuvo entre 54-68 °C durante 30 segundos, y una etapa de extensión a 72°C durante 30 segundos. El programa del análisis de la curva de fusión (melting) consistió en un paso a 95 ° C durante 15 s, 60 ° C durante 1 min y un aumento continuo de la temperatura a 95 ° C a una velocidad de rampa de 0,3 ° C / s seguida de 95 ° C durante 15 s.

Los resultados se exportaron del equipo y se analizaron con el programa LightCycler® 96 Application Software Versión 1.1.

6.4.8. Ensayos de expresión de los genes de referencia candidatos

Cada gen se evaluó en placas de 96 pocillos. La mezcla de amplificación del qPCR consistió en 10μL de Fast Essential DNA Green Master Mix2x, 1μL de cada cebador 10nM, y 1ul de ADNc y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 20μL. La amplificación se realizó en un termociclador Light Cycler 96 (Roche) con una etapa de denaturación inicial a 95 ° C durante 3 minutos seguidos de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos, y una etapa de extensión a 72°C durante 30 segundos.

El programa con sus parámetros a detalle se describe en la tabla 3.

Tabla 3: Parámetros de la amplificación utilizados en la amplificación de genes de referencia candidatos y diana con el equipo LightCycler 96 (Roche)

Nombre del programa	Temperatura °C	Numero de ciclos	Ramp (°C/s)	Duración (s)	Modo de Adquisición
Pre incubación	95	1	4.4	600	None
Amplificación de 3 pasos	95	33	4.4	10	None
	(54-68)		2.2	15	None
	72		4.4	15	Single
Melting	95	1	4.4	10	None
	65		2.2	60	None
	97		4.4	1	Continuous
Cooling	37	1	2.2	30	None

Siguiendo la guía de validación de métodos bioanalíticos (Van Amsterdam *et al.* 2013), se realizó un pool de las muestras tumorales y un pool de las muestras no tumorales como control de precisión para cada corrida de qPCR de cada gen de referencia candidato.

Se evaluaron todas las muestras por duplicado así como el pool tumoral y no tumoral (control positivo) y los blancos (control negativo) . Adicionalmente, como control de calidad de las variaciones intra-placa, se consideraron solo las muestras cuya diferencia de Ct entre repeticiones no superaba 0,5 y que su porcentaje de coeficiente de variación (CtCV%) sea menor a 15%.

Los niveles de expresión de los genes diana TP53 y EGFR fueron normalizadas con los genes de referencia elegidos.

6.5. Técnicas para el procesamiento de la información

Se realizó una base de datos con los datos clínicos de las muestras seleccionadas usando el programa Microsoft Excel versión 16.9 (Microsoft Corporation) y se generó un código de identificación para mantener el anonimato de los pacientes.

La evaluación de la estabilidad de los genes de referencia candidatos se realizó analizando los valores de Ct con el análisis geNorm disponible en el programa de descarga libre qBasePlus (<https://www.qbaseplus.com/>) siguiendo las indicaciones de los autores del análisis, se consideró el valor geNorm $M \leq 0.5$ como estabilidad alta, $0.5 < \text{geNorm } M \leq 1$ como estabilidad media y geNorm $M > 1$ como estabilidad baja.

Se decidió utilizar geNorm para analizar los resultados de los ensayos de qPCR porque permitió medir la estabilidad de la expresión de los genes candidatos, así como la variación del uso de uno o varios genes de referencia para determinar el menor número de genes necesarios para una normalización precisa.

La normalización de los genes diana con los genes de referencia se realizó con el cálculo del Delta-Delta Ct en el programa Microsoft Excel versión 16.9 (Microsoft Corporation).

Los resultados obtenidos se graficaron utilizando el programa Prism (GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA) e Inkscape (Inkscape Project disponible en: <https://inkscape.org>).

6.6. Consideraciones éticas

El presente proyecto es un estudio retrospectivo, las muestras que se utilizaron cuentan con consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) y firmado por el paciente donante. (Anexo 1).

Toda la información de los datos clínicos de los pacientes se utilizó únicamente con fines de investigación en el desarrollo de esta tesis.

7. RESULTADOS

7.1. Verificación del diagnóstico y estado de las muestras

La evaluación histológica de las láminas de Hematoxilina-Eosina (HE) de cada muestra la realizó el médico patólogo Dr. Sandro Casavilca del departamento de patología del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) (Anexo 2).

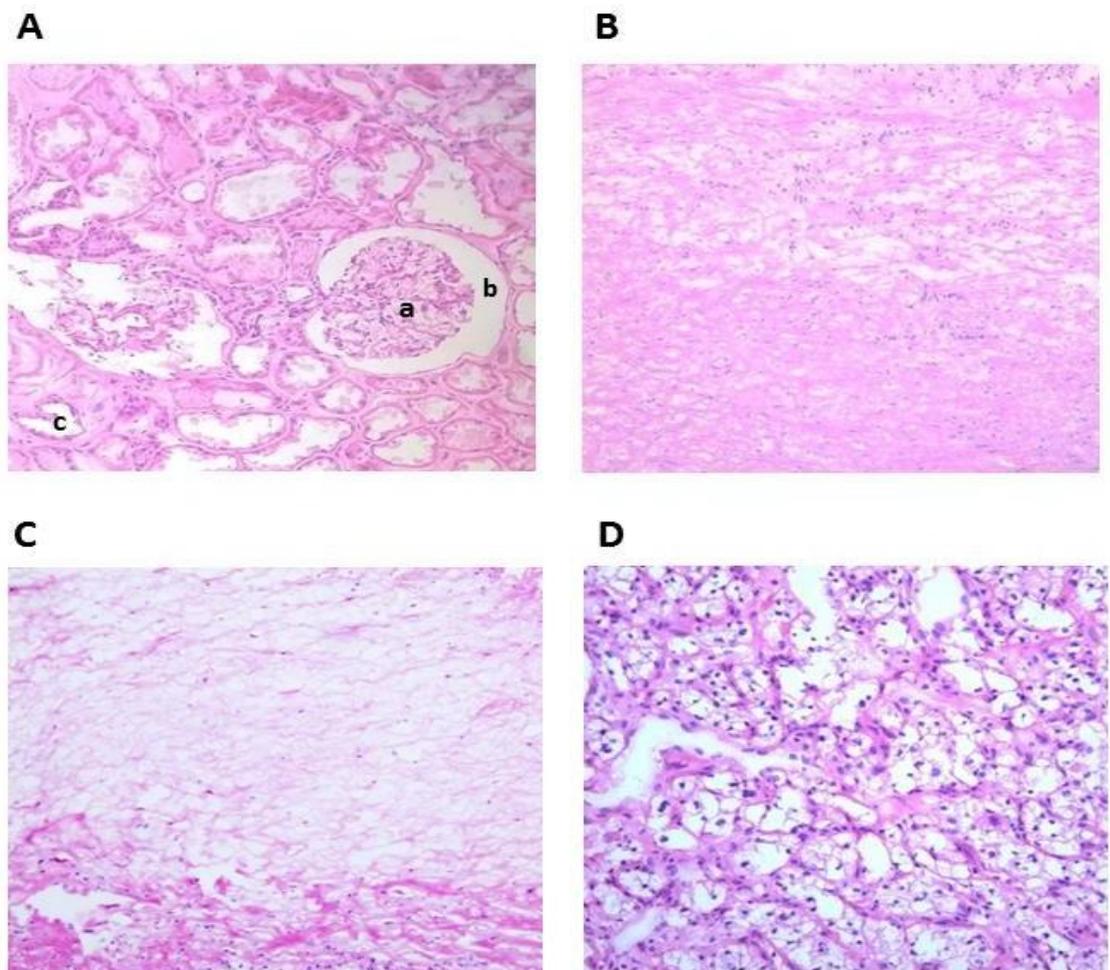


Figura 1: Confirmación del diagnóstico patológico de muestras de carcinoma renal de células claras (CRCC) de células claras por HE **A:** Tejido no tumoral con arquitectura normal (a: Glomérulo, b: Capsula de Bowman, c: Túbulo renal); **B:** Tejido fibrosado; **C:** Tejido necrosado, **D:** Tejido tumoral. Todos los tejidos fueron observados a un aumento de 100x.

Los resultados mostraron la presencia de células de forma poligonal con citoplasma claro, debido a la acumulación de glucógeno y membranas citoplasmáticas bien definidas, así como la distribución celular a manera de nidos separados por una fina red de vasos capilares (Figura 1, D). Todo esto, demostró que las muestras tumorales correspondían a un diagnóstico patológico de carcinoma renal de células claras (CRCC).

Adicionalmente, las muestras no tumorales también fueron evaluadas, y se evidenció una arquitectura tisular característica del tejido renal que consistió en la observación de glomérulos, Capsula de Bowman y túbulos renales principalmente. Además, se confirmó la ausencia total de células neoplásicas en las muestras. (Figura 1, A)

Las muestras que presentaron un porcentaje mayor al 30% de fibrosis (Figura 1, B), y/o necrosis, caracterizada por la desorganización celular, intensa acidofilia y ausencia de núcleos (Figura 1, C), fueron descartadas.

7.2. Diseño de cebadores

Se confirmó mediante ensayos de PCR *in silico* la validez de los cebadores diseñados. Las características de cada cebador se precisan en la tabla 4.

Tabla 4: Características de los cebadores de los genes de referencia candidatos y genes diana

GEN	Ref.Seq	Exón	Secuencia Forward	Secuencia Reverse	Producto (pb)	Referencia
TBP	NM_001172085.1	3-4	GCCCGAAACG CCGAATATAA	TGTGCACAC CATTTTCCCAG	108	Diseñados para el estudio
HPRT1	NM_000194.2	2-3	GCTGAGGATT TGGAAAGGGTG	TCACATCTC GAGCAAGACGT	76	Diseñados para el estudio
B2M	NM_004048.2	1-2	ACTCTCTCTTT CTGGCCTGG	TCTCTGCTG GATGACGTGAG	74	Diseñados para el estudio

HMBS	NM_000190.4	1-2	GGCAATGCGG CTGCAA	GGGTACCC ACGCGAATCAC	64	Diseñados para el estudio
GAPDH	NM_001289745.1	4-5	CAAATTCCATG GCACCGTCA	ATCGCCC CACTTGATTTTGG	106	Diseñados para el estudio
GUSB	NM_000181.3	10-11	AGCCCATTATT CAGAGCGAGT	TCAGTGAA CATCAGAGGTGGA	76	Diseñados para el estudio
EGFR	NM_001346897.1	6-7	ACCTGCGTGAA GAAGTGTCC	GCCGTCTTC CTCCATCTCAT	99	Diseñados para el estudio
RNA18S	NR_003286.2	1	CTGGATACCG CAGCTAGGAA	ATCATGGCC TCAGTTCCGAA	75	Diseñados para el estudio
ACTB	NM_001101	1-2	CAACCGCGAG AAGATGACC	CCAGAGGCGTACA GGGATAG	96	Diseñados para el estudio
RPN1	NM_002950	1-2	CACCCTCAACA GTGGCAAGAAG	TGCATTTGCTC ACTCTGTCTG	100	Krasnovet <i>al</i> 2011
RPL13	NM_000977.3	1-2	TTCCGCTCGGC TGTTTTCTG	GGGCCTTACGTC TGCGGATCTTA	164	Wierzbickiet <i>al</i> 2014
PPIA	NM_021130.3	1-5	CTTGGGCCGCG TCTCCTTTGAG	GCTTGCCATCCAA CCTCAGTC	329	Wierzbickiet <i>al</i> 2014
TP53	NM_001126112.2	1-2a	ACGACGGTGA CACGCTTCCCTG	CGCTAGGATCTG ACTGCGGCTC	84	Wierzbickiet <i>al</i> 2014

7.3. Extracción de ARN

La cuantificación del ARN total extraído se determinó mediante espectrofotometría con un Nanodrop (Thermo Scientific) midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260nm. En las muestras tumorales se obtuvo que la concentración promedio fue de $1646.63 \pm 968.64 \text{ ng}/\mu\text{l}$ (rango 643.3 – 5115.8 $\text{ng}/\mu\text{l}$), mientras que la concentración promedio de ARN en las muestras no-tumorales fue de 2231.51 ± 1088.98 (rango 245.0 – 4374.8)

La presencia de contaminantes fenólicos y proteínas se determinó mediante el ratio de A 260/280, mientras que la contaminación por sales caotrópicas se determinó por el ratio A 260/230. En las muestras tumorales, el ratio de A 260/280 fue en promedio 1.96 ± 0.02 y el ratio A 260/230 fue de 1.69 ± 0.19 . La calidad del ARN extraído se valió de mediante gel de agarosa (1%) (Figura 2).

Se observó el resultado esperado, la presencia de una banda de 5 kb correspondiente a la subunidad 28s, así como una banda definida de 1,9 kb que pertenece a la subunidad 18S.

Además, se evidenció la eficiencia del tratamiento con DNAsas, puesto que no se observaron bandas correspondientes a ADN genómico.

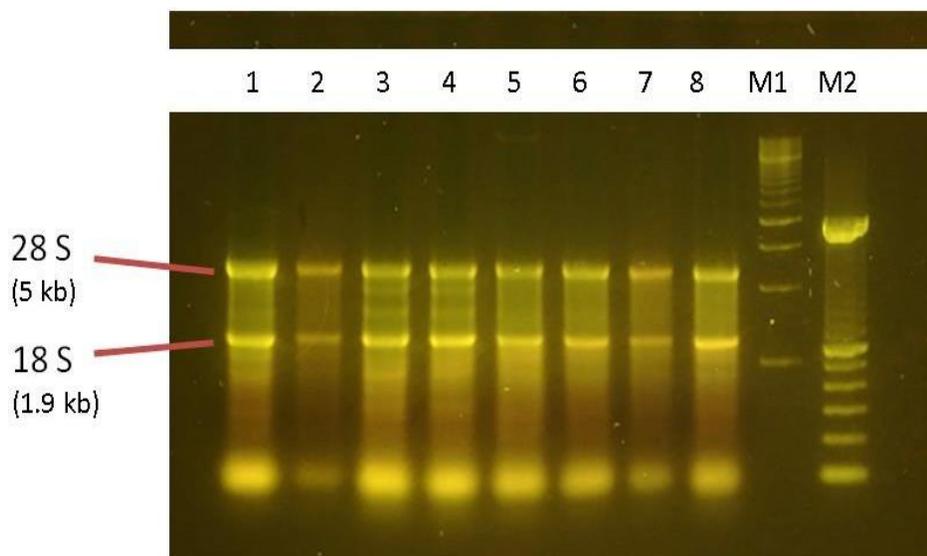


Figura 2: Determinación de la integridad del ARN total extraído. Se observan las subunidades 28S y 18S. Confirmación de la ausencia de ADN genómico posterior al tratamiento con DNAsas. (1-8) grupo de muestras tumorales y no tumorales, (M1) 100pb DNA Ladder, (M2) 50pb Orange Ruler

7.4. Determinación de las temperaturas de hibridación

La temperatura óptima de hibridación para cada gen, se determinó mediante ensayos de PCRs en gradiente de temperatura (Tabla 5).

