

Trabajo de Fin de Grado

Explorando la Modificación de RNAs Circulares en ELA y su Respuesta al Tratamiento con 5-Fluorouracilo.

Exploring Circular RNAs Modifications in ALS and Their Response to 5-Fluorouracil Treatment.

Autor: Luis Folch Cirujeda

luisfolchmasino@gmail.com

Tutoras: Rosario Osta Pinzolas y Ana Cristina Calvo Royo

Dpto. Anatomía, Embriología y Genética Animal. Facultad de Veterinaria.

12/06/2024

Grado en Biotecnología, curso 2023/2024



Universidad
Zaragoza

Contenido

Resumen	1
1. Introducción.....	1
1.1. <i>Esclerosis lateral amiotrófica</i>	1
1.2. <i>Biomarcadores</i>	2
1.3. <i>RNAs circulares</i>	3
1.4. <i>RNAs circulares en la ELA</i>	3
1.5. <i>5-Fluorouracilo</i>	3
2. Objetivos	4
3. Materiales y métodos	4
3.1. <i>Optimización de procesos</i>	5
3.2. <i>Procedimientos</i>	7
3.2.1. <i>Primera digestión mecánica médula</i>	7
3.2.2. <i>Primera digestión mecánica músculo</i>	7
3.2.3. <i>Segunda digestión mecánica</i>	7
3.2.4. <i>Extracción de RNA</i>	8
3.2.5. <i>Retrotranscripción</i>	8
3.2.6. <i>Real time qPCR</i>	8
3.2.7. <i>Diseño de cebadores para RNAs circulares</i>	9
3.2.8. <i>Comprobación de la amplificación mediante electroforesis</i>	9
3.3. <i>Análisis estadístico</i>	10
4. Resultados	10
4.1. <i>Extracción de RNA</i>	10
4.1.1. <i>Estadio sintomático temprano</i>	11
4.1.2. <i>Estadio sintomático tardío</i>	12
4.2. <i>Electroforesis del producto de la PCR</i>	13
4.3. <i>Expresión génica</i>	13
4.3.1. <i>Estadio sintomático temprano</i>	14
4.3.2. <i>Estadio sintomático tardío</i>	17
5. Discusión	20
6. Conclusiones	23
7. Bibliografía	23
8. Anexos	26

Resumen

Los RNAs circulares son un tipo de ácidos ribonucleicos no codificantes de alta estabilidad y cuya concentración se encuentra alterada en algunas patologías. Estas características hacen posible su estudio como biomarcadores en la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) y permite su uso para estudiar vías alteradas en la enfermedad. Hemos seleccionado seis circulares, de los cuales algunos ya habían sido descritos como alterados en modelo murino de ELA. Los seis RNAs elegidos se han estudiado en muestras de médula espinal y cuádriceps de ratones SOD1 G93A, uno de los mejores modelos para esta enfermedad, y ratones wild-type. La mitad de estos ratones se habían tratado con 5-FU y la otra mitad se había mantenido como control.

La cuantificación se ha realizado mediante una real-time rt-qPCR, utilizando el gen de la actina para normalizar los valores del Ct en médula y el gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Los resultados parecen indicar que la vía RHO está alterada en la patología y el fármaco 5-FU podría tener efectos sobre este mecanismo. Además, los RNAs ya descritos en ELA han mostrado un patrón distinto al conocido, siendo solo ANKRD12 consistente en ambos tejidos.

Abstract

Circular RNAs are a type of non-coding ribonucleic acids characterized by high stability, whose concentration is altered in some pathologies. These features make them suitable for study as biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and allow for investigation into altered pathways in the disease. We have selected six circular RNAs, some of which had already been described as altered in the ALS murine model. The six chosen RNAs have been studied in samples of spinal cord and quadriceps from SOD1 G93A mice and wild-type mice. Half of these mice were treated with 5-FU, while the other half were used as controls.

Quantification was performed using real-time rt-qPCR, with the actin gene used to normalize Ct values in the spinal cord, and the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene used for normalization in quadriceps. The results suggest that the RHO pathway is altered in the pathology, and the drug 5-FU may have effects on this mechanism. Additionally, the RNAs previously described in ALS have shown a different pattern than what is known, with only ANKRD12 showing consistency in both tissues.

1. Introducción

1.1. Esclerosis lateral amiotrófica

La esclerosis lateral amiotrófica es una enfermedad que afecta principalmente a las neuronas motoras, tanto superiores como inferiores, produciendo cuadros clínicos heterogéneos y propios de cada paciente. Puede tener inicio bulbar (los síntomas iniciales suelen contar con disfagia y disartria) o inicio espinal (comienza con afección muscular en las extremidades). Además de los característicos desórdenes motores, la mitad de los pacientes presentan deterioro cognitivo y un 13% de los pacientes desarrollan demencia frontotemporal. La enfermedad progresa hasta llegar a ser fatal para el paciente, generalmente debido a la parálisis de los músculos respiratorios. (1)(2)

A demás de su compleja manifestación, las causas de la esclerosis lateral son muy diversas y, en muchos casos, desconocidas. Se han descrito varios genes en los que ciertas mutaciones y expansiones de repeticiones dan lugar a formas hereditarias de la enfermedad (hasta un 10% de los casos reportados).



Figura 1: Causas de la esclerosis lateral amiotrófica esporádica (sALS) y familiar (fALS) en pacientes asiáticos y europeos. (2)

De estas alteraciones, se observa distinta penetrancia en los pacientes estudiados, aumentando así la complejidad de esta enfermedad.(1)(2)

Así pues, no está clara la causa del 90% de los casos de esclerosis reportados, y muchos de los casos en los que se conoce la causa, no se han podido determinar las vías moleculares que se alteran para que se desarrolle la patología.(2)

Cabe a destacar que esta enfermedad tiene una prevalencia de entre 3 y 5 afectados por cada 100.000 habitantes, siendo considerada una enfermedad rara. Aun así, en los últimos años, se ha realizado un importante esfuerzo en la determinación de los mecanismos que resultan alterados en esta patología y en la búsqueda de conocimiento sobre la enfermedad que pueda facilitar su diagnóstico y tratamiento. (3)

En este último ámbito, destaca el esfuerzo por determinar tratamientos que, además de tratar los síntomas, frenen la progresión de la enfermedad y la búsqueda de nuevos biomarcadores que permitan un diagnóstico precoz.

1.2. Biomarcadores

Según el Instituto Nacional de Salud, un biomarcador se define como una “molécula biológica que se encuentra en la sangre, otros líquidos o tejidos del cuerpo, y cuya presencia es un signo de un proceso normal o anormal, de una afección o de una enfermedad.”(4)

Muchas de estas moléculas aparecen alteradas mucho antes de la aparición de los síntomas de la enfermedad, por lo que son una herramienta clave para el diagnóstico precoz de la patología y para poder ofrecer un tratamiento lo más eficaz posible.

Actualmente, la aplicación clínica de nuevos biomarcadores permite comenzar el tratamiento antes de que la reserva funcional se vea superada por los daños de la patología, aumentando la tasa de supervivencia en enfermedades como el cáncer y mejorando la esperanza y calidad de vida en el caso de patologías sin cura, como el Alzheimer.

En este contexto, el descubrimiento de nuevos biomarcadores podría ser una de las principales estrategias en la investigación clínica, junto con el desarrollo de tratamientos más eficaces.

1.3. RNAs circulares

En los últimos años, ha aparecido un nuevo tipo de biomarcadores basado en los RNAs circulares. Estos son un tipo de RNA considerado no codificante (aunque existen excepciones) formado por la circularización de RNAs lineales, en los que se establece una unión covalente entre el extremo 5' y 3', generalmente gracias a secuencias de naturaleza transposónica llamadas "elementos ALU". Una sola secuencia de RNA, por splicing alternativo, puede dar lugar a muchos circulares distintos. (5,6)

Su función más extendida es la de "esponjas" de miRNAs. De esta manera, al secuestrar estos elementos, se disminuye la degradación del mRNA al que reconocían los miRNAs y aumenta la expresión de la proteína codificada por este. Pueden ser también codificantes para ciertas proteínas y unirse a proteínas de unión a RNA, regulando su actividad.(7)

Estas estructuras, además de haber mostrado estar alteradas en diversas patologías y tejidos, presentan una estabilidad mucho mayor a los RNAs lineales, por lo que podrían cumplir con la función de marcadores de una patología si se pudiese cuantificar su expresión en un tejido fácil de obtener y si esta expresión se correlacionase bien con la presencia de la enfermedad.

1.4. RNAs circulares en la ELA

Se han descrito varios RNAs circulares asociados con ELA, que presentan un patrón característico de distribución en los tejidos a medida que progresa la enfermedad. Dicho patrón cuenta con una disminución general de los circulares asociados a la patología en el tejido nervioso y un aumento de estos circulares en el músculo. La presencia de estos RNAs podría constituir un nuevo biomarcador aplicable a la ELA en estadios presintomáticos, pero existe un importante inconveniente para la puesta a punto de una prueba diagnóstica de este tipo: los niveles de los circulares estudiados, en el plasma sanguíneo, son muy bajos, y hoy en día es difícil cuantificarlos con precisión. (10)

Aun con este inconveniente, los RNAs circulares son moléculas especialmente prometedoras para la búsqueda de nuevos biomarcadores y podrían ayudar a arrojar algo de luz sobre los todavía desconocidos mecanismos de patogenia de la ELA.

1.5. 5-Fluorouracilo

El 5-fluorouracilo es un quimioterápico utilizado para tratar algunos tipos de cáncer al producir la muerte de las células en división. Este fármaco es un análogo estructural del uracilo, pero con un sustituyente fluoruro en el carbono 5. En el interior celular, es convertido en varios metabolitos, que serán los que presenten actividad citotóxica. Esta recae principalmente en la fluorouridina trifosfato, la

fluorodesoxiuridina trifosfato y en la fluorodesoxiuridina monofosfato. La primera dificulta la generación y maduración del RNA, impidiendo así el correcto splicing y la formación de RNA ribosomal (rRNA) y RNA pequeño nuclear (snRNA) maduro. La fluorodesoxiuridina trifosfato dificulta la replicación del RNA y favorece la introducción de nucleótidos halogenados a las cadenas de este, impidiendo su correcto funcionamiento. Por último, la fluorodesoxiuridina monofosfato bloquea la actividad de la timidilato sintasa, evitando que se produzcan nuevos nucleótidos de timina y aumentando la cantidad de dUTP intracelular, que puede introducirse erróneamente en el DNA, bloqueando la producción de nuevo DNA.(11)

Además de estas acciones sobre la síntesis de polinucleótidos, todo parece apuntar a que el 5-fluorouracilo tiene efectos cuyo mecanismo no se conoce todavía y que podrían ayudar a comprender los mecanismos patológicos de algunas enfermedades, o bien permitir nuevas aproximaciones terapéuticas o el reposicionamiento de este fármaco para el tratamiento de otras enfermedades.

En la tesis doctoral de Amaya Rando, realizada en el grupo de la Dra. R. Osta, se estudió el efecto de este tratamiento sobre el modelo animal SOD1G93A, ratones que desarrollan esclerosis lateral amiotrófica debido a la sobreexpresión de superóxido dismutasa 1 humana con la mutación G93A.(10)

En un principio, se esperaba que el 5-FU agravase los síntomas de la ELA al disminuir el número de células madre circulantes y no aportar ningún beneficio ante la patología. Tras la realización de varios experimentos, se observó un aumento de la capacidad motora en animales enfermos. Los resultados, debido a causas desconocidas, no pudieron reproducirse correctamente en otros animalarios. (11)

Teniendo en cuenta estos experimentos, el presente trabajo se enfoca en analizar los cambios en la expresión de RNAs circulares para identificar vías moleculares alteradas, con el fin de poder comprender de forma más precisa el origen etiopatogénico de las ELA o para proponer nuevos biomarcadores de esta patología. Además, se estudiarán posibles mecanismos de acción del 5-FU que no conocemos todavía.

2. Objetivos

El objetivo de este estudio es cuantificar la expresión de RNAs circulares en cuádriceps y médula espinal del modelo animal de ELA SOD1G93A, así como la comparación de los valores obtenidos con la expresión en ratones control. Un segundo objetivo es conocer si el tratamiento con el 5-Fu modifica la expresión de estos RNAs circulares en estos tejidos de dicho modelo murino.

3. Materiales y métodos

Este trabajo tiene como punto de partida el ensayo preclínico ya realizado con ratones SOD1 G93A, modelo de ELA tratados con 5-FU, en los que se observó una mejora en el mantenimiento de la capacidad motora respecto a los enfermos control.

El modelo murino SOD1 G93A es el mejor modelo murino actual para el estudio de la ELA. Este se obtuvo al producir, mediante inyección en el pronúcleo, un ratón con un fondo genético de las estirpes C57BL6 y SJL que expresa la superóxido dismutasa 1 humana con la mutación G93A, responsable de buen número de los casos de esclerosis lateral amiotrófica familiar (**Figura 1**). (12)

Disponemos de 2 tipos de muestras: las primeras son de tejido nervioso (médula espinal cervical), mientras que las segundas son de tejido muscular estriado (cuádriceps derecho). (**Anexo 2**) Las edades de los ratones son de 85 días en el estadio sintomático temprano y 115 días en el estadio sintomático tardío. Los primeros han sido tratados con una dosis de 5-FU, y los segundos, con tres dosis. Dichas dosis fueron de 150 mg de fármaco/kg, resuspendido previamente en suero fisiológico a 15 mg/mL e inyectadas vía intraperitoneal, se utilizó suero fisiológico como control negativo.(11)

Se realizó una digestión mecánica de las muestras, seguida de una extracción del RNA. Se midió el producto de dicha extracción, utilizando agua como disolvente, en el espectrofotómetro Nanodrop, para asegurar que se había obtenido RNA de una pureza adecuada. Seguidamente se realizó la retrotranscripción del RNA y, partiendo del cDNA resultante, se llevó a cabo un ensayo de PCR a tiempo real (real time-RT-qPCR). La prueba se realizó con cebadores para los circulares a analizar y para un gen housekeeping, que sirve como control positivo y para normalizar la cantidad los valores de Ct obtenidos por muestra y diana.

Además de las muestras para el análisis, se utilizaron 12 médulas espinales cervicales de hembras del 2º estadio para realizar la optimización de procesos de extracción. (**Anexo 3**)

3.1. Optimización de procesos

El primer experimento se realizó para determinar si la extracción debe hacerse con digestión mecánica doble o simple y si hay que utilizar el kit de extracción de RNA de ZYMO o el kit de QIAGEN. Para dicha prueba, se utilizaron 8 médulas espinales cervicales de hembras, 4 de ellas pertenecientes a animales wild-tipo control y otras 4 pertenecientes a animales wild-type tratados con 5-FU. Una muestra de cada uno de los grupos se procesó con una digestión mecánica y kit ZYMO, con una digestión y kit QIAGEN, con dos digestiones y kit ZYMO y dos digestiones y kit QIAGEN.

La digestión mecánica simple consistía en el uso de Tissulyzer y la doble en pulverización con nitrógeno líquido, seguida de una homogeneización con Tissulyzer. La última llevaba implícito un paso en el que se dividía el material en dos tubos, por lo que el material de partida será la mitad del material usado en la digestión simple. Este paso se realiza porque es el protocolo de extracción actual de RNA, en el que la mitad del material se guarda para estudio de proteínas. Nuestra idea es utilizar este procedimiento si se obtiene suficiente RNA. De no ser así, habría que prescindir de la muestra de proteína. En el caso de la única digestión mecánica, es más difícil separar el tejido en partes iguales en masa y composición, por lo que este tipo de procesado no se ensayará con división de material.

Doble digestión mecánica	Digestión mecánica única	Kit utilizado
1454	1475	ZYMO
1449	1474	
1518	1553	QIAGEN
1514	1532	

Tabla 1: Primer experimento de optimización. Se representa la técnica de digestión utilizada y el kit de purificación empleado para cada muestra. Los números indican el código de identificación de los animales utilizados.

Tras la digestión, división del material en el caso de la doble digestión y extracción, se cuantificó el RNA obtenido y su pureza utilizando espectrofotometría (nanodrop). Se obtuvieron los siguientes resultados:

Muestra	[] ng/ μ L		260/280		260/230	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
1474	9,21	1,45	1,68	0,14	1	0,05
1475	14,53	1,1	1,7	0,11	1,08	0,04
1449	28,85	1,33	1,63	0,04	0,53	0,01
1454	19,05	0,77	1,92	0,1	1,87	0,09
1514	98,15	2,65	1,73	0,03	0,58	0,01
1518	184,7	3,4	1,82	0,02	1,23	0,02
1532	140,1	6,4	1,88	0,01	1,38	0,06
1553	198,9	3,4	1,78	0,01	0,43	0

Tabla 2: Resultado del primer experimento de optimización. Se representa la media y desviación típica de la concentración de RNA, del cociente de absorbancia a 260 y 280 nm y de absorbancia a 260 y 230 nm. Los números indican el código de identificación de los animales utilizados.

En vista de los resultados, se utilizó en adelante el **kit ZYMO**, ya que permite extraer una **cantidad suficientemente pura de RNA** de la muestra. El kit QUIAGEN, lo reservaremos para muestras en las que la extracción sea más difícil. Cabe a destacar que este kit parece más propenso a las contaminaciones por compuestos orgánicos. En cuanto al método de digestión, resulta ser más eficaz la doble digestión mecánica, además de permitir dividir la muestra de manera homogénea en dos alícuotas.

Una vez elegidas las condiciones de extracción, se ensayó la extracción de RNA en animales del segundo estadio, que presentaban una degeneración más avanzada. Se utilizaron 4 muestras de médula cervical, dos de las cuales fueron procesadas completamente y las otras dos se dividieron en dos alícuotas similares. Las muestras utilizadas fueron: 1402 y 1423 para el procesado sin división y 1433 y 1543 para el procesado con división.

Resultados:

Muestra	[] ng/ μ L		260/280		260/230	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
1402	67,26	1,27	0,87	0,03	1,94	0,03
1433	38,35	1,7	0,70	0,02	1,55	0,02
1423	43,44	1,5	1,83	0,01	1	0,06
1543	28,13	1,6	1,89	0,04	1,72	0,20

Tabla 3: Resultado del segundo experimento de optimización. Se representa la media y desviación típica de la concentración de RNA, del cociente de absorbancia a 260 y 280 nm y de absorbancia a 260 y 230 nm. Los números de muestra corresponden al número de identificación de los ratones.

En vista a estos resultados, es posible utilizar el procedimiento elegido en animales modelo de ELA y obtener unas buenas cantidades de RNA para una futura retrotranscripción.

En las extracciones realizadas se observa la presencia de algún contaminante que absorbe luz a 230 nm, que seguramente sea algún tipo de disolvente orgánico proveniente del kit ZYMO. Para asegurar que la extracción nos ha permitido obtener RNA válido para los futuros procesos a realizar, hemos utilizado el RNA de esta prueba de optimización para hacer una retrotranscripción y una PCR con un gen housekeeping como diana, en este caso beta-actina (Act β).

Se obtuvo una correcta amplificación para el gen Act β , por lo que consideramos que se puede iniciar el procesado de las muestras usando el siguiente procedimiento: digestión mecánica con mortero enfriado en nitrógeno líquido, división de la muestra, en el caso de la médula espinal cervical, en dos alícuotas, una para el estudio de proteínas y otra para la extracción del RNA. Una vez procesada la muestra, se homogeneizó de nuevo mediante Tissulyzer. El tiempo de este tratamiento fue mayor en el caso del músculo.

Cada muestra se procesó utilizando el kit ZYMO para obtener el RNA. Seguidamente, se diseñó una retrotranscripción utilizando el kit VILO, para poder llevar a cabo las PCR a tiempo real de los diversos RNAs circulares a estudiar, realizando siempre una primera PCR con un gen housekeeping o normalizador.

3.2. Procedimientos

3.2.1. Primera digestión mecánica médula

1º-Se recogieron las muestras correspondientes del congelador de -80°C y se sumergieron en nitrógeno líquido o hielo seco. Todo el material se limpió con etanol al 70% y RNaseZap™. Se enfrió el mortero por inmersión en nitrógeno líquido.

2º-Se prepararon una serie de tubos para Tissulyzer (Cat. No. 0030120094) junto con una esfera para dicho equipo con 500 µL de Trizol/Quiazol bajo campana extractora, junto con tubos eppendorf estériles, a los que se añadió RIPA 1M en función de la masa de muestra a añadir en cada tubo.

3º-Una vez pulverizada la muestra de forma homogénea en el mortero, la mitad del material obtenido se introdujo en un tubo con Trizol/Quiazol, que se vorteo y se conservó en hielo o en el congelador a -80°C. La otra mitad restante del material se guardó en un tubo para futuros análisis de proteínas y se le añadieron los microlitros de RIPA 1M resultantes de multiplicar los gramos de muestra inicial por un factor de conversión de 1500. Finalmente, se vorteo y almacenó a -80°C hasta su procesado.

3.2.2. Primera digestión mecánica músculo

Consiste en un procedimiento similar al caso de la médula, sin embargo, el material resultante solo se puede utilizar para extracción de RNA o para análisis de proteína.

1º-Se seleccionaron las muestras y se sumergieron en nitrógeno líquido o en hielo seco. Se limpió con etanol al 70% y RNaseZap™ todo el material utilizado y se enfrió el mortero por inmersión en nitrógeno líquido.

2º- Se preparó una serie de tubos de Tissulyzer que contenían 500 µL de Trizol/Quiazol bajo campana extractora. Se preparó otra serie de tubos eppendorf estériles, a los que añadió RIPA 1M en función de la masa de muestra a añadir en cada tubo.

3º-Se extrajo una muestra y se cortó un trozo de unos 30-35 gramos. A continuación, se pesó en un papel de aluminio previamente tarado. Se apuntó el peso correspondiente y se homogeneizó en el mortero hasta obtener un pulverizado homogéneo.

4º-El material obtenido se puede dividir entre ambos tubos. En este caso, el paso 4 es similar al utilizado para médula. Si no se requiere dividir el pulverizado, éste se introduce en el tubo correspondiente y se procesa. Si se requiere para extracción de RNA, que contiene Trizol/Quiazol, solo es necesario vortear y conservar en hielo o en el congelador de -80°C. En caso de que se requiera para el estudio proteico, es necesario añadir RIPA 1M en una proporción de 3000 µL/g de muestra. Finalmente, se vortea y se guarda en el congelador a -80°C hasta su procesamiento posterior.

3.2.3. Segunda digestión mecánica

Una vez añadida la muestra al Trizol/Quiazol, se utiliza el Tissulyzer para una mejor digestión. Terminada esta, se centrifuga y recupera el sobrenadante con el material de interés. En este punto,

puede procederse a la extracción de RNA o almacenarse la muestra a -80°C hasta su procesado. Los pasos que se siguieron fueron los siguientes:

1º-Se enfría el carro de Tissulyzer en el congelador unos 20 minutos antes de su uso.

2º-Se introdujeron los tubos con muestra en el Tissulyzer y se aplicó el siguiente programa:

-2 minutos a 50 Hz para médula espinal.

-6 minutos a 50 Hz para cuádriceps.

Se comprobó que la homogeneización ha transcurrido correctamente y que no quedaban fragmentos de tejido.

3º-Se centrifugó 1 minuto a 12.000 g.

4º-Bajo campana extractora, se transfirieron 450 μL del sobrenadante, con cuidado de no coger el pellet, a un tubo eppendorf libre de RNAsas. La muestra se conservó hasta su procesamiento.