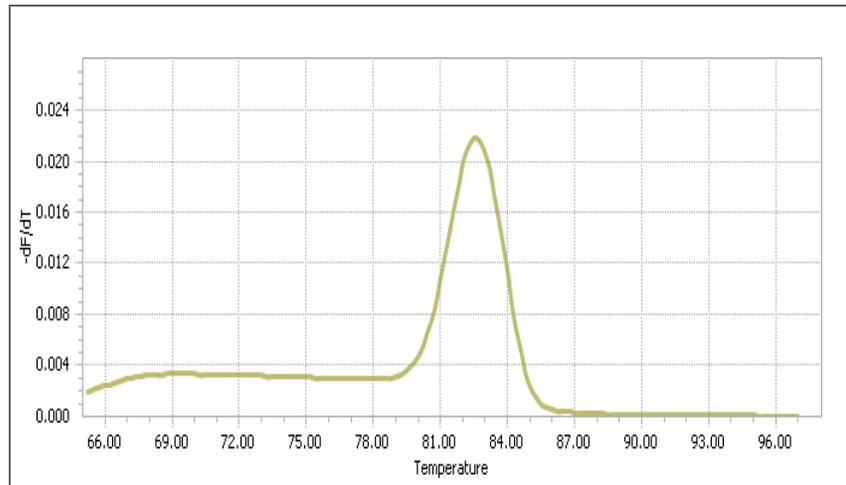
Se consideraron como temperaturas óptimas aquellas en las que se observó un producto único, es decir una sola banda en el gel de electroforesis, puesto que la presencia de otras bandas que podrían representar inespecificidades o dímeros.

Tabla 5: Temperatura de hibridación (°C) para los cebadores de cada gen

GEN	T °C
GAPDH	64
ACTB	65
B2M	64
GUSB	54
RPL13	64
HPRT1	64
RPN1	61
TP53	68
EGFR	61
HMBS	55
TBP	54
PPIA	61
RNA18S	64

Adicionalmente, los ensayos de las curvas de fusión confirmaron la especificidad de los cebadores con la temperatura de hibridación previamente determinada (Anexo

4). Se consideraron como resultados validos solo los que presentaron un pico único



definido. (Figura 3)

Figura 3: Modelo de curva de fusión que confirmó la especificidad de los cebadores.

7.5. Análisis de la expresión de los genes de referencia

El análisis de los valores de Ct (ciclo en el que la fluorescencia supera el umbral de detección) permitió cuantificar la expresión de los genes de referencia candidatos en las muestras tumorales y no tumorales (Figura 4).

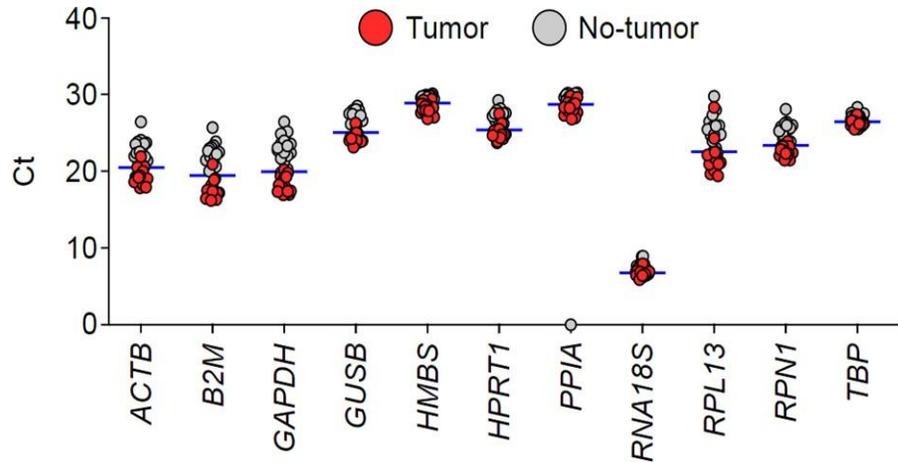


Figura 4: Representación de los valores de Ct obtenidos para cada gen en muestras tumorales y no tumorales de CRCC.

Para identificar los genes más estables entre todos los genes de referencia candidatos evaluados en las muestras de CR de células claras se analizaron los resultados de Ct con el programa geNorm.

Este análisis confirmó que el conjunto de genes evaluados presentó una alta estabilidad de expresión, debido a que el valor geNorm M promedio fue ≤ 0.5 .

En la Figura 5 se observan los genes de referencia analizados ordenados en forma descendente según su valor geNorm M, siendo los más estables aquellos que presentaron los valores más bajos.

Por lo tanto, los 3 genes más estables según geNorm serían *TBP*, *RNA18S* y *GUSB*.



Figura 5: Valores geNorm M de estabilidad de expresión de los genes de referencia candidatos

7.6 Análisis de la expresión de los genes diana

La expresión relativa de los genes diana (TP53 y EGFR) se calculó con el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando la media geométrica de los tres genes de referencia con mayor estabilidad de expresión identificados por geNorm (TBP, GUSB y HMBS), en los tejidos tumorales de CRCC, así como en los tejidos no tumorales.

En la figura 6 se muestra una comparación entre la expresión relativa de TP53 y EGFR en muestras tumorales y no tumorales de CRCC.

A fin de poder determinar la significancia de la diferencia de la expresión deambos genes entre muestras tumorales y no tumorales se realizó la prueba pareada de t-student.

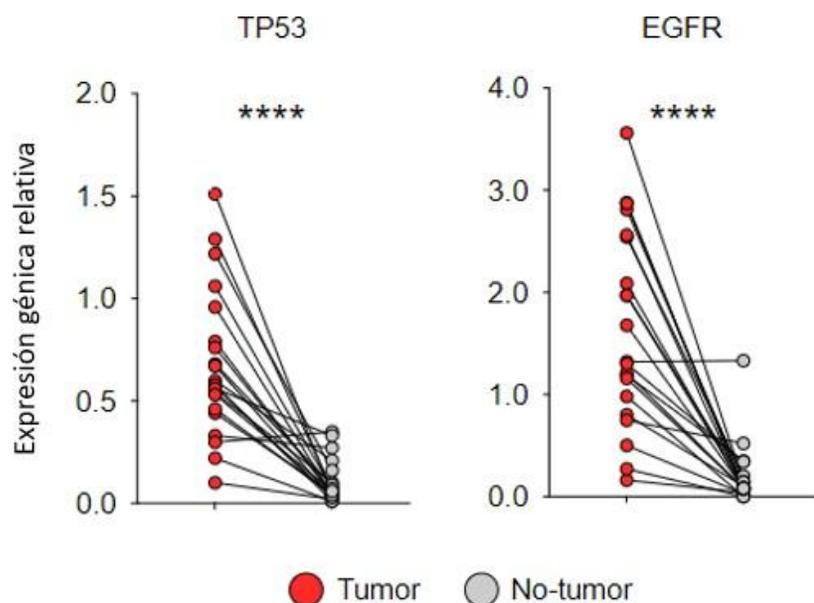


Figura 6: Expresión relativa de los genes diana TP53 y EGFR calculada con los genes de referencia más estables (TBP, GUSB y HMBS) **** = $p < 0.0001$

Los resultados demuestran que la expresión relativa de los genes de interés TP53 y EGFR en las muestras de tejido tumoral es significativamente mayor ($p < 0.0001$) con respecto a su contraparte no tumoral en las muestras de CRCC de pacientes peruanos.

8. DISCUSION

El presente estudio evaluó un total de 11 genes de candidatos para su uso como genes de referencia en la evaluación de la expresión relativa de genes diana (*TP53* y *EGFR*) en muestras de carcinoma renal de células claras (CRCC) mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcripción inversa (RT-qPCR).

La identificación de genes de referencia es un paso crucial al realizar experimentos de RT-qPCR. Diversos equipos de investigación alrededor del mundo han reportado listas de los mejores genes de referencia para el CRCC, sin embargo, los resultados que presentan son contradictorios. (Wotschofsky *et al.* 2011; Jung *et al.* 2007; Wierzbicki *et al.* 2014).

Krasnov *et al.* evaluaron la estabilidad de la expresión de genes candidatos para ser utilizados como genes de referencia en muestras tumorales y no-tumorales, debido a que un gen candidato es considerado como un óptimo gen de referencia, cuando su expresión se mantiene estable entre los tipos de muestras a evaluar. En este trabajo los investigadores reportaron que *RPN1* es óptimo para ser usado como gen de referencia en muestras de CRCC, puesto que presenta una alta estabilidad de expresión en muestras tumorales y no-tumorales.

Estos hallazgos fueron confirmados por el presente estudio donde *RPN1* presenta un valor $geNorm \leq 0.5$, lo cual indica una alta estabilidad de expresión entre las muestras. Sin embargo, este gen no fue uno de los más estables, pero se ubicó dentro de los 5 más estables del grupo de genes candidatos evaluados.

Jung *et al.*, determinaron que los mejores genes de referencia en muestras de CRCC eran *PPIA* y *TBP*. En la presente investigación se obtuvo un resultado similar para *TBP*, clasificado como el mejor gen de referencia para muestras de CRCC. Sin embargo, *PPIA* fue el sexto gen más estable del total de genes candidatos evaluados, contrariamente a lo reportado por Jung *et al.*

Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan parcialmente con los datos obtenidos por Wierzbicki *et al.*, quienes luego de evaluar muestras de CRCC metastásico y no metastásico provenientes de pacientes Poloneses, determinaron como genes de referencia óptimos *GUSB* y *RPL13* (Wierzbicki *et al.* 2014).

En los resultados de este trabajo *GUSB* fue el tercer gen de candidato con el valor $geNorm$ M más bajo, por lo tanto, el más estable. Mientras que, *RPL13* fue considerado el gen de expresión menos estable por tener un valor de $geNorm$ M de 0.9.

Es muy importante considerar el tipo de conservación que tuvieron las muestras en el análisis de resultados de expresión de los genes de referencia. Glen *et al.* obtuvieron que para muestras de CRCC embebidas en parafina los genes de

referencia óptimos fueron *ACTB*, *RPL13A*, *GUSB*, *RPLP0*, *HPRT1* y *SDHA*; mientras que para tejido fresco congelado fueron: *ACTB*, *RPL13A* y *GUSB*.

Las diferencias obtenidas de acuerdo al tipo de muestra, se puede fundamentar en que el tipo de conservación de los tejidos impacta la calidad del ARN, lo cual termina teniendo un rol muy importante en los niveles de expresión de los genes evaluados. Las muestras utilizadas en mi análisis, fueron muestras de CRCC criopreservadas en OCT, lo cual permite una mejor conservación del ARN.

Además, antes de la obtención del ARN, se realizó la evaluación de la presencia de necrosis o fibrosis en las muestras tumorales puesto que podría afectar a la calidad ARN durante la extracción, lo que impactaría en los resultados de expresión (Millier *et al.* 2017; Fleige & Pfaffl 2006)

En ese sentido, en el presente estudio se confirmó la calidad del ARN extraído en muestras tumorales y no tumorales de CRCC criopreservadas desde el 2007 en el Banco de Tejidos Tumorales (BTT) del INEN por lo que los resultados obtenidos de los análisis de expresión génica son confiables.

Adicionalmente los genes de referencia validados en el presente estudio podrían servir también como parte de los protocolos de control de calidad del BTT mediante la confirmación de su presencia en las muestras.

El software geNorm, propone un orden de estabilidad de expresión entre los genes evaluados. Sin embargo, los mismos autores señalan que dichos resultados no deben ser considerados como absolutos sino como una referencia en base a los análisis estadísticos (Vandesmopele *et al.*, 2002). Por consiguiente, además de considerar los resultados de geNorm, también es importante evaluar las características de cada gen al momento del diseño del experimento a realizar.

Algunos autores señalan al gen *RNA18S* como un gen de referencia ideal para análisis RT-qPCR en muestras de diversos orígenes (Kuchipudi *et al.* 2012; Bas *et al.* 2004; Ropenga *et al.* 2004; Saviozzi *et al.* 2006).

No obstante, es indispensable tener en cuenta varios argumentos a considerar antes de usarlo como gen de referencia. En primer lugar, el *RNA18S* comprende el 20% del contenido de ARN total de las células, presentándose en una cantidad

proporcionalmente mayor en comparación con el ARNm (Kulkarni *et al.* 2011; Van Acker *et al.* 2019). Esta diferencia en proporciones podría provocar imprecisión en la cuantificación relativa de expresión de genes de interés.

Una de las soluciones más utilizada es diluir las muestras de ADNc antes del análisis (Bogdanović *et al.* 2013), sin embargo, este paso adicional implica un riesgo de error al momento de la dilución. Adicionalmente, por el hecho de ser un ARN ribosomal, este gen no podría utilizarse como gen de referencia cuando la retrotranscripción se realiza con cebadores oligo-dT cuando solo se tiene como molde ARNm (Gallup & Ackermann 2006).

Sin embargo, un factor muy importante a considerar luego de la selección de los genes basado en los resultados estadísticos de los softwares de identificación de genes de referencia, es el conocimiento de la vía metabólica en la que participa cada gen. Se ha reportado que *GUSB* es un gen involucrado en la hidrólisis de glicosaminoglicanos (Xie *et al.* 2014); mientras que, *TBP* codifica a una proteína que actúa como factor de transcripción en la síntesis de ARN (Ortiz DE 2016); y *HMBS* participa en la vía sintética de las hemoproteínas (Zaidi *et al.* 2017).

Por lo tanto, las vías metabólicas en las que participan estos genes no están relacionadas entre sí, eliminando la posibilidad de correulación entre ellos, lo que afectaría los resultados en estudios de expresión génica.

Además, se ha reportado que el análisis de expresión de genes de interés debe normalizarse con al menos tres genes de referencia previamente validados para las condiciones experimentales del estudio (Jacob *et al.* 2013).

En ese sentido, se utilizaron los 3 genes de referencia con mayor estabilidad (*TBP*, *GUSB* y *HMBS*), validados para pacientes peruanos con CRCC, para la normalización del gen de interés *TP53*.