3.2.4. Extracción de RNA

El protocolo experimental (completo en el **Anexo 1**) se llevó a cabo bajo campana. Para el proceso de extracción, se utilizó el kit ZIMO RESEARCH, Direct-zol RNA Miniprep (Cat. R2052). Tras finalizar dicho proceso, se obtuvieron entre 30 y 50 μL de RNA total en cada muestra procesada, del que se determinó la concentración en el espectrofotómetro Nanodrop NS-1000, de Thermo Scientific y se guardó a -80°C .

3.2.5. Retrotranscripción

Una vez determinada la concentración de RNA obtenida durante la extracción, se estableció una cantidad de RNA en nanogramos (ng) para la realización de la reacción. Esta cantidad de RNA de partida que suele estar entre 100 y 200 ng.

Para realizar este proceso de retrotranscripción se utilizó el kit VILO que mejora significativamente el rendimiento de esta reacción. El programa empleado fue el siguiente:

Temperatura	Tiempo
25°C	10 minutos
42°C	60 minutos
85°C	5 minutos
4°C	∞

Tabla 4: Programa para realizar la retrotranscripción con el kit VILO.

3.2.6. Real time qPCR

Para realizar el ensayo de PCR a tiempo real, se debe de diseñar previamente la placa donde se incluirá cada muestra en cada pocillo, junto con la mezcla de la reacción, que contiene 4 μL de Master Mix para una diana determinada (1,3 μL de H_2O sigma, 2,5 μL de SYBR Green Fasta Master Mix 2x; 0,1 μL del forward primer para la diana determinada y 0,1 μL para el reverse primer de esta misma diana). Se realizaron diluciones 1:10 de todas las muestras de cDNA a utilizar, y se preparó entre un 5 y un 10 % de Master Mix en exceso para suplir la pérdida de solución durante el pipeteo.

El programa que se utilizó en el equipo para esta qPCR (QuantStudio™ 3 System) fue el siguiente:

Temperatura	Tiempo	Repeticiones
95°C	20 segundos	1
95°C	3 segundos	40*
60°C	12 segundos	
95°C	15 segundos	
60°C	1 minuto	1
95°C	15 segundos	

*Para algunas dianas, ha sido necesario utilizar 50 ciclos en lugar de 40 debido a su baja cantidad.

Tabla 5: Programa para realizar PCRs en tiempo real en el sistema QuantStudio. Rampa de temperatura de 1,6°C por segundo.

3.2.7. Diseño de cebadores para RNAs circulares

Para la obtención de nuevos cebadores para RNAs circulares de interés, se siguieron los pasos enumerados a continuación:

1º-Obtención de las coordenadas en un cromosoma determinado del DNA que codifica el circular de interés. Para ello se utiliza la base de datos [CircBase](#), que también permite acceder a la secuencia de nucleótidos del DNA que da lugar al RNA circular.

2º-Obtención de la secuencia para marcar los extremos 5' y 3'. El extremo 5' se une al 3' y se obtienen unos cebadores para amplificar una región de 100-150 pb que contenga a esta zona de circularización. Para ello se puede utilizar la herramienta [PrimerQuest Tool de Integrated DNA Technologies](#), seleccionando la opción para 2 primers de qPCR con fluoróforos intercalantes. Dentro de esta opción, se pueden modificar los parámetros para que se incluya en la secuencia amplificada la zona de circularización, que sólo estará presente en el RNA circular y no en otros transcritos lineales.

3º-Una vez se obtienen las distintas parejas de cebadores, es necesario revisar que tienen temperaturas de melting similares, que no producen horquillas, que no forman dobles cadenas y que no hay otros posibles productos de amplificación. Para estos tres últimos objetivos se puede utilizar [MFEprimer](#).

4º-Los cebadores empleados en las PCRs (**Anexo 4**) se utilizan a concentración 10 µM, por lo que es conveniente preparar una dilución a dicha concentración y conservarla a -20°C.

3.2.8. Comprobación de la amplificación mediante electroforesis

Una vez realizadas las qPCRs, hicimos una comprobación del funcionamiento de los nuevos cebadores para los circulares Dbc1, Dlc1 y Casc5. Esta consistió en una electroforesis con los productos de la PCR, que nos permitió comprobar que el amplificado tenía 132 pb en el caso de Dlc1 y Casc5, y 150 pb en el caso de Dbc1. Esta se realizó en un gel de agarosa al 2,5%, utilizando tampón TBE (Tris, ácido acético y EDTA), tampón de carga 1:8 con glicerol y azul de bromofenol, 5 µL de marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder, de Thermofisher (Cat:10068013) y agente intercalante Sybr Safe, que se une al DNA y emite luz verde al recibir radiación ultravioleta. El proceso se realizó a 80 mA durante aproximadamente una hora, cuando el azul de bromofenol se aproximó al final del gel. Se cargaron 17 µL de producto de PCR junto con el tampón de carga en cada carril.

3.3. Análisis estadístico

Utilizando con IBM SPSS Statistics 20, hemos realizado el análisis estadístico T de student para varianzas no asociadas. Nuestra hipótesis nula es: “la expresión de los circulares en animales enfermos control y en animales sanos control es la misma” para la comparación del grupo 1 con el 4. Para la comparación del grupo 2 con el 3, la hipótesis es: “la expresión de los circulares en animales enfermos tratados y en animales sanos tratados es la misma”. Para la comparación del grupo 1 con el 2, utilizaremos: “la expresión de los circulares es igual en ratones enfermos control que en ratones enfermos tratados”. Por último, en la comparación del grupo 3 con el 4, la hipótesis nula será que “la expresión de los circulares no varía entre ratones sanos control y ratones sanos tratados.

Hemos tomado un intervalo de confianza de $\alpha=0,05$ y doble cola. Si el valor de p resulta así menor que 0,05, se considerará que existe una diferencia significativa entre los grupos comparados y se aceptará la hipótesis alternativa, que indicaría la variación de los niveles de circulares. Según el valor de p, hemos generado 5 grupos para expresar la significación de la comparación y le hemos asignado un número de asteriscos para su representación en los diagramas realizados.

Las categorías son: no significativo: $p>0,05$, significativo: $0,05>p>0,01$ (*) y muy significativo: $0,01>p>0,001$ (**); $0,001>p>0,0001$ (***); $0,0001>p$: (****).

Si aparecen diferencias significativas entre el primer y cuarto grupo y el segundo y tercer grupo, entonces la patología produce una alteración en el circular estudiado. Si la diferencia aparece entre el primer y tercer grupo, o entre el segundo y cuarto grupo, es el 5-fluorouracilo el que modifica los niveles del circular.

El número de muestras será de 17 cuádriceps derecho para el primer estadio, 18 médulas espinales cervicales para este mismo estadio, 16 cuádriceps derechos para el tercer estadio y 16 médulas espinales cervicales para el tercer estadio.

4. Resultados

4.1. Extracción de RNA

Tras la extracción de RNA de las muestras, se midió en el espectrofotómetro Nanodrop, la concentración de RNA obtenida, el ratio entre la absorbancia a 260 y 280 nm y el ratio entre la absorbancia a 260 y 230 nm. Los ratios 260/280 y 230/260 nos permiten descartar la presencia de contaminantes, siendo sus valores aproximados a 1,8-2 en disoluciones de RNA puro. El primer ratio alterado suele indicar contaminación por DNA u otros compuestos no deseados y el segundo, contaminación del producto con disolventes orgánicos u otros compuestos indeseados. Cabe destacar que unos valores correctos de estos ratios no indican necesariamente ausencia de contaminación, pero su alteración sí que indica de manera inequívoca falta de pureza. Las medidas se realizaron por triplicado, los resultados mostrados a continuación son las medias de las tres medidas.

4.1.1. Estadio sintomático temprano

Cuádriceps derecho:

ID muestra	Media con. (ng/μL)	SD	Media 260/280	SD	Media 260/230	SD
392	98,7	1,0	1,99	0,01	1,89	0,05
393	119,8	2,8	1,98	0,02	1,83	0,03
394	107,5	3,6	1,98	0,02	2,13	0,03
440	148,8	1,5	1,97	0,04	1,93	0,02
441	175,2	2,0	1,98	0,02	1,95	0,02
442	165,2	5,6	1,99	0,02	2,09	0,06
454	110,8	3,5	1,97	0,03	1,81	0,02
458	250,3	5,9	1,99	0,02	2,11	0,02
437	176,2	5,7	1,97	0,03	2,09	0,02
442	97,8	2,7	1,94	0,03	2,08	0,03
445	232,3	4,2	1,98	0,02	2,18	0,06
448	85,8	5,2	1,96	0,05	1,87	0,01
449	71,4	2,0	1,91	0,04	1,39	0,02
455	105,0	2,4	1,93	0,03	1,97	0,03
474	126,1	2,1	1,86	0,03	0,59	0,04
485	90,1	1,4	1,94	0,02	1,43	0,04

Tabla 6: Concentración y rangos 260/280 y 260/230 obtenidos en las lecturas del nanodrop en las extracciones de cuádriceps derecho de ratones en el primer estadio de la enfermedad.

Médula espinal cervical:

ID muestra	Media con. (ng/μL)	SD	Media 260/280	SD	Media 260/230	SD
391	11,1	0,4	1,63	0,11	0,08	0,00
393	70,5	1,1	1,61	0,02	0,17	0,01
394	7,3	0,4	1,58	0,18	0,34	0,02
437	14,2	0,4	1,43	0,12	0,63	0,03
440	8,0	0,8	2,02	0,37	0,51	0,02
441	26,7	0,2	1,91	0,02	1,87	0,05
442	20,7	0,4	1,76	0,05	1,96	0,42
443	13,5	0,9	1,79	0,09	1,05	0,09
445	17,9	0,5	1,93	0,09	1,32	0,03
446	26,4	1,2	1,80	0,15	1,32	0,15
448	44,7	1,1	1,94	0,05	2,01	0,05
449	3,5	0,1	1,54	0,41	0,67	0,09
454	19,8	0,8	1,90	0,01	1,15	0,06
455	10,4	0,5	2,13	0,35	1,49	0,10
458	6,6	0,1	1,59	0,12	1,34	0,10
474	5,1	0,1	1,73	0,25	0,41	0,03
476	26,6	0,9	1,94	0,04	1,18	0,02
485	19,8	0,8	1,90	0,01	1,10	0,01

Tabla 7: Concentración y rangos 260/280 y 260/230 obtenidos en las lecturas del nanodrop en las extracciones de médula espinal cervical de ratones en el primer estadio de la enfermedad.

4.1.2. Estadio sintomático tardío

Cuádriceps derecho:

ID muestra	Media con. (ng/μL)	SD	Media 260/280	SD	Media 260/230	SD
1998	70,4	1,3	1,87	0,01	1,73	0,01
2016	50,9	1,6	1,94	0,03	1,64	0,02
2022	38,3	0,5	1,94	0,01	1,43	0,04
2024	122,7	3,0	1,97	0,02	2,15	0,04
2025	92,6	3,6	1,93	0,03	2,09	0,02
2044	120,4	4,0	1,93	0,02	1,21	0,00
2045	134,0	2,5	1,96	0,02	2,03	0,01
2053	56,4	1,1	1,87	0,02	2,09	0,04
1979	69,4	1,9	1,97	0,03	1,91	0,05
1980	108,2	2,9	1,96	0,01	1,11	0,01
1981	45,6	1,3	1,93	0,01	1,61	0,03
1982	105,4	1,5	1,94	0,03	1,08	0,01
1997	273,6	17,8	1,43	0,13	2,05	0,05
1999	89,7	8,9	5,96	0,35	1,96	0,01
2012	333,6	5,7	0,54	0,03	2,08	0,01
2013	194,0	3,2	3,47	0,26	2,29	0,08

Tabla 8: Concentración y rangos 260/280 y 260/230 obtenidos en las lecturas del nanodrop en las extracciones de cuádriceps derecho de ratones en el tercer estadio de la enfermedad.

Médula espinal cervical:

ID muestra	Media con. (ng/μL)	SD	Media 260/280	SD	Media 260/230	SD
1981	21,4	1,1	1,96	0,15	1,91	0,09
2013	5,8	0,1	1,69	0,28	0,55	0,00
1979	1,7	0,4	2,17	1,57	0,06	0,01
2012	3,3	0,2	1,84	0,20	0,22	0,01
1999	2,8	0,9	2,51	1,96	0,33	0,08
1997	13,6	0,8	2,04	0,22	0,65	0,02
1980	8,7	0,1	2,03	0,19	1,36	0,03
1982	83,9	0,8	1,60	0,01	0,43	0,01
2045	58,2	1,5	1,96	0,04	1,94	0,02
2024	61,2	3,7	1,99	0,02	1,73	0,05
1989	57,3	3,6	1,89	0,03	0,34	0,01
1991	51,0	2,2	1,99	0,00	0,66	0,01
2022	33,9	2,8	1,90	0,02	0,23	0,00
2025	44,0	2,7	1,90	0,07	1,39	0,10
2016	70,8	5,5	1,91	0,01	0,25	0,00
2043	47,3	1,3	1,69	0,01	0,18	0,00
1998	69,7	2,2	1,71	0,03	0,28	0,00
2053	134,6	4,7	1,96	0,01	1,92	0,00

Tabla 9: Concentración y rangos 260/280 y 260/230 obtenidos en las lecturas del nanodrop en las extracciones de médula espinal cervical de ratones en el tercer estadio de la enfermedad.

Para las extracciones de ambos estadios, se observa un mejor rendimiento y pureza del producto en las muestras de cuádriceps. Las muestras de médula son más propensas a cierta contaminación con capacidad de absorber a 230 nm, pero que no interfiere en la retrotranscripción. En cuanto a la concentración de RNA obtenida, los valores son mucho mayores en cuádriceps.

4.2. Electroforesis del producto de la PCR

Se añadió el marcador de peso molecular en el segundo carril del gel, el amplificado de circDlc1 en el tercer carril, el amplificado de circDbc1 en el cuarto carril y el de cirCasc5 en el quinto carril, obteniendo los resultados mostrados en la **Figura 2**:

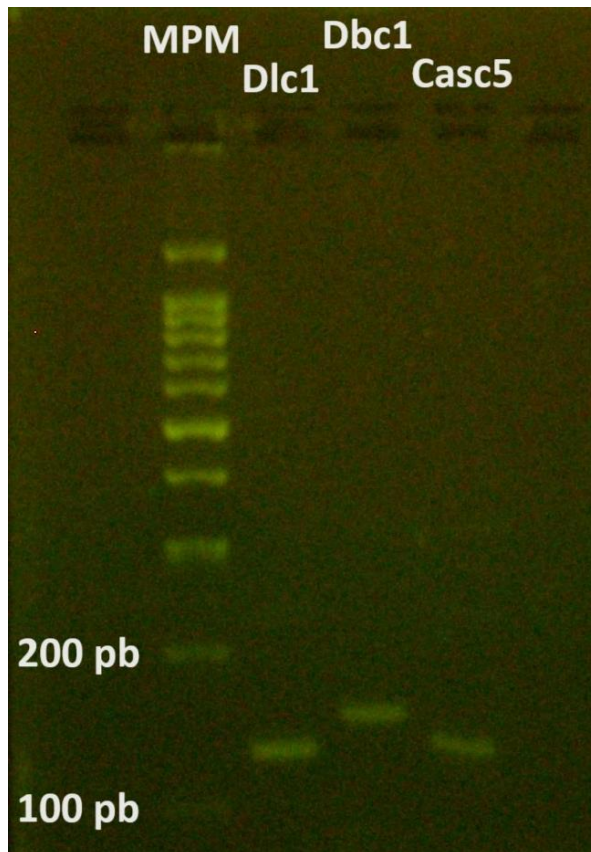


Figura 2: Resultado de la electroforesis realizada a los productos de la PCR. Como se observa en la imagen, los tres amplificados tienen un tamaño de entre 100 y 200 pares de bases, siendo el de circDlc1 y cirCasc5 de un tamaño similar y circDbc1, de una longitud ligeramente superior a las anteriores. Esto concuerda con su tamaño (132 pb cirCasc5 y circDlc1; 150 pb circDbc1).

4.3. Expresión génica

Los ciclos de amplificación o Cts obtenidos se han normalizado respecto al gen housekeeping de la β actina en el caso de la médula y al gen de la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa en tejido muscular, obteniendo así el Δ Ct o Ct normalizado. Estos genes han sido seleccionados en base a trabajos anteriores del grupo de la Dra. R. Osta que abordan la cuantificación de RNAs en tejido nervioso y muscular, y en el que se describen los mejores genes normalizadores en dichos tejidos. (13)

Para una mejor interpretación de los datos, se han dividido las muestras en 4 grupos realizados según el genotipo y tratamiento de cada individuo. Esta nomenclatura se mantendrá a lo largo del proyecto.

Grupo	Gen/trat
G1	+/C
G2	+/5FU
G3	-/C
G4	-/5FU

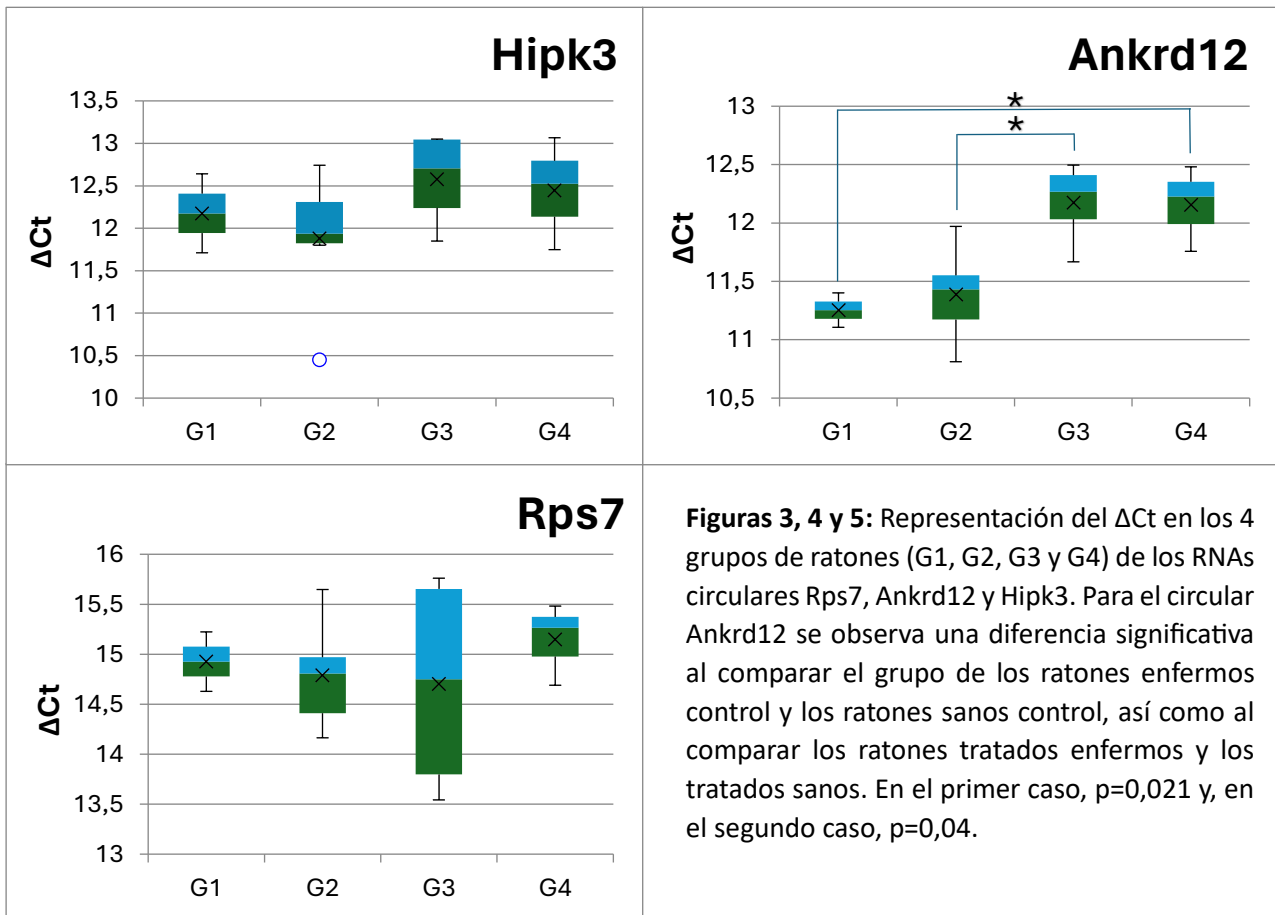
Tabla 10: Grupos generados conforme al genotipo (el + indica que es un animal enfermo y el – que es un animal sano) y tratamiento de los animales (C indica que no ha recibido tratamiento y 5FU, que ha sido tratado con 5-fluorouracilo).

4.3.1. Estadio sintomático temprano

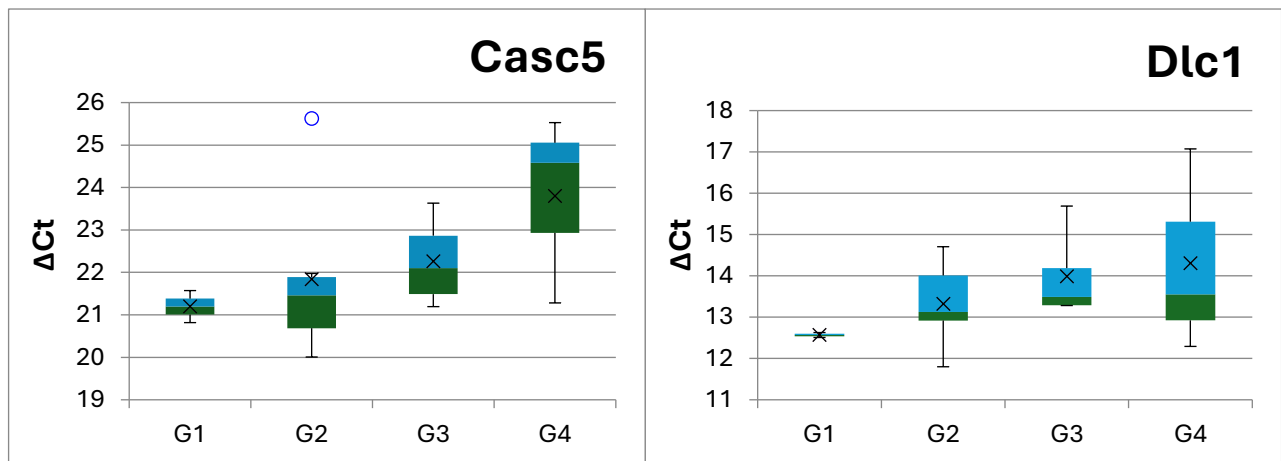
Cuádriceps derecho:

Muestra	Gen	Trat	Ct Gapdh	Ct Rps7 N	Ct Hipk3 N	Ct Ankrd12 N	Ct Casc5 N	Ct Dlc1 N
441	-	C	16,82	15,62	13,05	12,38	21,59	13,69
455	-	C	16,31	15,76	13,04	12,50	22,61	13,28
448	-	C	17,40	13,54	11,85	11,67	21,19	13,29
454	-	C	17,45	13,88	12,37	12,15	23,63	15,69
449	-	5FU	16,82	14,69	12,52	12,48	21,28	13,55
440	-	5FU	16,85	15,26	11,75	11,76	24,58	12,29
391	-	5FU	16,39	15,48	13,07	12,23	25,53	17,07
485	+	5FU	17,75	14,85	11,80	11,31	20,01	11,80
442	+	5FU	17,53	15,65	12,42	11,97	25,62	14,27
445	+	5FU	17,99	15,01	12,74	11,55	21,64	13,25
474	+	5FU	17,09	14,77	11,98	11,13	20,49	13,01
394	+	5FU	17,78	14,29	11,89	10,81	21,28	12,89
458	+	5FU	17,99	14,16	10,45	11,55	21,98	14,71
437	+	C	17,08	14,63	12,64	11,40	21,57	12,51
393	+	C	16,75	15,22	11,71	11,11	20,82	12,63

Tabla 11: Cts normalizados para todos los circulares ensayados y Cts del gen housekeeping Gapdh.