En condiciones normales, la proteína codificada por el gen *TP53* (p53) se asocia al ADN para la estimulación de la proteína p21, la cual forma un complejo con la proteína estimulante de división celular y detiene el proceso. Pero, cuando el gen *TP53* presenta mutaciones, la proteína p53 mutante no logra adherirse al ADN y la proteína p21 no puede cumplir su función para detener la división celular, originándose así el crecimiento descontrolado de las células y uno de los principales factores del crecimiento tumoral (Lane & Levine 2010).

En diversos tipos de cáncer las mutaciones de *TP53* se asocian con la resistencia a terapias y pronóstico desfavorable debido a la supresión de los mecanismos apoptóticos en respuesta al estrés celular que ocurre en la vía de p53 (Nakayama & Oshima 2019; Zhang *et al.* 2018; Duffy *et al.* 2018; Sand *et al.* 2019).

Si bien el CRCC es caracterizado también por una resistencia notablemente elevada a la radioterapia y a la quimioterapia, se ha reportado previamente que presenta una tasa baja de mutaciones del gen *TP53* (3-33%) (Michael & Pandha 2003).

Por lo que al presentarse *TP53* en su tipo silvestre en la mayoría de estos tumores, se sospecha que la función de la proteína p53 pueda ser reprimida por otros mecanismos que podrían estar asociados a la expresión alterada de sus reguladores negativos, o por el contrario la pérdida de sus reguladores positivos (Tannapfel *et al.* 2001).

En las muestras peruanas del INEN evaluadas en el presente estudio se detectó la expresión de *TP53* silvestre de en tejido tumoral y no tumoral, en concordancia con lo reportado anteriormente para esta neoplasia (Godlewski *et al.* 2017). Luego de la normalización con los genes de referencia se observó una sobre expresión de *TP53* en las muestras tumorales en comparación con sus pares no tumorales.

Los genes de referencia validados también se utilizaron para la normalización del gen *EGFR*. Se detectó una alta frecuencia de la expresión de este gen en muestras tumorales y no tumorales, lo que coincide con lo reportado previamente en la bibliografía (Minner *et al.* 2012). Además, se presume que la alta frecuencia de expresión del gen *EGFR* en tumores renales del subtipo células claras puede estar asociado a la pérdida de función del gen Von Hippel-Lindau (*VHL*) que ocurre en la mayoría de casos, ya que esta pérdida conlleva a la señalización autocrina del *EGFR*. (De Paulsen *et al.* 2001).

Algunos autores han propuesto el uso de *EGFR* como un marcador pronóstico de la enfermedad, pero los resultados del análisis de su aplicación son controversiales (Hofmockel *et al.* 1997; Cohen *et al.* 2007; Merseburger *et al.* 2005). En el presente estudio se encontró que su expresión fue alta en la mayoría de tumores independientemente al estado del paciente, por lo que se requiere de estudios

adicionales para poder determinar su implicancia en la progresión de la neoplasia y/o el desarrollo de metástasis.

Por lo expuesto anteriormente, la determinación de genes de referencia para el estudio de CRCC en la población peruana es fundamental para poder profundizar los estudios de expresión génica que permitan una mejor comprensión de los mecanismos que influyen en su alta resistencia a terapias y poder desarrollar tratamientos dirigidos que aporten a una mejor del pronóstico del paciente. En ese sentido, el protocolo presentado en esta investigación puede ser también aplicado en la identificación de genes de referencia para otros tipos de neoplasias a fin de poder ampliar los estudios e implementar mejoras en su manejo.

9. CONCLUSIONES

- Se evidencio una adecuada calidad de ARN de las muestras tumorales y no tumorales de carcinoma renal de células claras (CRCC), lo que aseguro la confiabilidad de los resultados obtenidos de la expresión génica.
- La validación de genes determino que el factor de normalización óptimo para un experimento de expresión génica mediante RT-qPCR en muestras de CRCC procedentes de pacientes peruanos del INEN puede ser calculado como la media geométrica de los tres genes de referencia con mayor estabilidad, que en este estudio fueron TBP, GUSB y HMBS
- Es necesario validar los genes de referencia previamente reportados por otros autores cuando se realizan ensayos con otros tipos de muestras o que provienen de una metodología de conservación diferente ya que su expresión puede variar y llevar a una interpretación errónea de los resultados.
- La cuantificación relativa de los genes diana TP53 y EGFR con los genes de referencia validados evidencio una sobre expresión significativamente mayor en las muestras tumorales con respecto a las no tumorales.

10. PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se describe un protocolo elaborado con todos los pasos necesarios que aseguran la confiabilidad de los resultados y por lo tanto puede ser aplicado también en la validación de genes de referencia para el estudio de otras neoplasias.

Los genes de referencia validados en este trabajo permitirán así mismo, profundizar el conocimiento del desarrollo del carcinoma renal en el Perú, mediante su uso en proyectos de biología molecular.

En los procesos de control de calidad de ácidos nucleicos en los biobancos que crio preservan muestras de tejido renal, los genes de referencia validados en la presente investigación son aptos para ser utilizados.

Adicionalmente, se podría profundizar los estudios sobre la expresión de los genes de referencia validados mediante el análisis de muestras obtenidas con cortes por micro disección laser.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, G. (2020). A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*, 42(3), 48-53.
- Ball, R. Y. (2005). Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. *Histopathology*, 46(5), 586-586.
- Bas, A., Forsberg, G., Hammarström, S., & Hammarström, M. L. (2004). Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, β -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*, 59(6), 566-573.
- Bjerregaard, H., Pedersen, S., Kristensen, S. R., & Marcussen, N. (2011). Reference genes for gene expression analysis by real-time reverse transcription

polymerase chain reaction of renal cell carcinoma. *Diagnostic Molecular Pathology*, 20(4), 212-217.

Bogdanović, M. D., Dragičević, M. B., Tanić, N. T., Todorović, S. I., Mišić, D. M., Živković, S. T., & Simonović, A. D. (2013). Reverse transcription of 18S rRNA with poly (dT) 18 and other homopolymers. *Plant Molecular Biology Reporter*, 31(1), 55-63. Bustin *et al.*, 2013. The need for transparency and good practices in the qPCR literature. , 10(11), pp.1063–1067

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments..

Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, 25(2), 169-193.

Cohen, D., Lane, B., Jin, T., Magi-Galluzzi, C., Finke, J., Rini, B. I., & Zhou, M. (2007). The prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in Clear-cell renal cell carcinoma: A call for standardized methods for immunohistochemical evaluation. *Clinical genitourinary cancer*, 5(4), 264-270.

DeCastro, G. J., & McKiernan, J. M. (2008). Epidemiology, clinical staging, and presentation of renal cell carcinoma. *Urologic Clinics of North America*, 35(4), 581-592.

Departamento de oncología medica INEN (2013) Guia practica clinica de neoplasias malignas de riñon, excepto de la pelvis renal. Disponible en: http://www.inen.sld.pe/portal/documentos/pdf/normas_tecnicas/2013/02122014_GUIA_DE_PRACTICA_CLINICA_DE_NEOPLASIAS_MALIGNAS_DE_RI%C3%91%C3%93N_EXCEPTO_DE_LA_PELVIS_RENAL.pdf

De Kok, J. B., Roelofs, R. W., Giesendorf, B. A., Pennings, J. L., Waas, E. T., Feuth, T., ... & Span, P. N. (2005). Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Laboratory investigation*, 85(1), 154-159.

De Paulsen, N., Brychzy, A., Fournier, M. C., Klausner, R. D., Gnarr, J. R., Pause, A., & Lee, S. (2001). Role of transforming growth factor- α in von Hippel–Lindau (VHL)-/- clear cell renal carcinoma cell proliferation: A possible mechanism coupling VHL tumor suppressor inactivation and tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(4), 1387-1392.

- Du, Z., Chen, W., Xia, Q., Shi, O., & Chen, Q. (2020). Trends and projections of kidney cancer incidence at the global and national levels, 1990–2030: a Bayesian age-period-cohort modeling study. *Biomarker research*, 8(1), 1-10.
- Duffy, M. J., Synnott, N. C., & Crown, J. (2018). Mutant p53 in breast cancer: potential as a therapeutic target and biomarker. *Breast cancer research and treatment*, 170(2), 213-219.
- Escudier, B., Albiges, L., & Sonpavde, G. (2013). Optimal management of metastatic renal cell carcinoma: current status. *Drugs*, 73(5), 427-438.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer
- Figlin, R. A. (1999). Renal cell carcinoma: management of advanced disease. *The Journal of urology*, 161(2), 381-387.
- Fleige, S., & Pfaffl, M. W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular aspects of medicine*, 27(2-3), 126-139.
- Gallup, J. M., & Ackermann, M. R. (2006). Addressing fluorogenic real-time qPCR inhibition using the novel custom Excel file system 'FocusField2-6GallupqPCRSet-upTool-001' to attain consistently high fidelity qPCR reactions. *Biological Procedures Online*, 8(1), 87-153.
- Garibyan, L. & Avashia, N., (2013). Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), pp.1–4.
- Glenn, S. T., Jones, C. A., Liang, P., Kaushik, D., Gross, K. W., & Kim, H. L. (2007). Expression profiling of archival renal tumors by quantitative PCR to validate prognostic markers. *Biotechniques*, 43(5), 639-647.
- Godlewski, J., Krazinski, B. E., Kowalczyk, A. E., Kiewisz, J., Kiezun, J., Kwiatkowski, P., & Kmiec, Z. (2017). Expression and prognostic significance of EP300, TP53 and BAX in clear cell renal cell carcinoma. *Anticancer Research*, 37(6), 2927-2937.
- Goidin, D., Mamessier, A., Staquet, M. J., Schmitt, D., & Berthier-Vergnes, O. (2001). Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and β -actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Analytical biochemistry*, 295(1), 17-21.

- Grignon, D. J., & Che, M. (2005). Clear cell renal cell carcinoma. *Clinics in laboratory medicine*, 25(2), 305-316.
- Hofmockel, G., Riess, S., Bassukas, I. D., & Dämmrich, J. (1997). Epidermal growth factor family and renal cell carcinoma: expression and prognostic impact. *European urology*, 31, 478-484.
- Jacob, F., Guertler, R., Naim, S., Nixdorf, S., Fedier, A., Hacker, N. F., & Heinzelmann-Schwarz, V. (2013). Careful selection of reference genes is required for reliable performance of RT-qPCR in human normal and cancer cell lines. *PloS one*, 8(3), e59180.
- Jung, M., Ramankulov, A., Roigas, J., Johannsen, M., Ringsdorf, M., Kristiansen, G., & Jung, K. (2007). In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR. *BMC molecular biology*, 8(1), 1-13.
- Kheirelseid, E. A., Chang, K. H., Newell, J., Kerin, M. J., & Miller, N. (2010). Identification of endogenous control genes for normalisation of real-time quantitative PCR data in colorectal cancer. *BMC molecular biology*, 11(1), 1-13.
- Krasnov, G. S., Oparina, N. Y., Dmitriev, A. A., Kudryavtseva, A. V., Anedchenko, E. A., Kondrat'Eva, T. T., ... & Senchenko, V. N. (2011). RPN1, a new reference gene for quantitative data normalization in lung and kidney cancer. *Molecular Biology*, 45(2), 211-220.
- Kuchipudi, S. V., Tellabati, M., Nelli, R. K., White, G. A., Perez, B. B., Sebastian, S., ... & Chang, K. C. (2012). 18S rRNA is a reliable normalisation gene for real time PCR based on influenza virus infected cells. *Virology journal*, 9(1), 1-7.
- Kulkarni, B., Mohammed, I., Hopkinson, A., & Dua, H. S. (2011). Validation of endogenous control genes for gene expression studies on human ocular surface epithelium. *PloS one*, 6(8), e22301.
- Laird, A., O'Mahony, F. C., Nanda, J., Riddick, A. C., O'Donnell, M., Harrison, D. J., & Stewart, G. D. (2013). Differential expression of prognostic proteomic markers in primary tumour, venous tumour thrombus and metastatic renal cell cancer tissue and correlation with patient outcome. *PloS one*, 8(4), e60483.
- Lane, D., & Levine, A. (2010). p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(12), a000893.

Leibovich, B. C., Pantuck, A. J., Bui, M. H., Ryu-Han, K., Zisman, A., Figlin, R., & Beldegrun, A. (2003). Current staging of renal cell carcinoma. *Urologic Clinics*, 30(3), 481-497.

Life technologies (2012) Real-time PCR handbook.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408.

Lopez-Beltran, A., Scarpelli, M., Montironi, R., & Kirkali, Z. (2006). 2004 WHO classification of the renal tumors of the adults. *European urology*, 49(5), 798-805.

Mackay, I. M., Arden, K. E., & Nitsche, A. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic acids research*, 30(6), 1292-1305.

Medina-Rico, M., Ramos, H. L., Lobo, M., Romo, J., & Prada, J. G. (2018). Epidemiology of renal cancer in developing countries: Review of the literature. *Canadian Urological Association Journal*, 12(3), E154.

Merseburger, A. S., Hennenlotter, J., Simon, P., Kruck, S., Koch, E., Horstmann, M., & Kuczyk, M. A. (2005). Membranous expression and prognostic implications of epidermal growth factor receptor protein in human renal cell cancer. *Anticancer research*, 25(3B), 1901-1907.

Michael, A., & Pandha, H. S. (2003). Renal-cell carcinoma: tumour markers, T-cell epitopes, and potential for new therapies. *The lancet oncology*, 4(4), 215-223.

Millier, M. J., Stamp, L. K., & Hessian, P. A. (2017). Digital-PCR for gene expression: Impact from inherent tissue RNA degradation. *Scientific reports*, 7(1), 1-7.

Minner, S., Rump, D., Tennstedt, P., Simon, R., Burandt, E., Terracciano, L., & Eichelberg, C. (2012). Epidermal growth factor receptor protein expression and genomic alterations in renal cell carcinoma. *Cancer*, 118(5), 1268-1275.

Motzer, R. J., & Russo, P. (2000). Systemic therapy for renal cell carcinoma. *The Journal of urology*, 163(2), 408-417.

Muglia, V. F., & Prando, A. (2015). Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. *Radiologia brasileira*, 48, 166-174.

Nakayama, M., & Oshima, M. (2019). Mutant p53 in colon cancer. *Journal of molecular cell biology*, 11(4), 267-276.

- Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols*, 1(3), 1559-1582.
- Ortiz Domingo, É. (2016). Control de calidad del RNA de las muestras del Biobanco del IVO (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).
- Pascual, D., & Borque, A. (2008). Epidemiology of kidney cancer. *Advances in urology*, 2008.
- Pfaffl, M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. *AZ of quantitative PCR*, 1, 89-113.
- Potashnikova, D., Gladkikh, A., & Vorobjev, I. A. (2015). Selection of superior reference genes' combination for quantitative real-time PCR in B-cell lymphomas. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 45(1), 64-72.
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics*, 3(3), 71-85
- Rienzo, M., Schiano, C., Casamassimi, A., Grimaldi, V., Infante, T., & Napoli, C. (2013). Identification of valid reference housekeeping genes for gene expression analysis in tumor neovascularization studies. *Clinical and Translational Oncology*, 15(3), 211-218.
- Ropenga, A., Chapel, A., Vandamme, M., & Griffiths, N. M. (2004). Use of reference gene expression in rat distal colon after radiation exposure: a caveat. *Radiation research*, 161(5), 597-602.
- Sand, F. L., Nielsen, D. M. B., Frederiksen, M. H., Rasmussen, C. L., & Kjaer, S. K. (2019). The prognostic value of p16 and p53 expression for survival after vulvar cancer: A systematic review and meta-analysis. *Gynecologic Oncology*, 152(1), 208-217.
- Saviozzi, S., Cordero, F., Iacono, M. L., Novello, S., Giorgio, S. V., & Calogero, R. A. (2006). Selection of suitable reference genes for accurate normalization of gene expression profile studies in non-small cell lung cancer. *BMC cancer*, 6(1), 1-10.
- Skrzypski, M. (2008). Quantitative reverse transcriptase real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) in translational oncology: lung cancer perspective. *Lung Cancer*, 59(2), 147-154.

- Sundaram, V. K., Sampathkumar, N. K., Massaad, C., & Grenier, J. (2019). Optimal use of statistical methods to validate reference gene stability in longitudinal studies. *PLoS one*, 14(7).
- Talseth-Palmer, B. A., & Scott, R. J. (2011). Genetic variation and its role in malignancy. *International journal of biomedical science: IJBS*, 7(3), 158.
- Tannapfel, A., Busse, C., Weinans, L., Benicke, M., Katalinic, A., Geißler, F., ... & Wittekind, C. (2001). INK4a-ARF alterations and p53 mutations in hepatocellular carcinomas. *Oncogene*, 20(48), 7104-7109.
- Van Acker, S. I., Van Acker, Z. P., Haagdoorens, M., Pintelon, I., Koppen, C., & Zakaria, N. (2019). Selecting appropriate reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction studies in isolated and cultured ocular surface epithelia. *Scientific Reports*, 9(1), 1-11.
- Van Amsterdam, P., Companjen, A., Brudny-Kloeppel, M., Golob, M., Luedtke, S., & Timmerman, P. (2013). The European Bioanalysis Forum community's evaluation, interpretation and implementation of the European Medicines Agency guideline on Bioanalytical Method Validation. *Bioanalysis*, 5(6), 645-659.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3(7), 1-12.
- Wierzbicki, P. M., Klacz, J., Rybarczyk, A., Slebioda, T., Stanislawowski, M., Wronska, A., ... & Kmiec, Z. (2014). Identification of a suitable qPCR reference gene in metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Tumor Biology*, 35(12), 12473-12487.
- Wisnieski, F., Calcagno, D. Q., Leal, M. F., dos Santos, L. C., de Oliveira Gigek, C., Chen, E. S., & Smith, M. D. A. C. (2013). Reference genes for quantitative RT-PCR data in gastric tissues and cell lines. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 19(41), 7121.
- Wotschovsky, Z., Meyer, H. A., Jung, M., Fendler, A., Wagner, I., Stephan, C., & Jung, K. (2011). Reference genes for the relative quantification of microRNAs in renal cell carcinomas and their metastases. *Analytical biochemistry*, 417(2), 233-241.

- Wu, Y. Y., & Rees, J. L. (2000). Variation in epidermal housekeeping gene expression in different pathological states. *Acta dermato-venereologica*, 80(1).
- Xie, F. W., Peng, Y., Chen, X., Li, J., Wang, W., Yu, Z., & Ouyang, X. (2014). Relationship between the expression of CES2, UGT1A1, and GUSB in colorectal cancer tissues and aberrant methylation. *Neoplasma*, 61(1), 99-109.
- Zaidi, H. A., Auble, D. T., & Bekiranov, S. (2017). RNA synthesis is associated with multiple TBP-chromatin binding events. *Scientific reports*, 7(1), 1-12.
- Zhang, Y., Dube, C., Gibert, M., Cruickshanks, N., Wang, B., Coughlan, M., & Abounader, R. (2018). The p53 pathway in glioblastoma. *Cancers*, 10(9), 297.
- Zhong, H., & Simons, J. W. (1999). Direct comparison of GAPDH, β -actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochemical and biophysical research communications*, 259(3), 523-526.

12. ANEXOS

Anexo 1: Consentimiento informado



INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS
"Dr. Eduardo Cáceres Graziani"

BANCO DE TEJIDOS TUMORALES

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Usted ha sido admitido(a) en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN), para establecer un diagnóstico e iniciar un tratamiento de la especialidad, con este fin hay la necesidad de extirpar el tumor o material biológico que este relacionado con su enfermedad.

Para obtener un mejor conocimiento acerca de cómo se desarrollan estas patologías en el organismo, se realizan estudios de investigación científica, de esta manera es posible descubrir tratamientos más eficaces y métodos diagnósticos más específicos, estos estudios se realizan en fragmentos de tejidos retirados durante la cirugía los cuales son almacenados en lugares apropiados denominados Bancos de Tejidos Tumorales.

Usualmente luego de usar el tejido o material biológico para los exámenes necesarios de su diagnóstico, lo sobrante de tejido o material biológico extraído, es eliminado.

Para obtener esta muestra de tejido o material biológico usted no se expone a riesgos adicionales en su tratamiento o cirugía, tampoco aumento del tiempo operatorio o cirugía más amplia.

Si usted acepta que parte de su tumor o muestra biológica sea conservada en el Banco de Tejidos Tumorales del INEN, su muestra tendrá un código, manteniendo su identidad en secreto, así como la confidencialidad de los datos obtenidos en los estudios.

El consentimiento de usar el material biológico para el desarrollo de investigación, no implica beneficios económicos sobre los posibles resultados derivados de la investigación, así como tampoco usted realizara ningún pago por el procedimiento.

Si usted no esta de acuerdo en donar el material biológico para ser conservado en el Banco de Tejidos Tumorales, su decisión no influenciara en su tratamiento.

Si tuviera preguntas sobre los aspectos éticos del funcionamiento del Banco de Tejidos Tumorales, por favor póngase en contacto con el Comité de Ética en Investigación Biomédica del INEN

Si usted acepta participar en este estudio firme su consentimiento voluntariamente.

DECLARACIÓN

Declaro estar conciente de las informaciones ahora prestadas habiendo leído atentamente y estando de acuerdo con el tenor y acepto que el tejido extirpado, no necesario para el diagnóstico de mi enfermedad, pueda ser usado en proyectos de investigación aprobados por el Comité de Ética en Investigación Biomédica del INEN, de forma confidencial y según la Legislación Peruana.

Lima,de..... de 20.....

.....
Firma del paciente o tutor

Nombre:
Nº DNI..


DR. ROLANDO CALDERÓN VELASCO
Presidente del Comité de Ética en Investigación Biomédica
Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

Anexo 2: Aprobación del protocolo por el comité revisor del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN)



PERÚ

Sector
Salud

Instituto Nacional de
Enfermedades Neoplásicas



"DECENIO DE LA IGUALDAD DE OPORTUNIDADES PARA MUJERES Y HOMBRES"
"AÑO DEL BICENTENARIO DEL PERÚ: 200 AÑOS DE INDEPENDENCIA"

Lima, 15 de enero 2021

CARTA N° 002-2021-CRPI-DI-DICON/INEN

Doctor
SANDRO CASAVILCA ZAMBRANO
Investigador Principal
Presente. -

De nuestra consideración:

Es grato dirigimos a usted para saludarle cordialmente y a la vez informarle que el Comité Revisor de Protocolos de Investigación del INEN, han revisado y **APROBADO** el protocolo Titulado: **"VALIDACIÓN DE GENES DE REFERENCIA PARA MUESTRAS DE CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS (INEN) MEDIANTE RT-qPCR". INEN 21-02**

De acuerdo con las normas deberá presentar un informe por correo electrónico al término del protocolo o en su defecto el seguimiento a los 6 o 12 meses sobre los avances del mismo a esta Oficina.

Sin otro particular, quedamos de usted.

Atentamente,

M.C. Rossana Ruiz Mendoza
Presidenta del CRPI-INEN

Cc/Archivo
lc.



INEN
Av. Argemosa Este 2520 -
Surquillo
Telf: 201-6500
www.inen.sld.pe
Lima - Perú

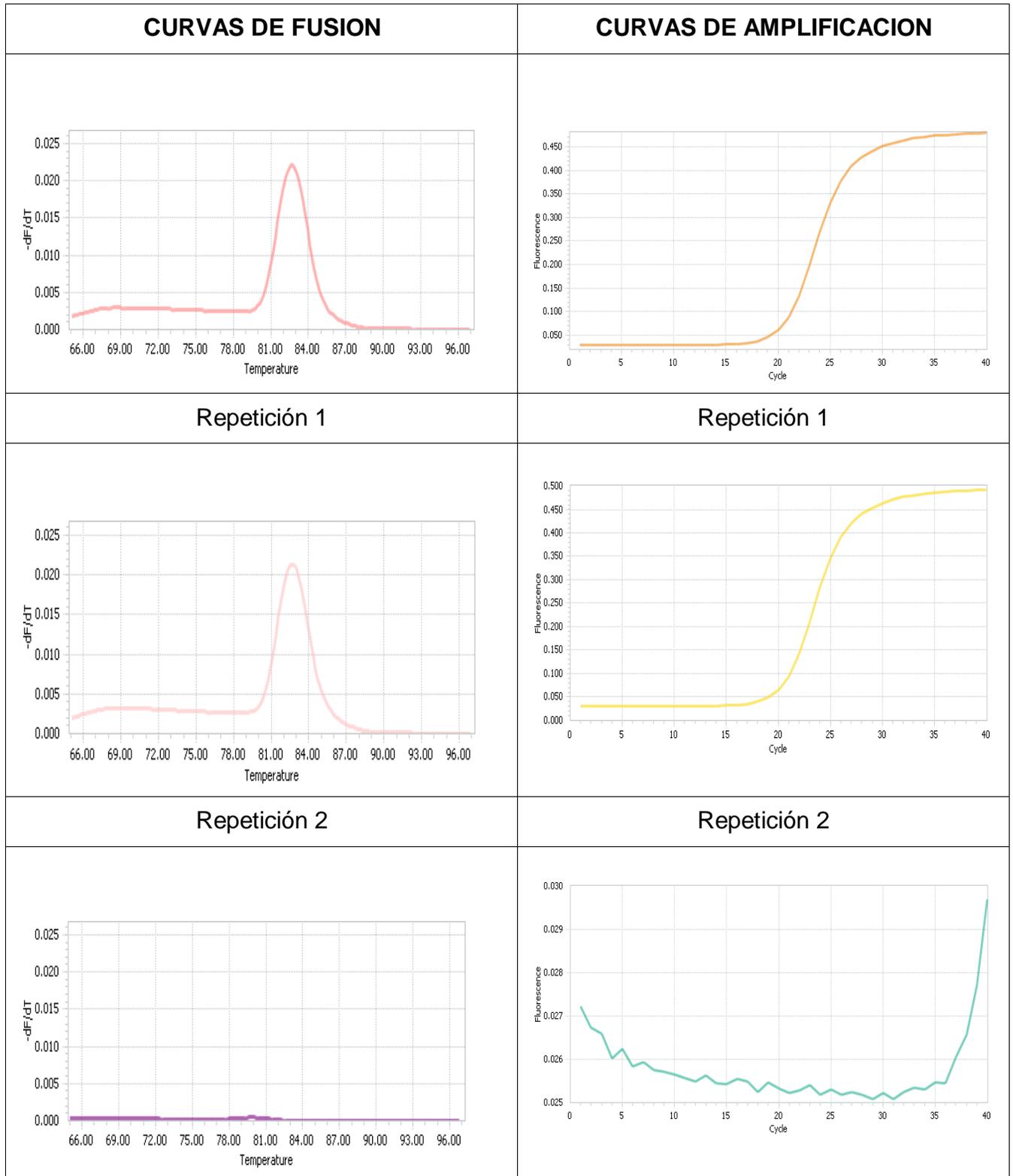
Anexo 3: Resultados de la evaluación histológica de las muestras

	MUESTRA TUMORAL	% TUMOR	%NECROSIS	%FIBROSIS
1	1 T	90 %	10%	---
2	2 T	90 %	5%	5%
3	3 T	85%	10%	5%
4	4 T	100%	---	----
5	5 T	95%	5%	----
6	6 T	80%	10%	10%
7	7 T	100%	---	---
8	8 T	90%	---	10%
9	9 T	90%	---	10%
10	10 T	95%	---	5%
11	11 T	80%	10%	10%
12	12 T	80%	15%	5%
13	13 T	95%	---	5%
14	14 T	95%	---	5%
15	15 T	70%	20%	10%
16	16 T	80%	10%	10%
17	17 T	90%	---	10%
18	18 T	70%	20%	10%
19	19 T	100%	---	---
20	20 T	90%	5%	5%
21	21 T	90%	5%	5%