Figuras 3, 4 y 5: Representación del ΔCt en los 4 grupos de ratones (G1, G2, G3 y G4) de los RNAs circulares Rps7, Ankrd12 y Hipk3. Para el circular Ankrd12 se observa una diferencia significativa al comparar el grupo de los ratones enfermos control y los ratones sanos control, así como al comparar los ratones tratados enfermos y los tratados sanos. En el primer caso, $p=0,021$ y, en el segundo caso, $p=0,04$.

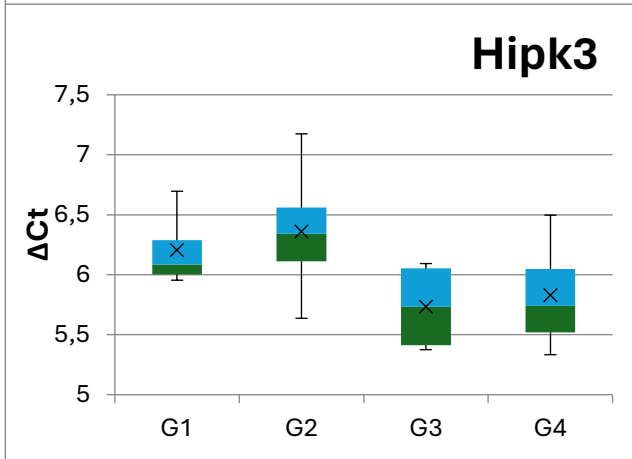
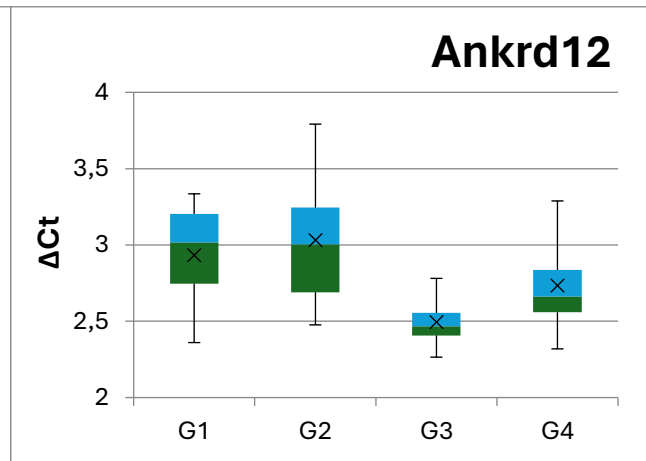
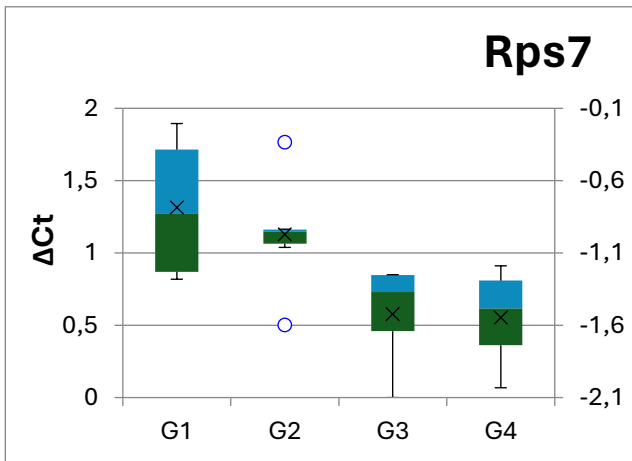


Figuras 6 y 7: Representación del ΔCt en los 4 grupos de ratones (G1, G2, G3 y G4) de los RNAs circulares Casc5 y Dlc1. Valores atípicos representados como círculos azules. No se observan diferencias significativas.

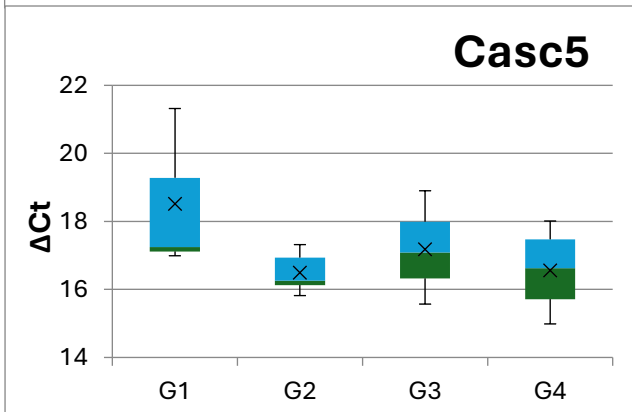
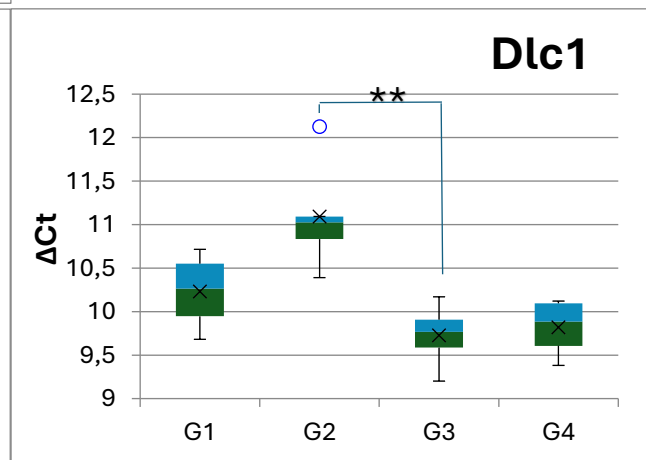
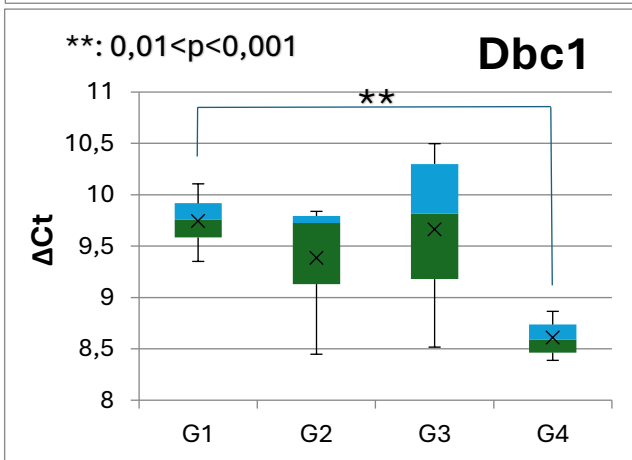
Médula espinal cervical:

Muestra	Gen	Trat	Ct Act β	Ct Rps7 N	Ct Hipk3 N	Ct Ankrd12 N	Ct Dlc1 N	Ct Dbc1 N	Ct Casc5 N
441	-	C	19,99	-2,11	5,43	2,26	18,01	8,69	18,01
455	-	C	20,77	-1,26	6,09	2,45	17,29	8,87	17,29
448	-	C	19,36	-1,26	5,38	2,48	14,99	8,39	14,99
454	-	C	19,31	-1,49	6,04	2,78	15,96	8,49	15,96
449	-	5FU	25,74	-1,33	6,50	3,29	-	9,40	-
440	-	5FU	20,71	-2,04	5,90	2,69	17,08	10,23	17,08
446	-	5FU	19,84	-1,20	5,58	2,32	15,57	8,52	15,57
391	-	5FU	21,60	-1,65	5,33	2,64	18,90	10,50	18,90
485	+	5FU	19,64	-1,07	6,07	2,48	16,26	8,45	16,26
442	+	5FU	19,31	-0,96	6,60	3,09	16,94	9,79	16,94
445	+	5FU	19,69	-0,97	6,44	3,30	15,82	9,84	15,82
474	+	5FU	21,99	-0,94	6,24	2,92	16,13	9,72	16,13
394	+	5FU	25,29	-0,34	7,17	3,79	-	-	-
458	+	5FU	21,65	-1,60	5,64	2,61	17,32	9,13	17,32
476	+	C	19,19	-0,45	6,70	3,16	17,25	9,66	17,25
443	+	C	19,46	-1,22	6,15	2,87	16,99	9,35	16,99
437	+	C	23,88	-1,29	6,02	2,36	21,32	9,85	21,32
393	+	C	26,25	-0,21	5,95	3,33	-	10,11	-

Tabla 12: Cts normalizados para todos los circulares ensayados y Cts del gen housekeeping Act β .



Figuras 8, 9 y 10: Representación del ΔCt en los 4 grupos de ratones (G1, G2, G3 y G4) de los RNAs circulares Rps7, Ankrd12 y Hipk3. Valores atípicos representados como círculos azules. No se observan diferencias significativas.



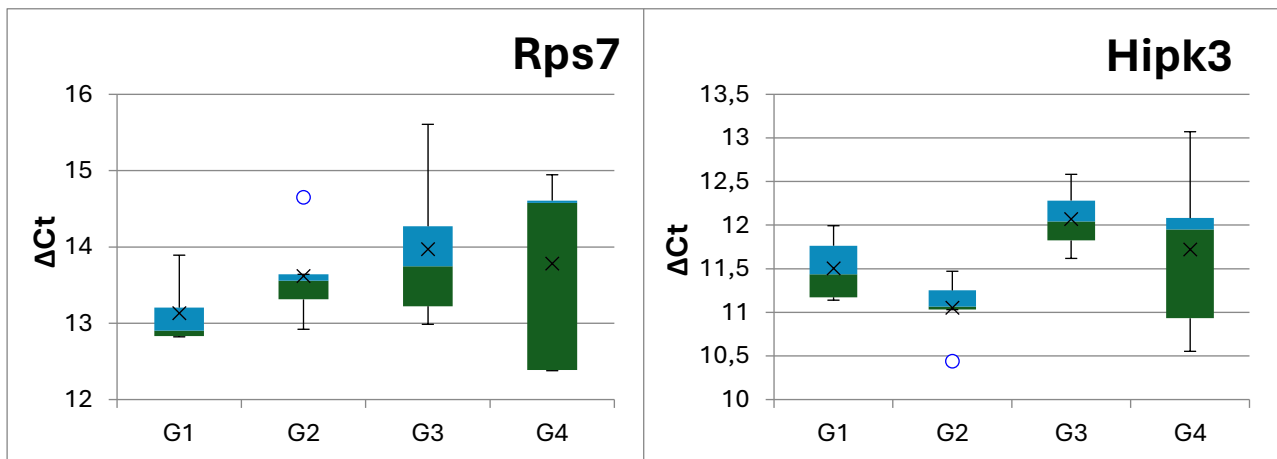
Figuras 11, 12 y 13: Representación del ΔCt en los 4 grupos de ratones (G1, G2, G3 y G4) de los RNAs circulares Casc5, Dlc1 y Dbc1. Valores atípicos representados como círculos azules. Para el circular Dbc1, se observa una diferencia significativa al comparar el grupo de los ratones enfermos control y los ratones sanos control, siendo $p=0,002$. Para el circular Dbc1, hay diferencias significativas al comparar los ratones tratados enfermos y los tratados sanos. En este caso, $p=0,006$.

4.3.2. Estadio sintomático tardío

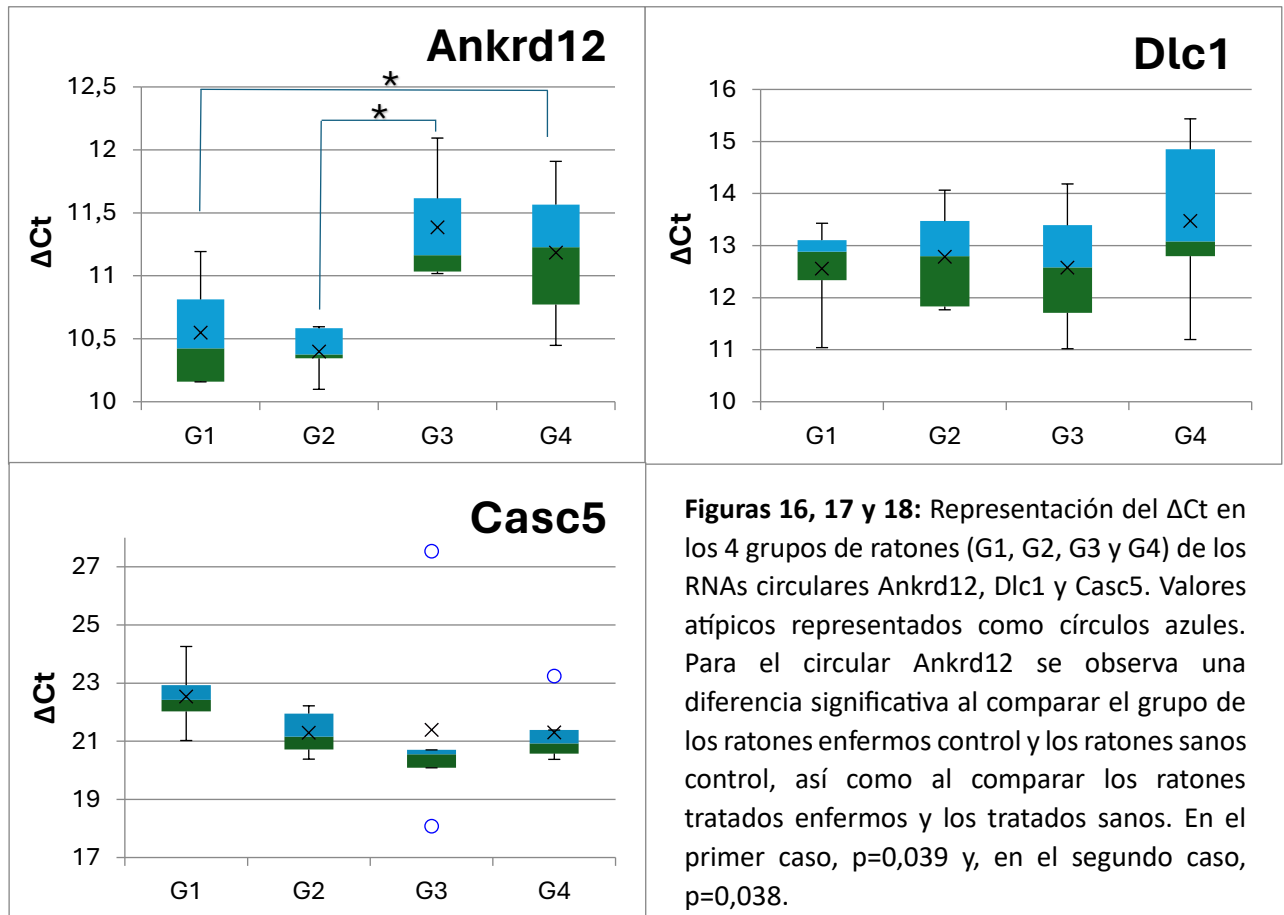
Cuádriceps derecho:

Muestra	Gen	Trat	Ct Gapdh	Ct Rps7 Nor	Ct Ankrd12 Nor	Ct Hipk3 Nor	Ct Dlc1 Nor	Ct Casc5 Nor
1980	+	C	19,65	12,83	10,16	11,69	11,04	22,49
1981	+	C	17,33	13,89	11,19	11,99	12,77	24,26
2016	+	C	18,24	12,82	10,69	11,14	13,43	21,02
1998	+	C	18,86	12,98	10,16	11,18	13,00	22,36
1982	+	5FU	16,71	13,64	10,60	11,47	11,83	22,22
2013	+	5FU	17,34	13,31	10,58	11,25	13,47	21,95
2045	+	5FU	18,66	12,92	10,10	10,44	12,80	20,72
2025	+	5FU	17,51	14,65	10,38	11,03	14,07	20,39
2053	+	5FU	18,19	13,56	10,35	11,06	11,77	21,15
1979	-	5FU	16,90	14,95	11,91	13,07	14,18	27,54
1990	-	5FU	16,61	14,58	11,23	11,95	13,39	20,55
1999	-	5FU	15,55	14,61	11,57	12,08	12,58	20,70
2043	-	5FU	18,51	12,39	10,45	10,55	11,02	18,08
2022	-	5FU	17,88	12,38	10,77	10,93	11,71	20,09
2012	-	C	19,06	13,22	11,02	11,62	15,43	20,38
1997	-	C	18,06	13,75	11,03	11,82	11,20	20,58
1989	-	C	17,08	12,99	11,62	12,04	12,80	21,39
1991	-	C	17,22	15,61	12,09	12,58	13,08	20,92
2024	-	C	17,49	14,27	11,16	12,28	14,85	23,23

Tabla 13: Cts normalizados para todos los circulares ensayados y Cts del gen housekeeping Gapdh.



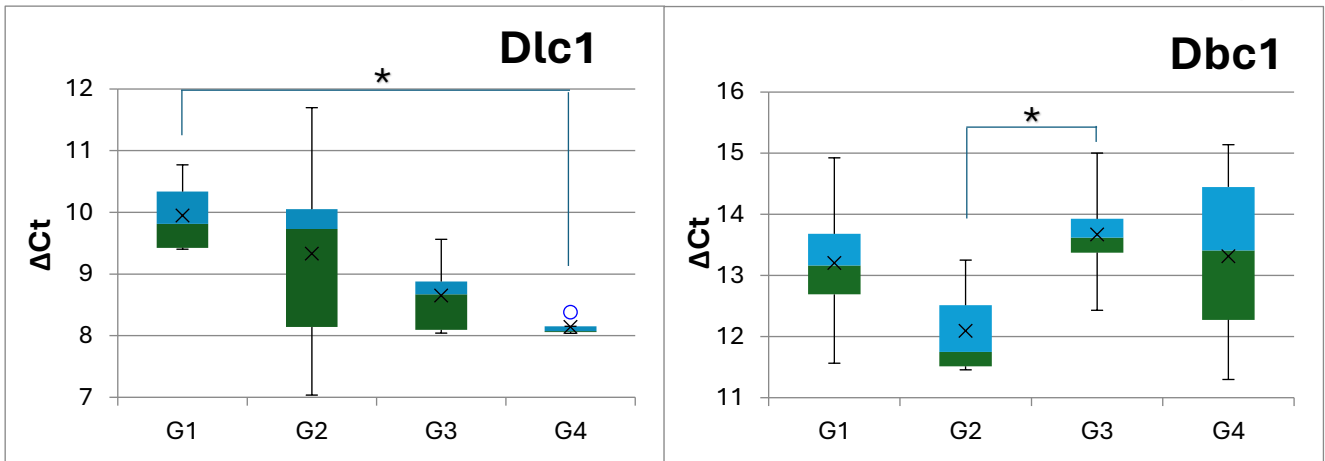
Figuras 14 Y 15: Representación del ΔCt en los 4 grupos de ratones (G1, G2, G3 y G4) de los RNAs circulares Rps7 y Hipk3. Valores atípicos representados como círculos azules.



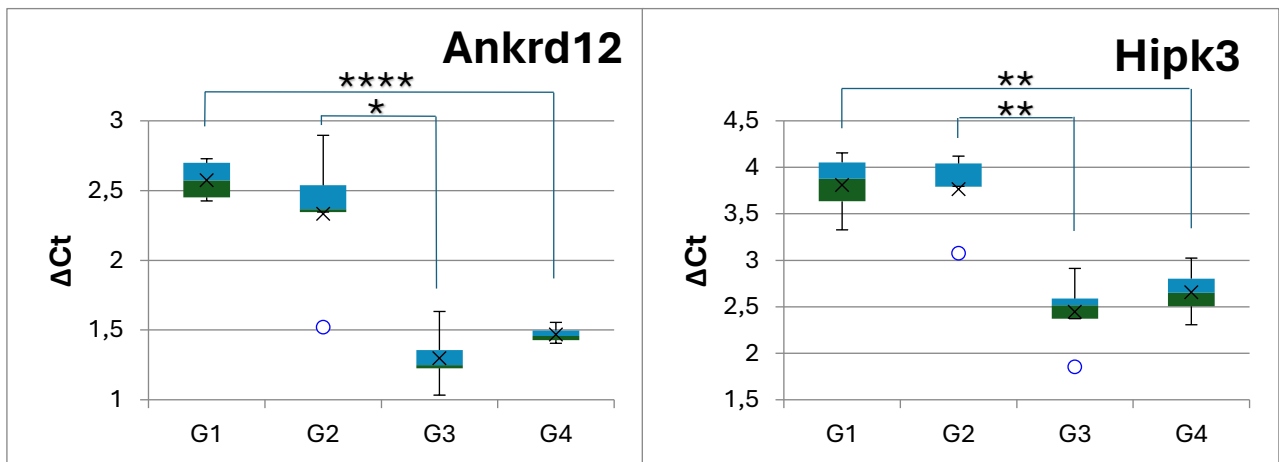
Médula espinal cervical:

Muestra	Genotipo	Tratamiento	Ct Act β	Ankrd12 N	Hipk3 N	Rps7 N	Ct Dlc1 Nor	Ct Dbc1 Nor	Ct Casc5 Nor
1980	+	C	19,41	2,46	3,74	-0,64	9,43	14,92	15,40
1981	+	C	19,38	2,73	4,15	-0,77	10,77	13,27	16,08
2016	+	C	19,87	2,43	3,33	-1,61	9,40	11,56	15,59
1998	+	C	21,16	2,69	4,02	-1,23	10,19	13,06	15,86
1982	+	5FU	23,53	2,35	3,80	-0,56	7,04	11,46	12,36
2013	+	5FU	20,35	2,90	4,12	-0,97	8,14	12,52	12,93
2045	+	5FU	18,81	2,54	4,04	-1,13	11,70	11,75	20,25
2025	+	5FU	19,32	2,37	3,80	-1,36	9,73	13,25	15,20
2053	+	5FU	19,47	1,52	3,08	-1,97	10,05	11,51	16,68
1979	-	5FU	23,12	1,56	2,57	-2,52	9,56	12,43	13,60
2043	-	5FU	20,32	1,48	2,31	-2,76	8,67	13,93	17,30
1999	-	5FU	22,12	1,41	3,02	-2,08	8,04	13,62	14,55
2022	-	5FU	20,02	1,44	2,73	-2,71	8,88	15,00	18,60
2012	-	C	21,06	1,63	2,91	-1,88	8,09	13,37	20,32
1997	-	C	19,57	1,23	2,52	-2,57	8,07	11,30	12,62
1989	-	C	20,37	1,36	2,37	-3,01	8,04	12,60	13,28
1991	-	C	19,80	1,25	2,59	-2,48	8,38	15,14	12,62
2024	-	C	19,98	1,03	1,86	-3,35	8,08	14,22	12,70

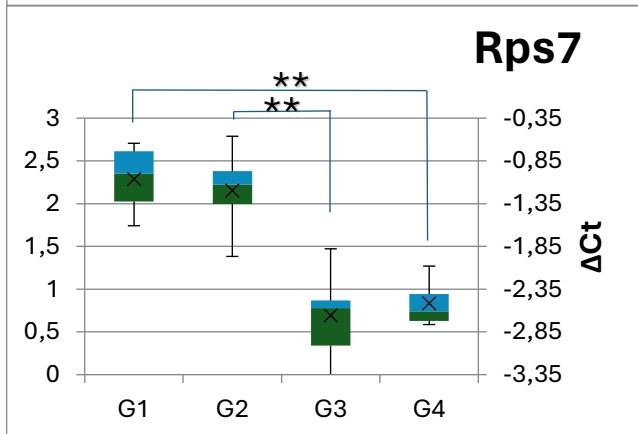
Tabla 14: Cts normalizados para todos los circulares ensayados y Cts del gen housekeeping Act β .