Anexo 4: Cuantificación de las extracciones de ARN

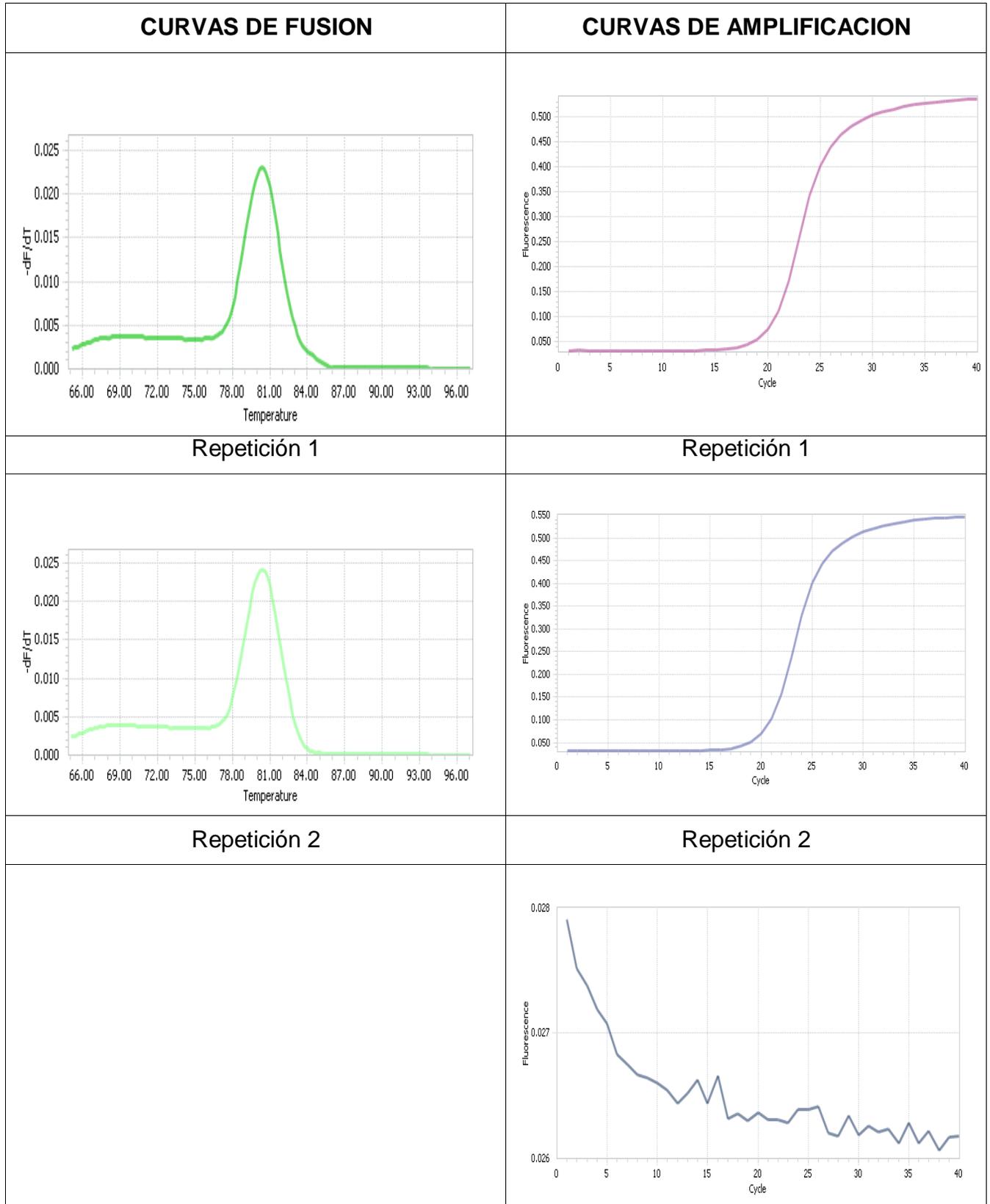
MUESTRA	ng/ul	260/280	260/230	MUESTRA	ng/ul	260/280	260/230
1 T	5115.8	1.99	2.09	1 NT	1712.4	1.97	2.18
2 T	1131.5	1.95	1.45	2 NT	1785.1	2	2.12
3 T	2041	1.97	2.01	3 NT	2425.3	1.99	2.07
4 T	1864.4	1.97	1.62	4 NT	1864.4	1.97	1.62
5 T	1442.6	1.9	1.5	5 NT	3994.1	2.02	2.14
6 T	643.3	1.95	1.67	6 NT	2787.7	1.899	2.15
7 T	951.9	1.94	1.89	7 NT	1466.4	1.98	2.18
8 T	1130.8	1.94	1.63	8 NT	1491.6	1.98	2.19
9 T	685.5	1.93	1.43	9 NT	2242.5	2.02	2.1
10 T	1164.2	1.93	1.58	10 NT	4154.7	2.02	2.16
11 T	1983.9	1.97	1.75	11 NT	965.9	1.92	2.09
12 T	1775	1.96	1.98	12 NT	1555.5	1.97	2.13
13 T	1222.7	1.95	1.87	13 NT	245.0	1.88	2.11
14 T	1620	1.96	1.56	14 NT	1989.8	1.98	2.1
15 T	1996.2	1.98	1.75	15 NT	1420	1.97	2.04
16 T	2208.1	1.98	1.76	16 NT	3501.2	2.03	2.22
17 T	781.6	1.9	1.66	17 NT	3066.3	2.02	2.07
18 T	1565.4	1.97	1.52	18 NT	2100.5	2.01	2.17
19 T	1795.6	1.97	1.5	19 NT	2533.8	2	2.14
20 T	789.3	1.98	1.69	20 NT	1184.8	1.99	2.19
21 T	2670.4	1.97	1.66	21 NT	4374.8	2.02	2.16

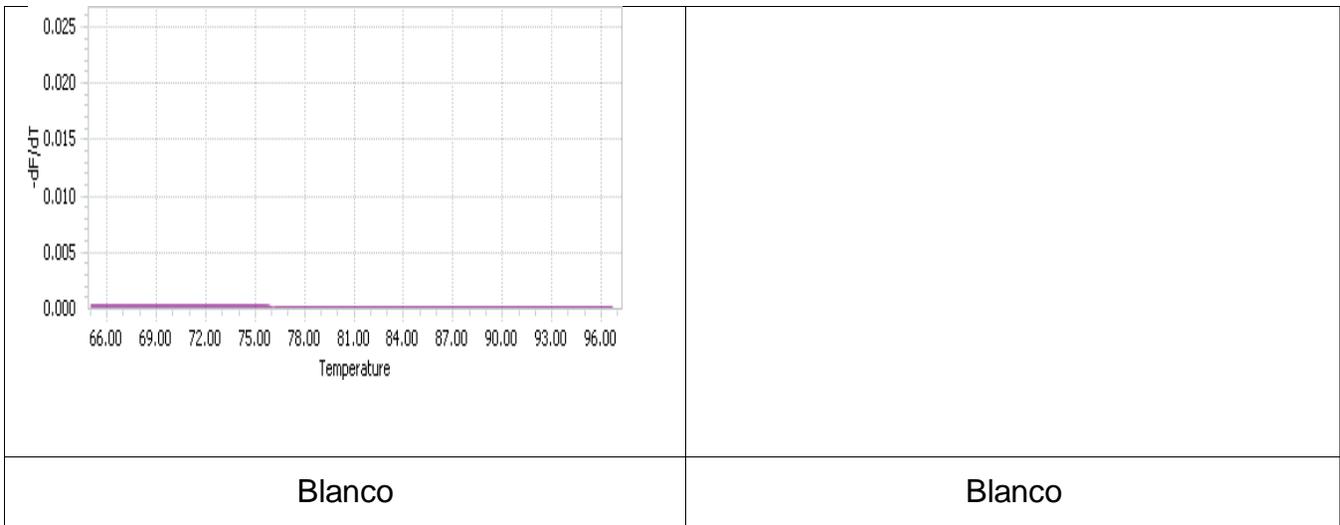
Anexo 5: Curvas de fusión y amplificación del gen GAPDH



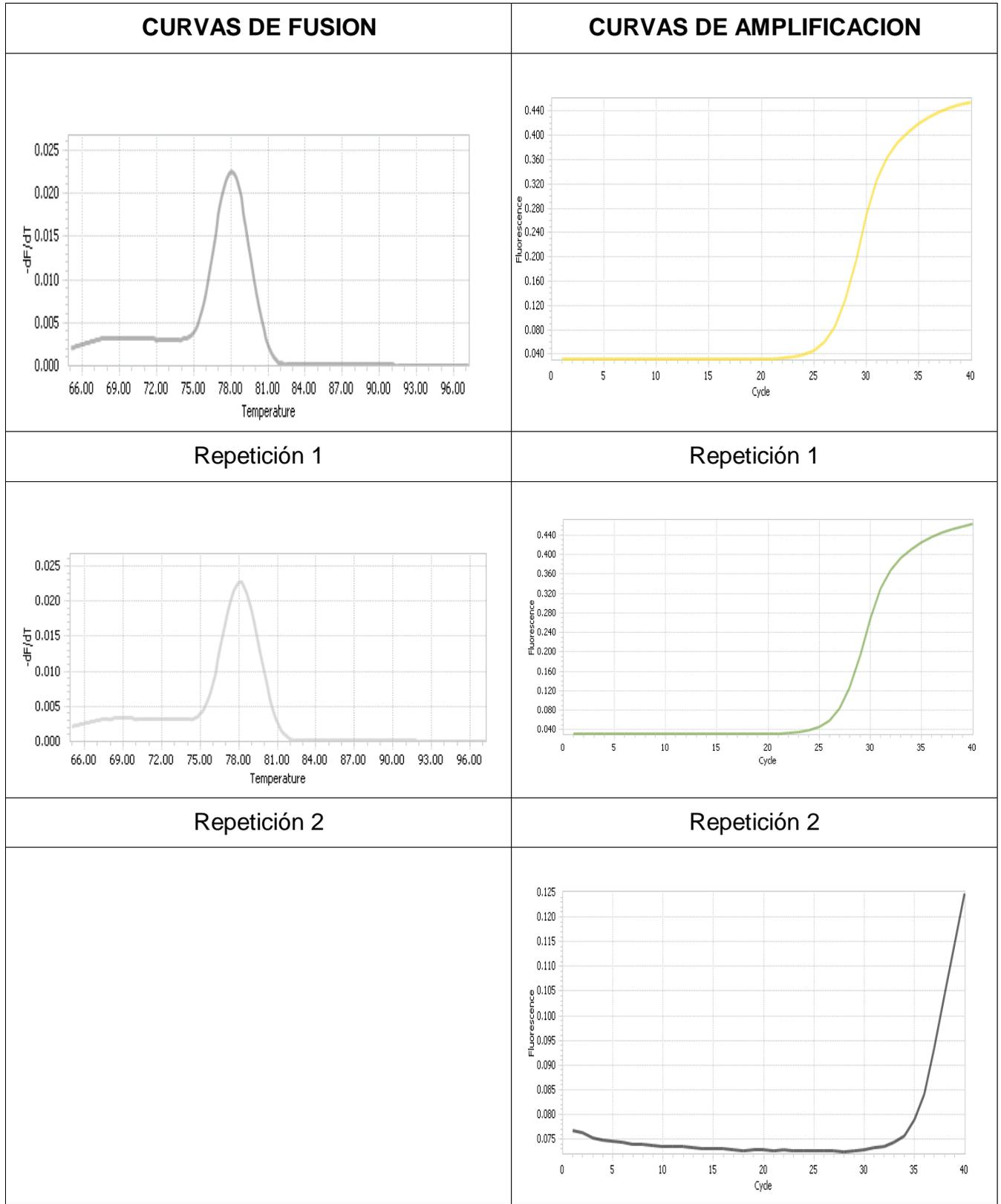
Blanco	Blanco
--------	--------

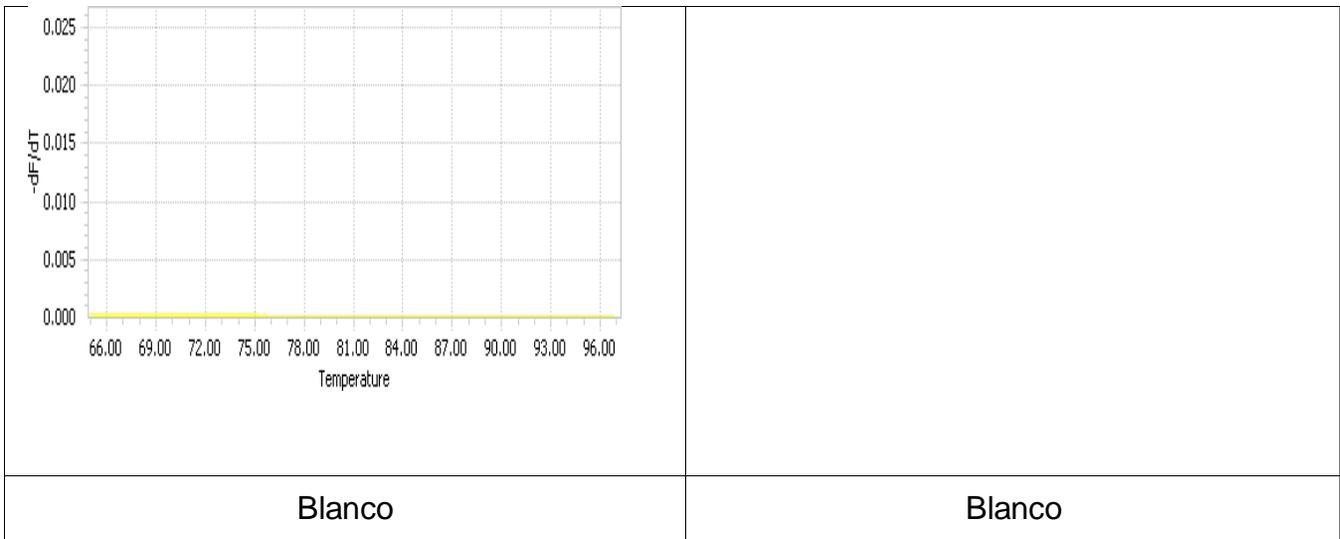
Anexo 6: Curvas de fusión y amplificación del gen B2M