Figuras 19 y 20: Representación del ΔCt en los 4 grupos de ratones (G1, G2, G3 y G4) de los RNAs circulares Dbc1 y Dlc1. Valores atípicos representados como círculos azules. Para el circular Dlc1, se observa una diferencia significativa entre el primer y cuarto grupo, correspondiente a los ratones control enfermos y control sanos. Para este caso, $p=0,01$. En el caso del circular Dbc1, la comparación que ha resultado significativa es la de animales tratados enfermos y animales tratados sanos, con una $p=0,045$.



Figuras 21, 22 y 23: Representación del ΔCt en los 4 grupos de ratones (G1, G2, G3 y G4) de los RNAs circulares Ankrd12, Hipk3 y Rps7. Valores atípicos representados como círculos azules.



Respecto al circular Ankrd12, observamos una diferencia significativa al comparar el grupo de los ratones enfermos control y los ratones sanos control y al comparar los ratones tratados enfermos y los tratados sanos. Para la primera comparación, $p<0,0001$ y, en el caso de la segunda, $p=0,018$.

En el caso del circular Hipk3, observamos una diferencia significativa al comparar el grupo de los ratones control enfermos y los sanos control. En este caso, $p=0,001$ Además, existe una diferencia significativa al comparar los ratones tratados enfermos y los tratados sanos, con $p=0,002$.

Por último, el circular Rps7, observamos una diferencia significativa al comparar el grupo de los ratones control enfermos y los control sanos, en la que $p=0,002$. Al comparar los ratones tratados enfermos y los tratados sanos, encontramos una nueva diferencia significativa con $p=0,002$.

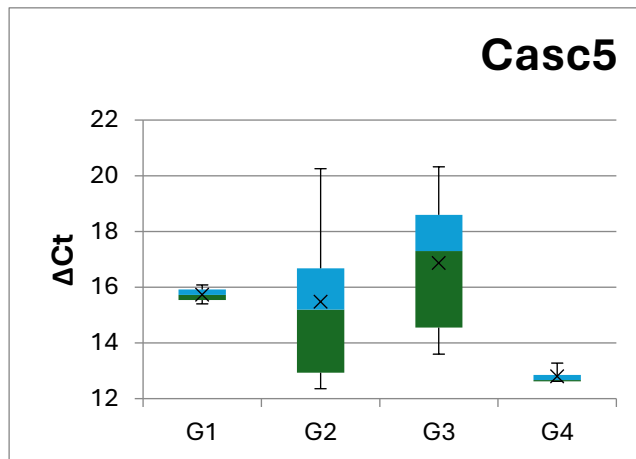


Figura 24: Representación del ΔC_t en los 4 grupos de ratones (G1, G2, G3 y G4) del RNA circular Casc5. Valores atípicos representados como círculos azules. No se observan diferencias significativas.

5. Discusión

La doble digestión mecánica ha resultado un buen método para el procesado de la muestra y su división en vista a futuros ensayos de proteína, pero el proceso de extracción de RNA utilizando el kit ZYMO ha resultado ser problemático con las muestras de médula espinal, observándose la presencia de un contaminante que absorbe a 230 nm en muchos de los extractos provenientes de médula. En los extractos de cuádriceps, sin embargo, no hay apenas problemas con el ratio 230/260. Nuestra hipótesis es que, o bien se debe al Trizol/Quiazol utilizado para cada extracción, o es debido a algún compuesto presente en el tejido, seguramente de naturaleza lipídica. Esta segunda hipótesis se basa en la aparición de una espuma grasa tras el procesado con Tissulyzer, de la que se arrastra una pequeña parte a la columna de extracción de RNA.

Otro problema observado en las muestras de médula es la baja concentración de RNA obtenida. En el primer estadio, tres de las muestras no se han podido utilizar para cuantificar todos los RNAs circulares debido a la ínfima cantidad de estos recuperada de la médula. En el tercer estadio, aunque las concentraciones del extracto han sido, en algunos casos muy bajas en médula, se ha podido cuantificar todas las dianas.

Respecto a la validez de los cebadores utilizados, todos han producido amplificación en las PCRs realizadas. Se ha comprobado que el fragmento amplificado era el esperado mediante la electroforesis de la **Figura 2**, donde se puede observar que las bandas aparecen en las regiones esperadas. Comenzando por la izquierda, encontramos en el segundo carril en marcador de peso molecular, que delimita la zona entre 100 y 200 pares de bases en la que deberían encontrarse nuestras bandas. En el tercer carril, aparece la banda correspondiente al circular Dlc1, de 132 pares de bases, misma longitud que el amplificado del circular Casc5, situado en el quinto carril. El cuarto carril corresponde al circular Dbc1, cuyo amplificado tiene una longitud de 150 pares de bases, ligeramente superior a los anteriores.

En modelo murino de ELA, el RNA circular Ankrd12 parece tener potencial como biomarcador, ya que se encuentra alterado en casi todos los estadios y tejidos. Así, este circular es el único cuya expresión se ha visto alterada en cuádriceps tanto en el primer como en el tercer estadio de la enfermedad, con una diferencia significativa tanto entre ratones control enfermos y control tratados como entre tratados enfermos y tratados sanos. En cuanto a la médula espinal, aparece una alteración en la expresión de este circular muy significativa en el último estadio, pero esta no se observa en el primer estadio, por lo que no sería un buen marcador diagnóstico en estadios sintomáticos tempranos en este tejido y

modelo animal. El circular se encuentra aumentado en músculo en animales enfermos y disminuido en médula espinal de animales enfermos.

El gen *Ankrd12* genera 11 transcritos. Las proteínas que se producen se encuentran mayormente en el nucleoplasma y, aunque su función y estructura son todavía desconocidas, se ha asociado su ausencia a trombocitosis y a la disminución del colesterol circulante. Conforme avanza la enfermedad, tiene lugar una alteración metabólica en los tejidos más afectados, como son la médula y el músculo esquelético. Niveles altos de colesterol suelen ayudar a que esta alteración sea menos grave, por lo que los bajos niveles de este circular encontrados en médula espinal podrían sugerir que este tejido nervioso puede ser más sensible a los niveles de colesterol que el músculo esquelético. (14–17)

Por otro lado, *ciRps7*, en el modelo estudiado, no ha resultado alterada en muestras de músculo estriado, pero sí en muestras de médula espinal de animales en el tercer estadio, donde encontramos alteraciones muy significativas. Además, este circular muestra una tendencia casi significativa a la alteración en médula espinal de animales en el primer estadio, con un valor de p de 0,053 al comparar el grupo 2 y 3, y un valor de 0,075 al comparar el grupo 1 y 4. Por ello, este RNA no parece ser buena diana de estudio en músculo, pero sí en médula, tejido en el que su expresión se encuentra disminuida, siendo detectable dicha alteración antes que la de *Ankrd12*.

El gen *ciRps7* genera 7 transcritos, que codifican principalmente a *RS7*, proteína que forma parte de la subunidad ribosómica 40S en eucariotas. Los niveles alterados de este circular en médula espinal y la ausencia de dicha alteración en músculo, pueden sugerir que la médula sea más sensible que el músculo a estas alteraciones metabólicas del RNA. (18,19)

El circular *Hipk3* muestra unas características similares a *ciRps7*, pero con una menor tendencia en el primer estadio. Por ello, este RNA parece no ser una buena diana en músculo, pero sí en médula espinal, tejido en el que muestra diferencias muy significativas en el tercer estadio entre el grupo uno y cuatro y el grupo dos y tres, estando su expresión disminuida en animales enfermos. Su alteración parece ser más tardía que la de *ciRps7*.

El gen del que proviene este circular genera 4 transcritos, 3 de ellos codificantes, que generan una proteína quinasa de tipo serín-treonín quinasa. Esta actúa fosforilando a *JUN*, *RUNX2* y *FADD*, inhibiendo la apoptosis y pudiendo favorecer la expresión de genes de respuesta a esteroides. Los niveles disminuidos de este circular en médula espinal concuerdan con una mayor muerte a nivel de motoneuronas, que se produce en este tejido y en mayor extensión en los estadios finales de progresión de la enfermedad. (20–22)

El RNA circular *Casc5*, en el modelo estudiado, no parece estar alterado ni por la presencia de la enfermedad ni por el fármaco 5-fluorouracilo. Esta molécula, además de no presentar diferencias en su expresión, tiene un importante inconveniente: su baja expresión. Este hecho dificulta su detección y hace además que los resultados de la cuantificación sean más variables y muy difíciles de obtener en muestras con un bajo rendimiento de extracción del RNA. Por todo esto *ciR Casc5* no parece ser un buen biomarcador en ninguno de los tejidos ensayados.

Respecto al RNA circular *Dbc1*, la expresión de este sólo ha sido detectable en médula espinal, por lo que podemos decir que, o su expresión en cuádriceps está por debajo del límite de detección o esta expresión no se produce en dicho tejido. Este RNA ha resultado muy significativamente alterado entre el grupo 1 y el 4 en muestras de médula espinal del primer estado y significativamente alterado en el

tercer estadio entre los grupos 2 y 3. Estos resultados podrían apuntar a una alteración del circular con la enfermedad, pero llaman la atención dos cosas en ellos: la primera es la alteración muy significativa entre los grupos 1 y 4 en el primer estadio sin estar alterados el grupo 2 y 3. Sucede lo mismo en el tercer estadio, en el que aparece una diferencia significativa entre el grupo 2 y el 3 sin apreciarse diferencia entre los grupos 1 y 4. Esto podría ser debido al bajo número de muestras empleado. El segundo aspecto que resaltar es que la alteración detectada en la médula del tercer estadio es un aumento de la expresión en los animales enfermos respecto a los sanos. De nuevo, esta alteración podría estar debida al bajo número de muestras procesadas.

Dbc1 (o Brinp1) es un gen con 4 transcritos que codifica para la proteína morfogénica ósea neuro específica inducible por ácido retinoico 1. Esta desempeña un papel importante en la formación del cerebro, neurogénesis y en el funcionamiento de las neuronas GABAérgicas. Teniendo en cuenta el papel de este circular en estos procesos celulares, el aumento detectado en su expresión en animales enfermos podría entenderse como una posible respuesta compensatoria frente al progreso neurodegenerativo de la enfermedad. (23,24)

En el último circular ensayado, circDlc1, encontramos una alteración significativa, en muestras de médula del primer estadio, entre los ratones sanos tratados y enfermos tratados. Así, también se observa una alteración significativa entre los ratones sanos control y los ratones enfermos control en médula de ratones en estado sintomático tardío. Ambas diferencias suponen una disminución de la expresión del circular en los animales enfermos. En cuanto a las muestras de cuádriceps, no se observan diferencias significativas en este circular. Si observamos las **Figuras 12 y 19**, parece que el tratamiento tenga, sobre los enfermos, un efecto a corto plazo y uno a largo plazo. El efecto a corto plazo resultaría en una disminución de la expresión del circular y, por el contrario, el efecto a largo plazo aumentaría la expresión de este.

El gen Dlc1 produce 9 transcritos. Uno de ellos da lugar a una proteína activadora de la Rho GTPasa, que favorece la inactivación de RHOA, RHOB, RHOC y CDC42. Este gen controla así, principalmente la remodelación del citoesqueleto mediante ROCK y mediante la formina. La disminución de este circular en médulas animales enfermos sugiere una alteración de la remodelación del citoesqueleto, que parece afectada por el tratamiento 5-fluorouracilo. Este muestra una acción indeseada durante las primeras aplicaciones y se llega a los efectos terapéuticos tras varias dosis. (25,26)

En resumen, circANKRD12 posee las mejores características para funcionar como biomarcador, especialmente por su alteración tanto en músculo como en médula. Tanto este circular como ciRps7 y circHipk3 aparecen alterados en médula espinal, pudiendo funcionar quizá como marcadores de la progresión de la patología. Los niveles alterados de estos circulares podrían estar relacionados con la desregulación de la síntesis proteica, la apoptosis y la supervivencia celular en la ELA, siendo la médula espinal, el tejido más sensible a la alteración de estos procesos celulares y moleculares.