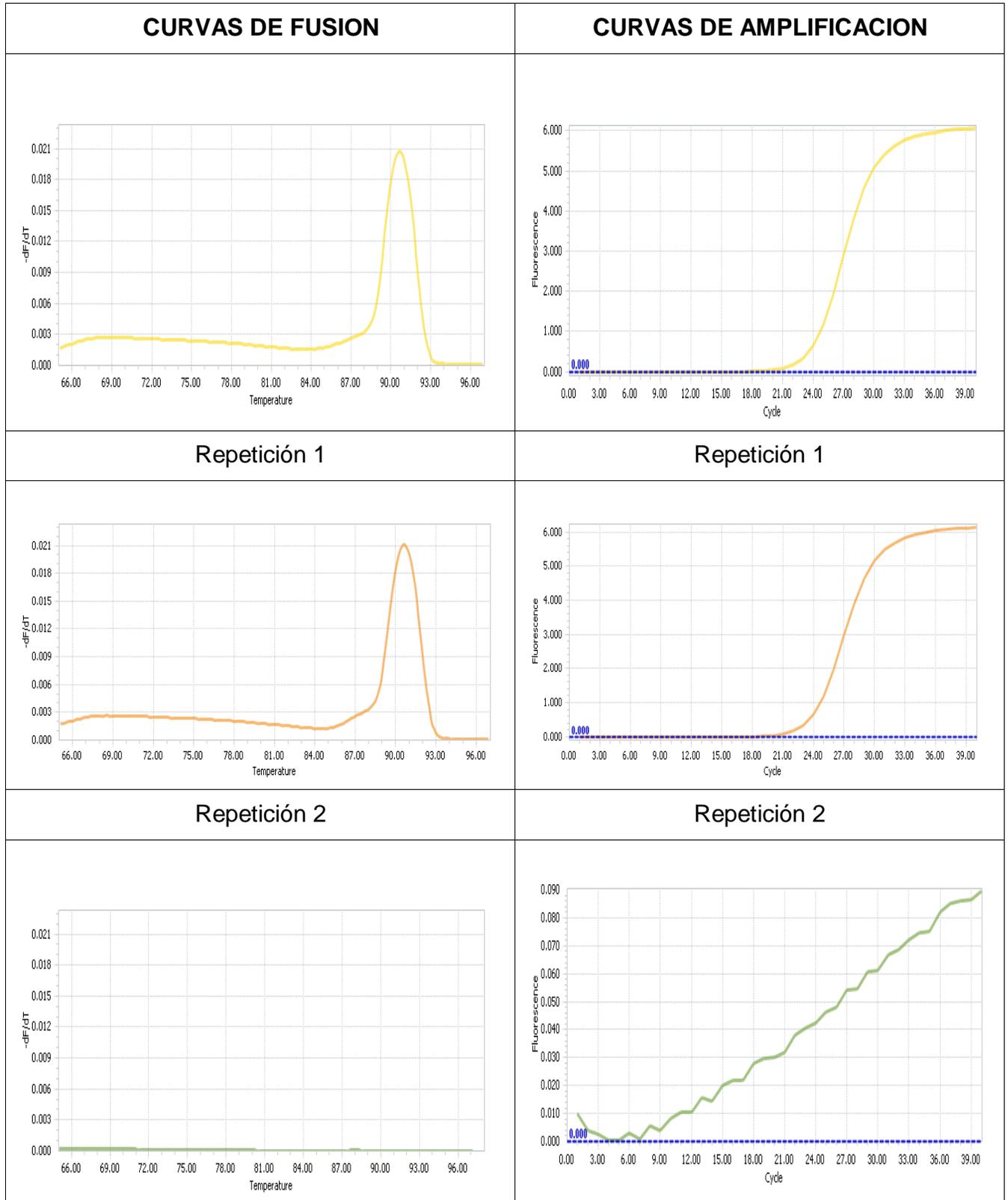


Anexo 7: Curvas de fusión y amplificación del gen HPRT1



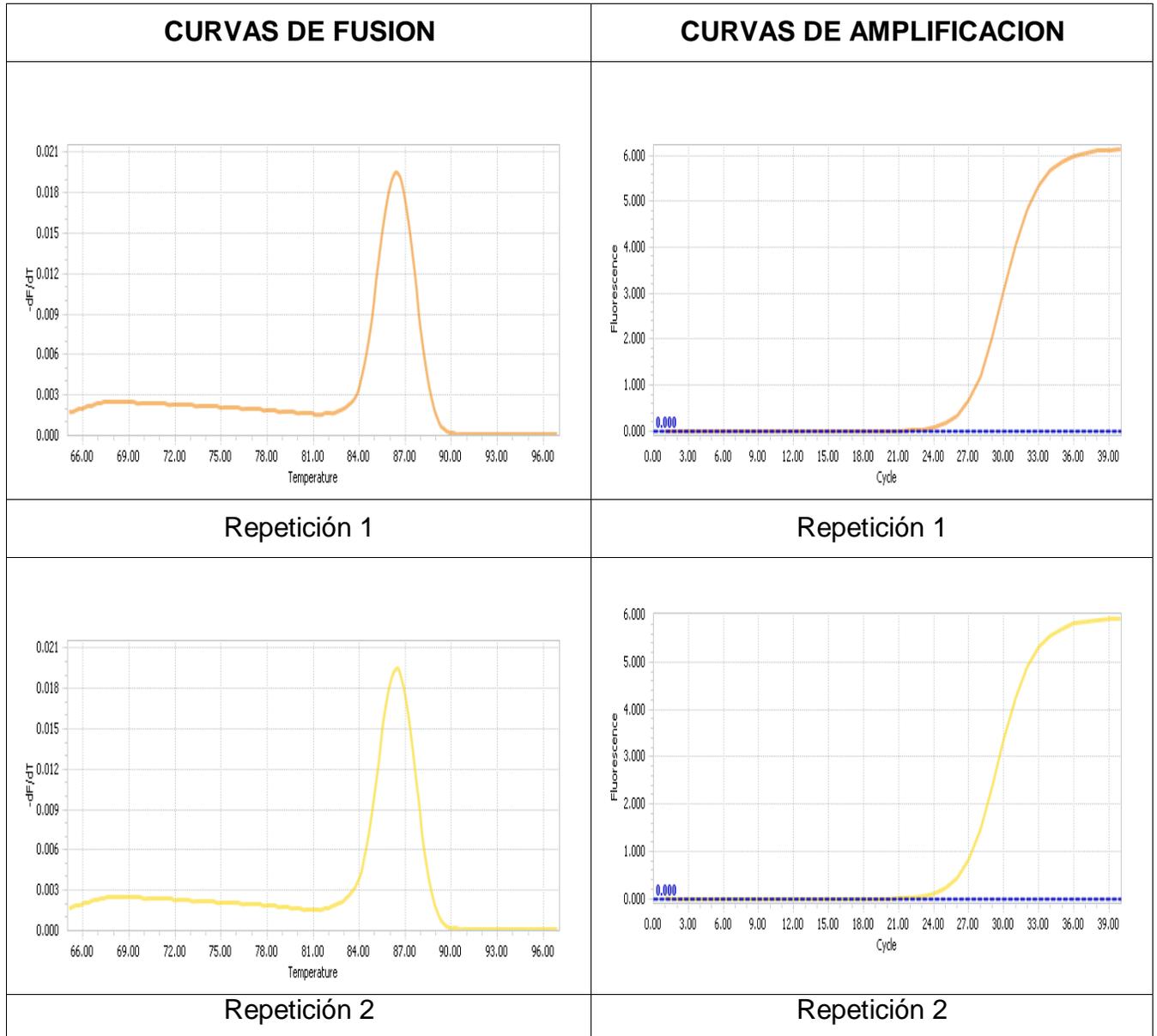


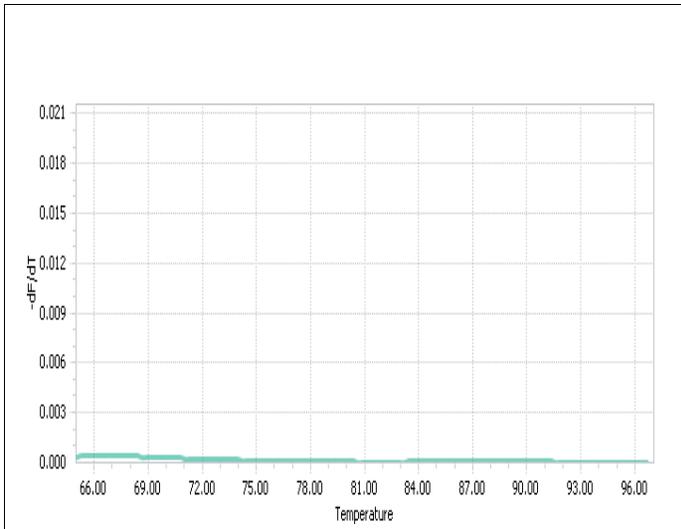
Anexo 8: Curvas de fusión y amplificación del gen RPL13



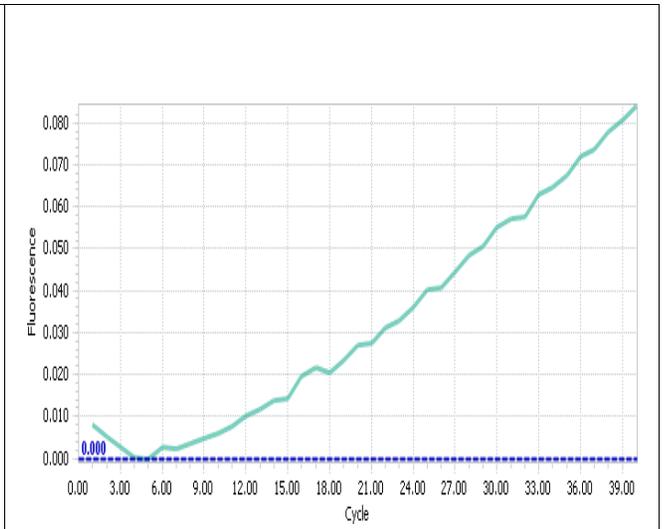
Blanco	Blanco
--------	--------

Anexo 9: Curvas de fusión y amplificación del gen TP53



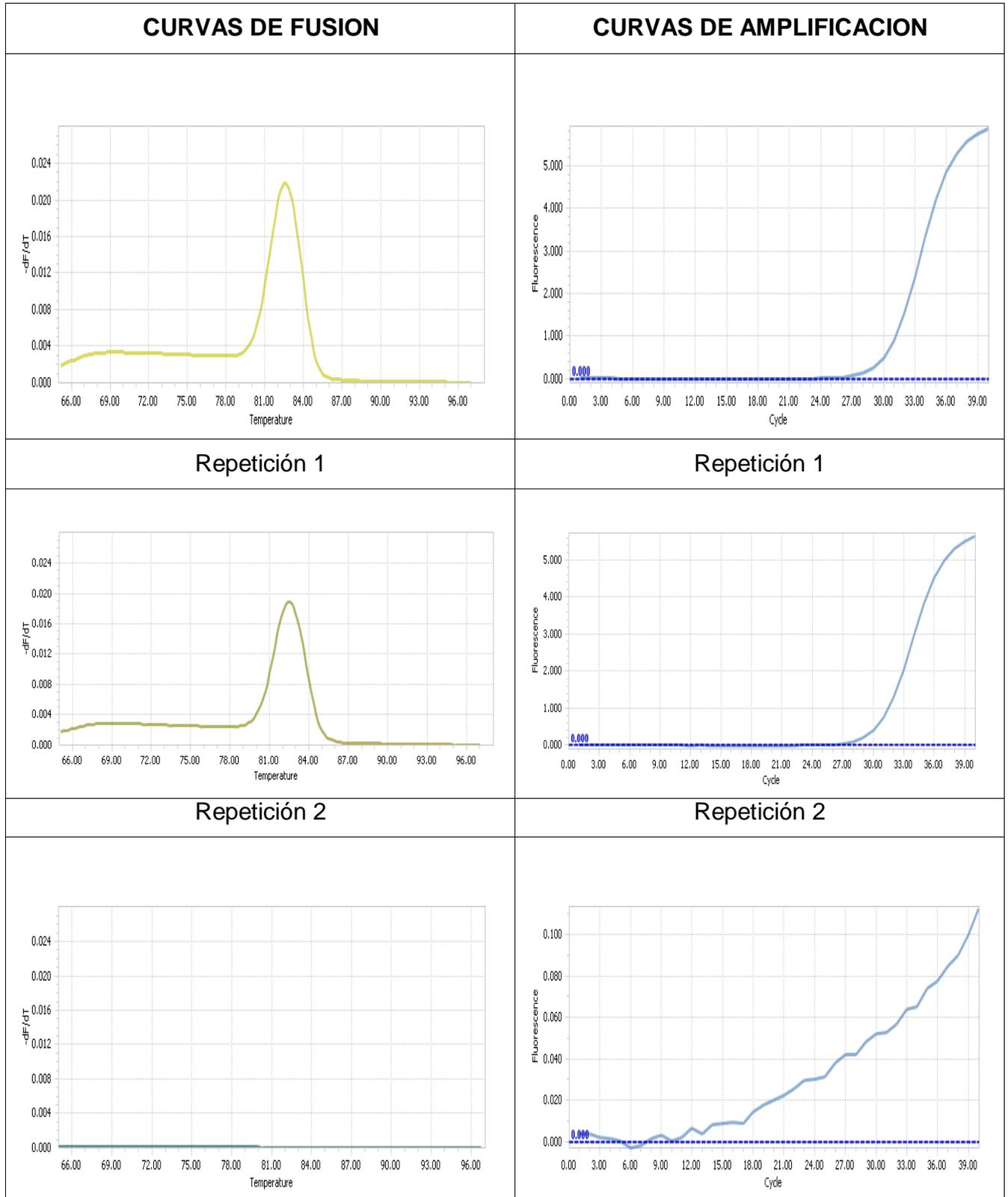


Blanco



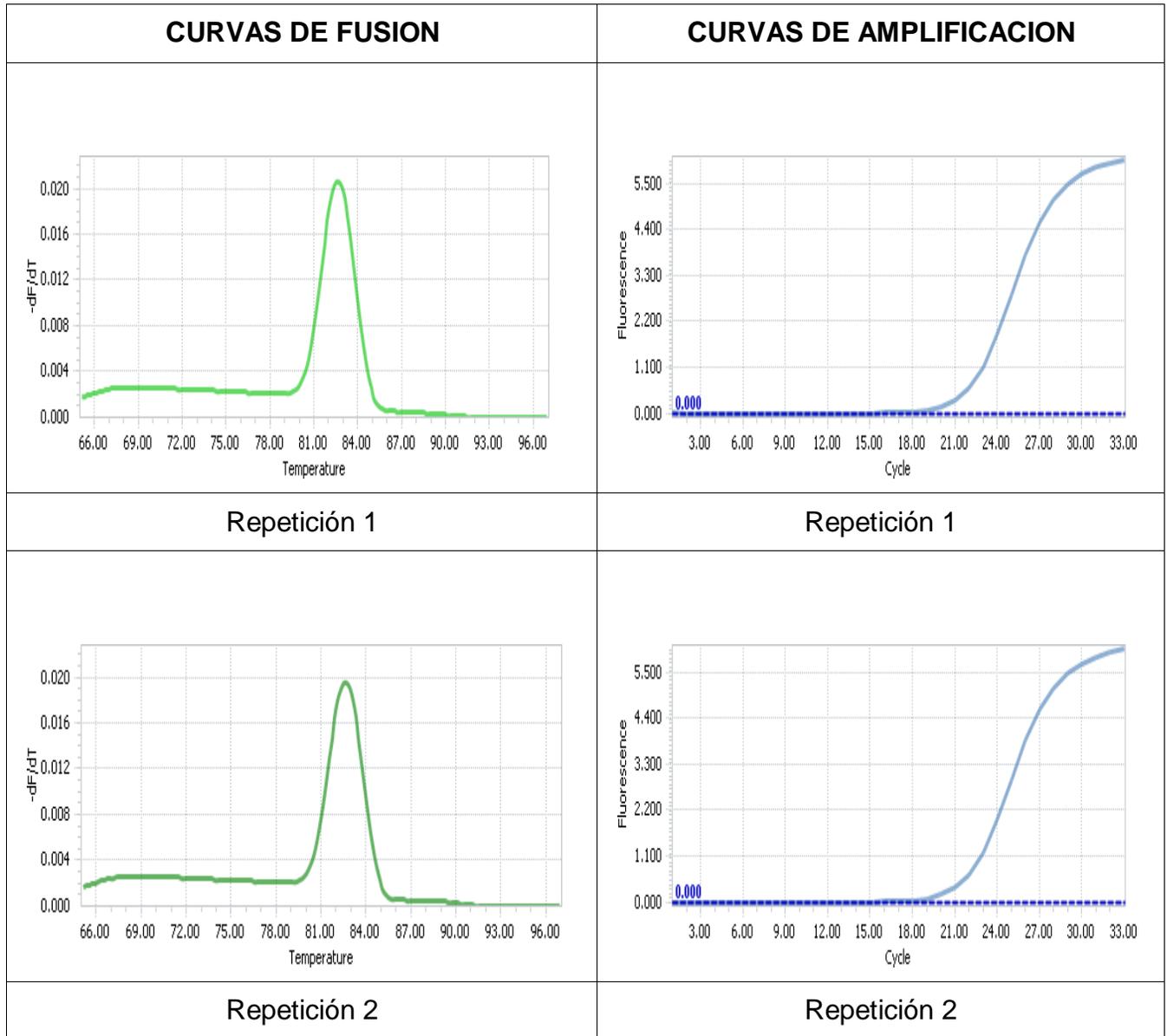
Blanco

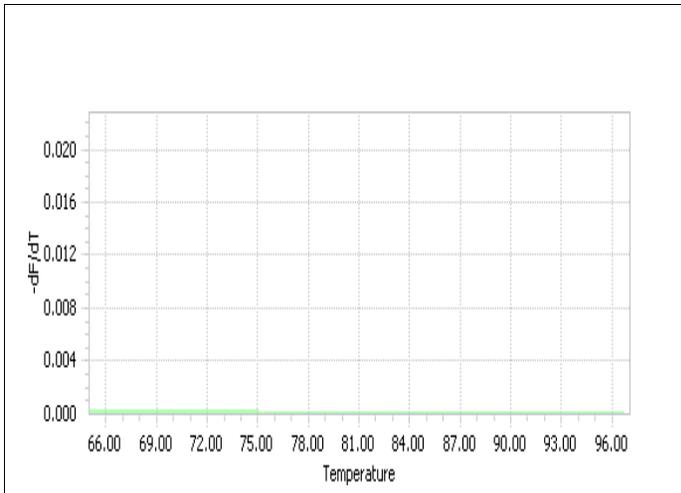
Anexo 10: Curvas de fusión y amplificación del gen PPIA



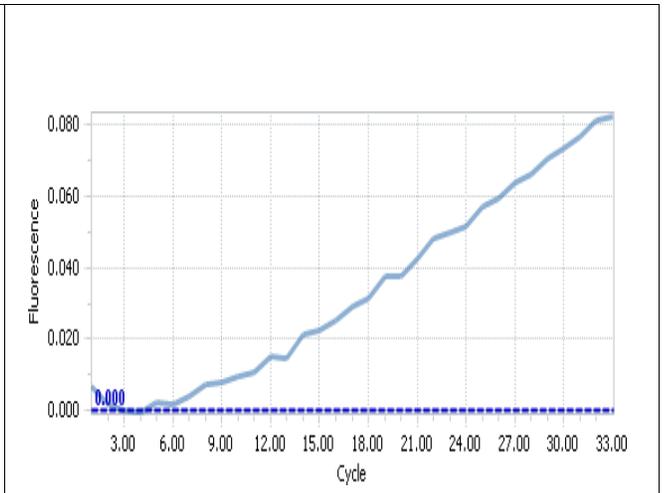
Blanco	Blanco
--------	--------

Anexo 11: Curvas de fusión y amplificación del gen ACTB



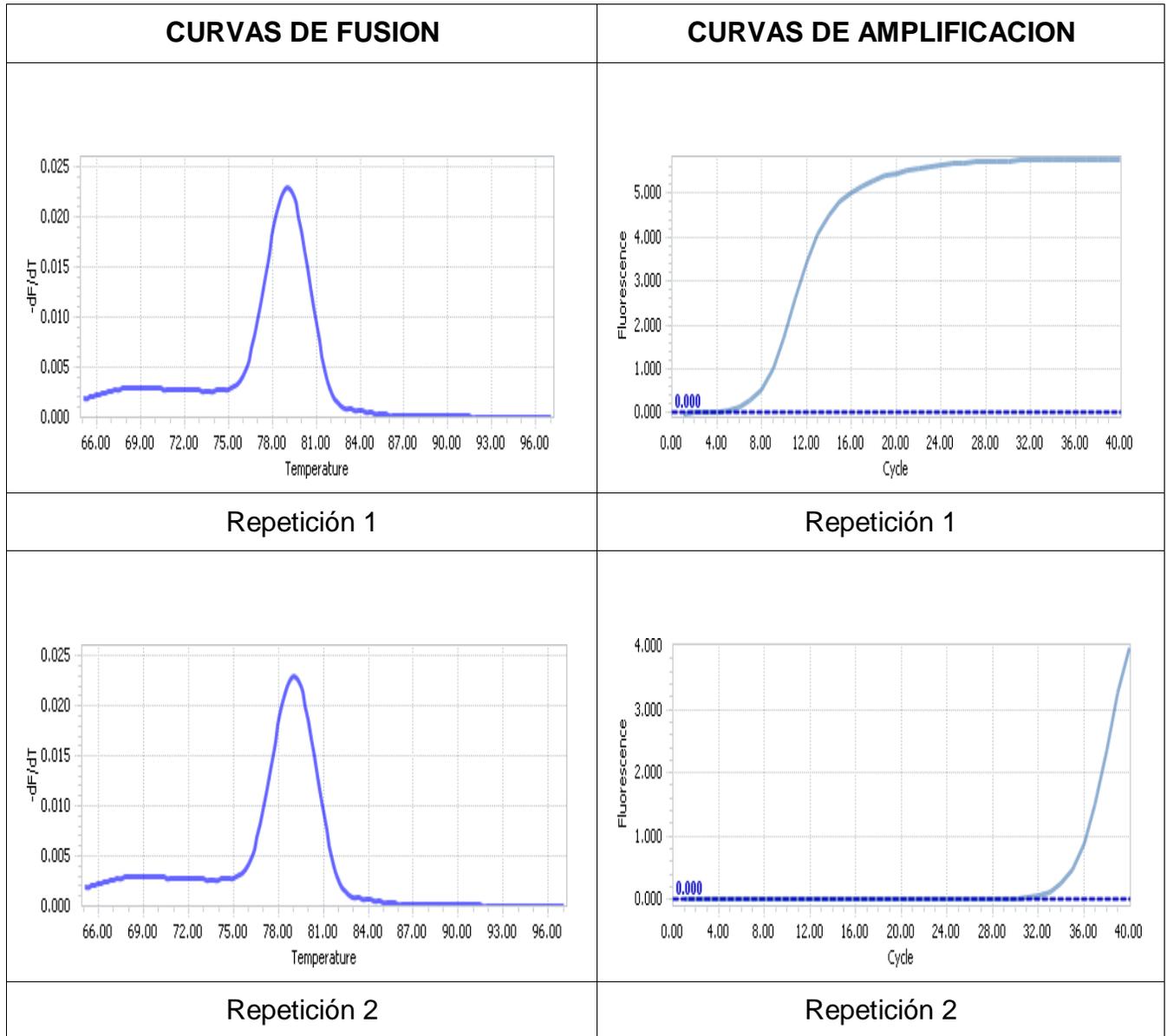


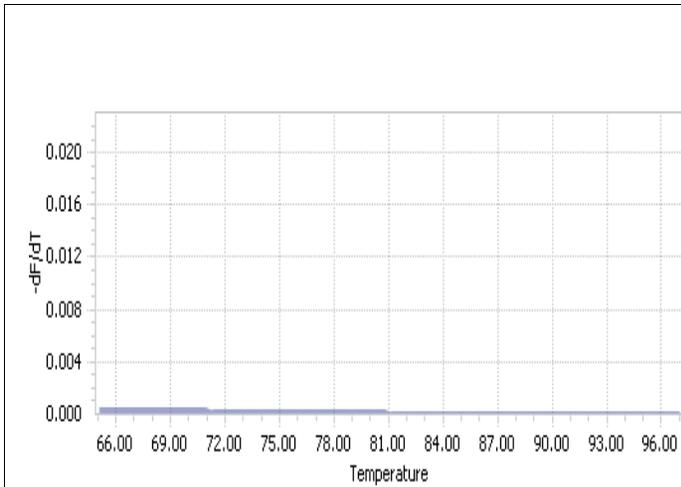
Blanco



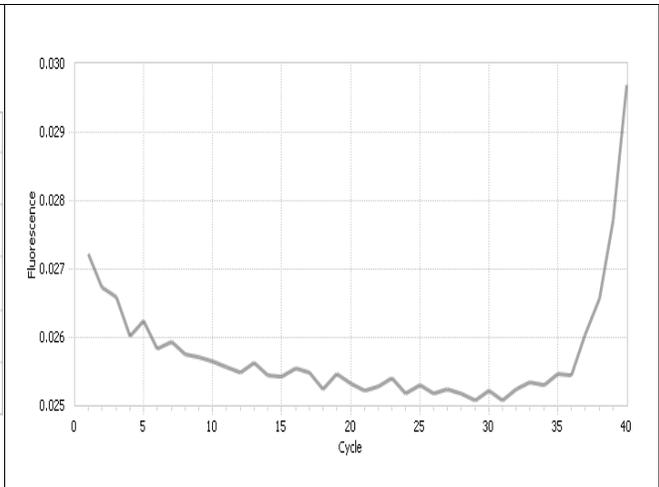
Blanco

Anexo 12: Curvas de fusión y amplificación del gen RNA18S



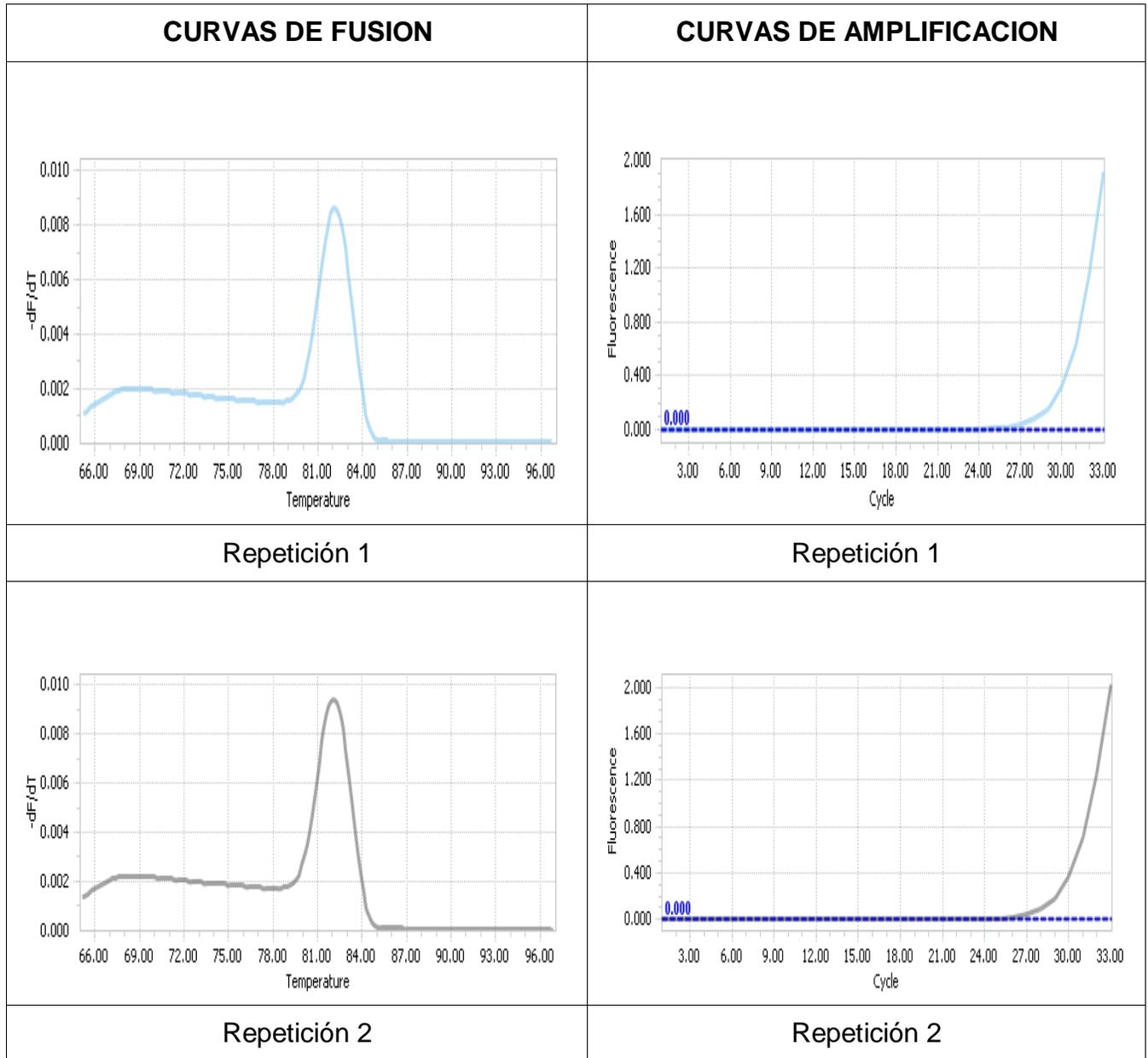


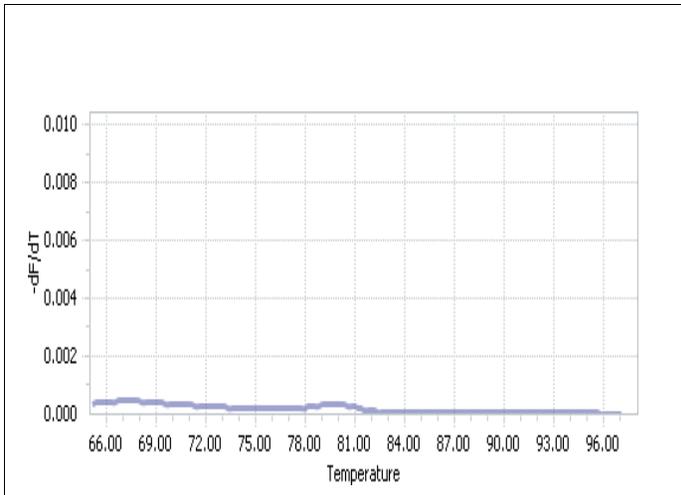
Blanco



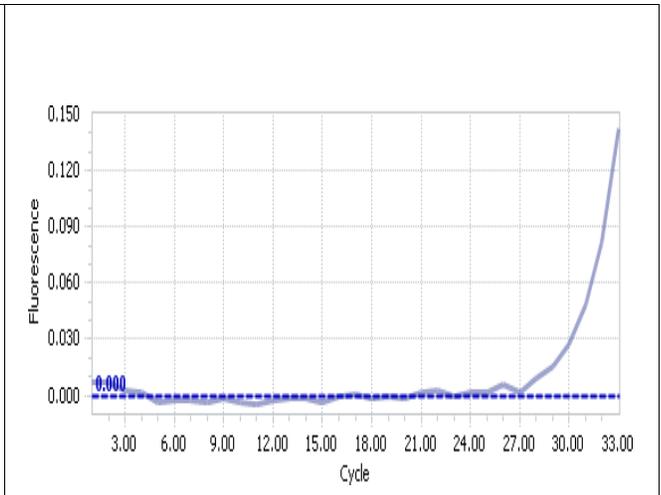
Blanco

Anexo 13: Curvas de fusión y amplificación del gen HMBS



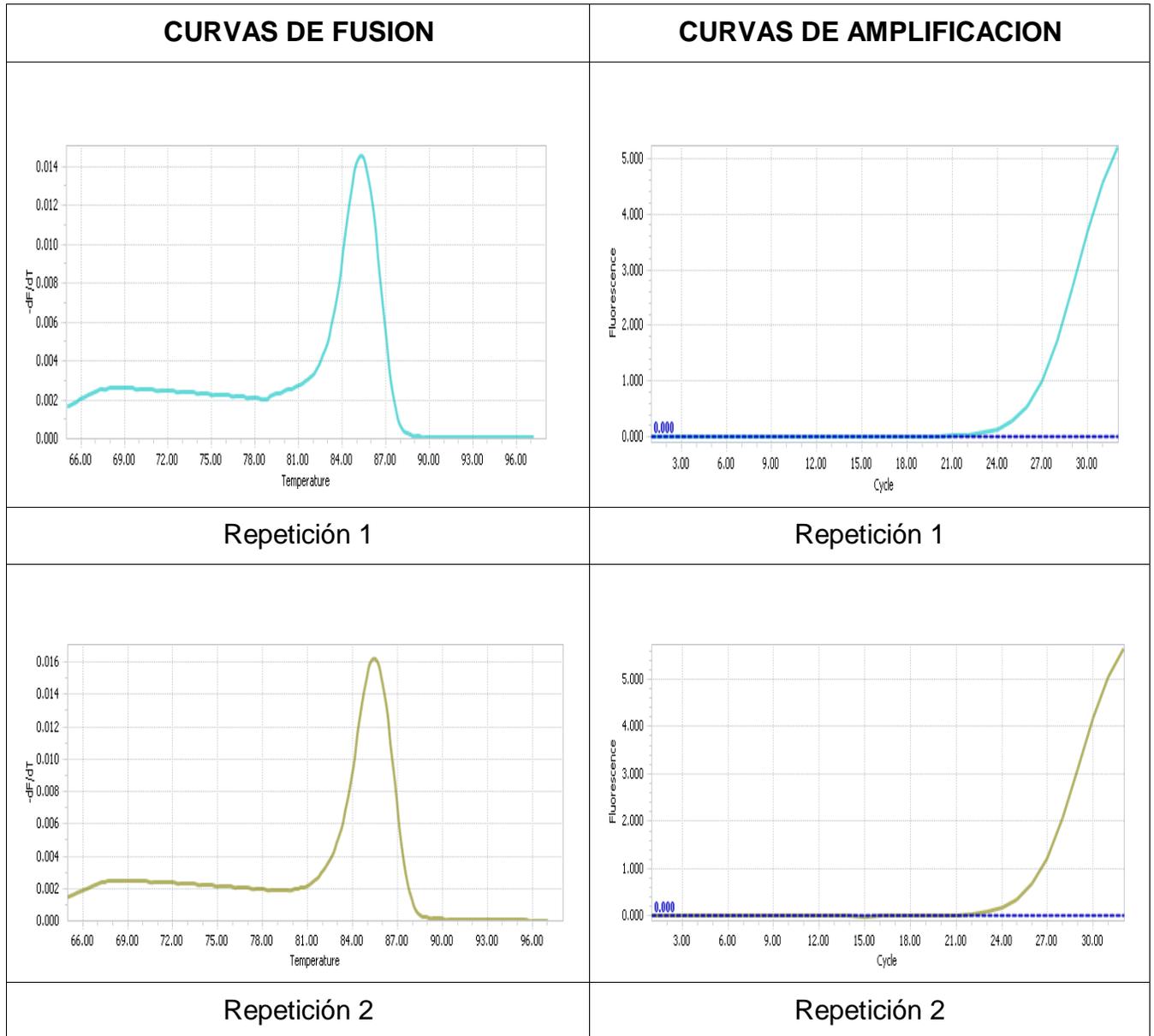


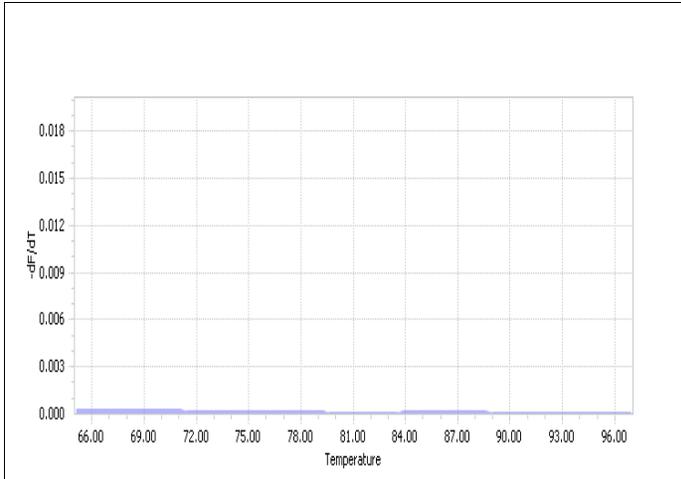
Blanco



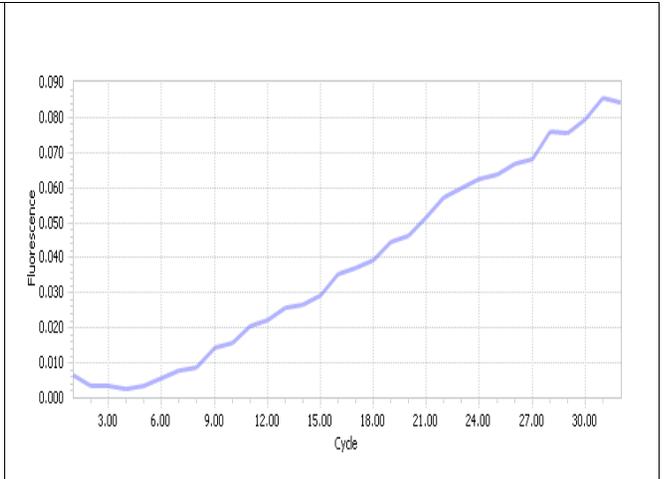
Blanco

Anexo 14: Curvas de fusión y amplificación del gen EGFR



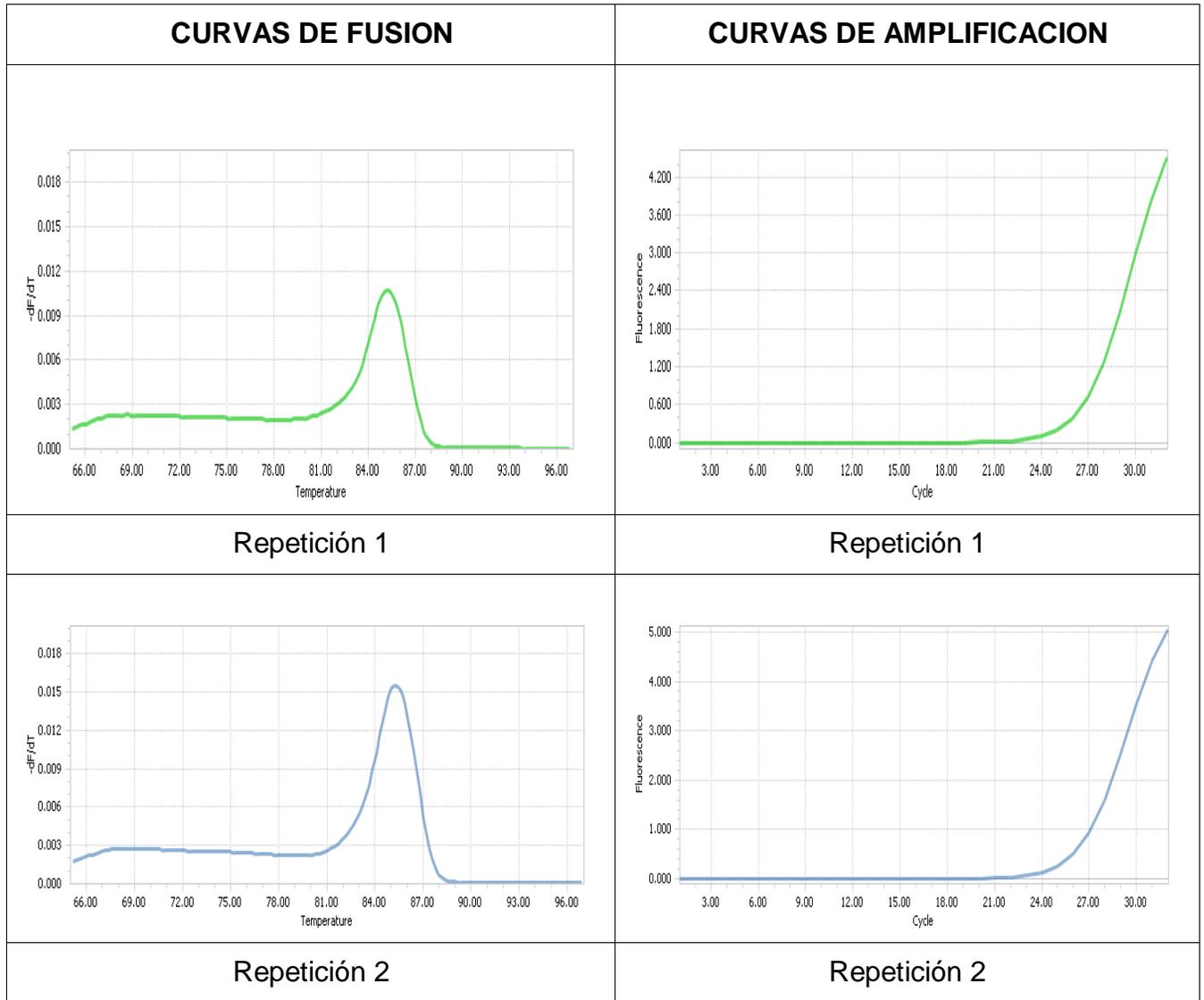


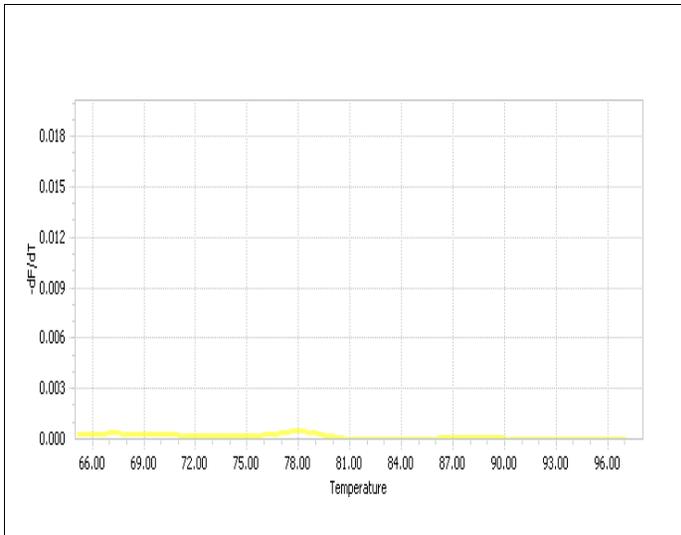
Blanco



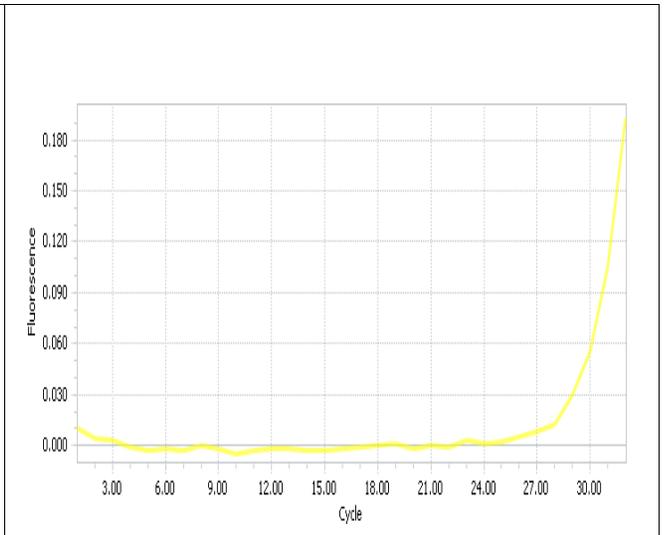
Blanco

Anexo 15: Curvas de fusión y amplificación del gen RPN1





Blanco



Blanco