Dlc1 podría estar siendo modificado por el tratamiento, por lo que, en futuras experiencias, sería conveniente comprobar si la ruta de remodelación del citoesqueleto controlada por Rho es alterada por el tratamiento con 5-fluorouracilo. En cuanto a Dbc1, sería interesante un análisis con un mayor número de animales de su alteración en médula espinal de animales en el primer estadio, siendo un posible candidato a biomarcador para diagnóstico precoz, con el inconveniente de expresarse sólo en tejido nervioso.

6. Conclusiones

Así, en las condiciones de nuestro estudio y con la bibliografía consultada hemos obtenido las siguientes conclusiones:

- Los niveles disminuidos de los circulares Hipk3, Rps7 y Ankrd12 en médula espinal podrían indicar que, en la ELA, este tejido muestra una mayor sensibilidad a procesos de supervivencia y muerte celular.
- La expresión del circular Ankrd12 está aumentada en músculo, con diferencias significativas en el primer estadio, pudiendo ser un buen candidato a biomarcador de naturaleza diagnóstica en biopsias musculares.
- El RNA circular Dlc1 puede estar involucrado en las vías moleculares afectadas por el tratamiento 5-fluorouracilo.

Conclusions

- Decreased levels of circulars Hipk3, Rps7, and Ankrd12 in the spinal cord may indicate that, in ALS, this tissue shows greater sensitivity to survival and cell death processes.
- The expression of circular Ankrd12 is increased in muscle, with significant differences in the first stage, making it a good candidate as a diagnostic biomarker in muscle biopsies.
- Circular RNA Dlc1 may be involved in the molecular pathways affected by 5-fluorouracil treatment.

7. Bibliografía

1. Hardiman O, Al-Chalabi A, Chio A, Corr EM, Logroscino G, Robberecht W, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Dis Primers* [Internet]. 2017 Oct 5 [cited 2024 Feb 26];3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28980624/>
2. Mejzini R, Flynn LL, Pitout IL, Fletcher S, Wilton SD, Akkari PA. ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? *Front Neurosci* [Internet]. 2019 Dec 6 [cited 2024 Mar 14];13. Available from: <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01310>
3. Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) | Hospital [Internet]. [cited 2024 Mar 14]. Available from: <https://hospital.vallhebron.com/es/asistencia/enfermedades/esclerosis-lateral-amiotrofica-ela>
4. Definición de biomarcador - Diccionario de cáncer del NCI - NCI [Internet]. [cited 2024 Mar 14]. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/biomarcador>
5. Zhang XO, Wang H Bin, Zhang Y, Lu X, Chen LL, Yang L. Complementary sequence-mediated exon circularization. *Cell* [Internet]. 2014 Sep 25 [cited 2024 Jun 7];159(1):134–47. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.001>
6. Häslér J, Strub K. Alu elements as regulators of gene expression. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2006 Nov [cited 2024 Jun 7];34(19):5491–7. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkl706>

7. Rbbani G, Nedoluzhko A, Galindo-villegas J, Fernandes JMO. Function of circular rnas in fish and their potential application as biomarkers. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2024 Jun 7];22(13). Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms22137119>
8. Tsitsipatis D, Mazan-Mamczarz K, Si Y, Herman AB, Yang JH, Guha A, et al. Transcriptomic analysis of human ALS skeletal muscle reveals a disease-specific pattern of dysregulated circRNAs. *Aging (Albany NY)* [Internet]. 2022 Dec 12 [cited 2024 Mar 14];14(24):9832. Available from: <https://doi.org/10.18632/aging.204450>
9. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer* 2003 3:5 [Internet]. 2003 May [cited 2024 Mar 14];3(5):330–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrc1074>
10. Rando A, De La Torre M, Martinez-Muriana A, Zaragoza P, Musaro A, Hernández S, et al. Chemotherapeutic agent 5-fluorouracil increases survival of SOD1 mouse model of ALS. *PLoS One* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2024 Jun 10];14(1). Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210752>
11. de la Torre Sebastián M. Mecanismo de acción del fármaco 5-Fluorouracilo y su efectividad como tratamiento en un modelo murino de Esclerosis Lateral Amiotrófica. / Miriam de la Torre Sebastián [Internet]. [cited 2024 Jun 7]. Available from: <https://zagan.unizar.es/record/106241>
12. Daniel R. Rosen et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 1993 Mar 4;362.
13. Calvo AC, Moreno-Igoa M, Manzano R, Ordovás L, Yagüe G, Oliván S, et al. Determination of protein and RNA expression levels of common housekeeping genes in a mouse model of neurodegeneration. *Proteomics* [Internet]. 2008 Oct [cited 2024 Jun 8];8(20):4338–43. Available from: https://www.researchgate.net/publication/23279978_Determination_of_protein_and_RNA_expression_levels_of_common_housekeeping_genes_in_a_mouse_model_of_neurodegeneration
14. Total cholesterol (ESLIM_015_001_017) chart for Ankrd12 | International Mouse Phenotyping Consortium [Internet]. [cited 2024 Jun 6]. Available from: https://www.mousephenotype.org/data/charts?accession=MGI:1914357&allele_accession_id=MGI:4432195&zygosity=heterozygote¶meter_stable_id=ESLIM_015_001_017&pipeline_stable_id=ESLIM_002&procedure_stable_id=ESLIM_015_001¶meter_stable_id=ESLIM_015_001_017&phenotyping_center=MRC%20Harwell
15. Platelets count (ESLIM_016_001_008) chart for Ankrd12 | International Mouse Phenotyping Consortium [Internet]. [cited 2024 Jun 6]. Available from: https://www.mousephenotype.org/data/charts?accession=MGI:1914357&allele_accession_id=MGI:4432195&zygosity=heterozygote¶meter_stable_id=ESLIM_016_001_008&pipeline_stable_id=ESLIM_002&procedure_stable_id=ESLIM_016_001¶meter_stable_id=ESLIM_016_001_008&phenotyping_center=MRC%20Harwell
16. Gene: Ankrd12 (ENSMUSG00000034647) - Phenotypes - Mus_musculus - Ensembl genome browser 112 [Internet]. [cited 2024 Jun 6]. Available from: https://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Phenotype?db=core;g=ENSMUSG00000034647;r=17:66272693-66384084

17. Dupuis L, Corcia P, Fergani A, Gonzalez De Aguilar JL, Bonnefont-Rousselot D, Bittar R, et al. Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* [Internet]. 2008 [cited 2024 Jun 8];70(13):1004–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18199832/>
18. Rps7 - Small ribosomal subunit protein eS7 - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2024 Jun 6]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P62082/entry>
19. Gene: Rps7 (ENSMUSG00000061477) - Summary - Mus_musculus - Ensembl genome browser 112 [Internet]. [cited 2024 Jun 6]. Available from: https://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Summary?db=core;g=ENSMUSG00000061477;r=12:28680853-28685952
20. Gene: Hipk3 (ENSMUSG00000027177) - Summary - Mus_musculus - Ensembl genome browser 112 [Internet]. [cited 2024 Jun 6]. Available from: https://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Summary?db=core;g=ENSMUSG00000027177;r=2:104256826-104324791
21. Hipk3 - Homeodomain-interacting protein kinase 3 - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2024 Jun 6]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9ERH7/entry>
22. Moreno-Igoa M, Calvo AC, Penas C, Manzano R, Oliván S, Muñoz MJ, et al. Fragment C of tetanus toxin, more than a carrier. Novel perspectives in non-viral ALS gene therapy. *J Mol Med* [Internet]. 2010 Nov 18 [cited 2024 Jun 8];88(3):297–308. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00109-009-0556-y>
23. Gene: Brinp1 (ENSMUSG00000028351) - Summary - Mus_musculus - Ensembl genome browser 112 [Internet]. [cited 2024 Jun 6]. Available from: https://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Summary?db=core;g=ENSMUSG00000028351;r=4:68679751-68872634
24. Brinp1 - BMP/retinoic acid-inducible neural-specific protein 1 - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2024 Jun 6]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q920P3/entry>
25. Gene: Dlc1 (ENSMUSG00000031523) - Summary - Mus_musculus - Ensembl genome browser 112 [Internet]. [cited 2024 Jun 6]. Available from: https://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Summary?db=core;g=ENSMUSG00000031523;r=8:37034905-37420297
26. Dlc1 - Rho GTPase-activating protein 7 - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2024 Jun 6]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9R0Z9/entry>

8. Anexos

Anexo 1:

El protocolo exacto seguido para la extracción de RNA se describe a continuación:

1º-Añadir 450 µL de etanol puro a cada tubo y vortear.

2º- Preparar las columnas Zymo-spin IIC del kit y cargar todo el contenido de cada tubo en las correspondientes columnas. Centrifugar a 12.000 g durante 1 minuto. Descartar el eluido.

3º-Añadir 400 µL de la solución "Direct-Zol Prewash Solution" y centrifugar a 12.000 g durante 1 minuto. Descartar eluido.

4º-Añadir de nuevo 400 µL de solución de prelavado "Direct-Zol Prewash Solution" y centrifugar a 12.000 g durante 1 minuto. Descartar eluido.

5º-Añadir 700 µL de la solución "RNA Wash Buffer" y centrifugar 1 minuto a 12.000 g. Descartar eluido.

6º-Centrifugar de nuevo 2 minutos a 12.000 g y transferir la columna a un tubo eppendorf libre de RNAsas.

7º-Añadir 30-50 µL de agua RNasa free lo más próxima a la membrana de la columna posible, pero sin tocar esta. Centrifugar 1 minuto a 14.000 g. Asegurarse de que el agua ha pasado la columna.

8º-Poner inmediatamente en hielo y medir la concentración de RNA en el nanodrop. Conservar a -80ºC.

Anexo 2:

Estadio sintomático temprano:

CÓDIGO	ID	GENOT	SEXO	TRATAM
2	OGA0454	-	M	C
3	OGA0455	-	M	C
4	OGA0448	-	M	C
16	OGA0441	-	M	C
5	OGA0449	-	M	5FU
13	OGA0440	-	M	5FU
15	OGA0446	-	M	5FU
17	OGA0391	-	M	5FU
7	OGA0485	+	M	C
9	OGA0442	+	M	C
12	OGA0445	+	M	C
14	OGA0474	+	M	C
18	OGA0394	+	M	C
6	OGA0458	+	M	5FU
8	OGA0476	+	M	5FU
10	OGA0443	+	M	5FU
11	OGA0437	+	M	5FU
19	OGA0393	+	M	5FU

Estadio sintomático tardío:

ID	SEXO	GENOT	TRATAM
OOGA1980	M	+	C
OOGA1981	M	+	C
OOGA2016	M	+	C
OOGA2044	M	+	C
OOGA1998	M	+	C
OOGA1982	M	+	FU
OOGA2013	M	+	FU
OOGA2045	M	+	FU
OOGA2025	M	+	FU
OOGA2053	M	+	FU
OOGA1979	M	-	FU
OOGA2043	M	-	FU
OOGA1999	M	-	FU
OOGA1990	M	-	FU
OOGA2022	M	-	FU
OOGA2012	M	-	C
OOGA1997	M	-	C
OOGA1989	M	-	C
OOGA1991	M	-	C
OOGA2024	M	-	C

Anexo 3:

ID	GENOT	SEXO	TRATAM
OGA1454	-	H	C
OGA1475	-	H	C
OGA1518	-	H	C
OGA1553	-	H	c
OGA1449	-	H	5FU
OGA1474	-	H	5FU
OGA1514	-	H	5FU
OGA1532	-	H	5FU
OGA1402	+	H	C
OGA1423	+	H	C
OGA1433	+	H	C
OGA1543	+	H	C

Anexo 4:

-CircDlc1:

Cebador directo: **GACTCAAAAGGGATGGAAGT**

Tm (1 M Na⁺)=69°C Tm (50 mM Na⁺)=47°C GC%=48

Cebador reverso: **GACCACCCAGGAGACTGTA**

Tm (1 M Na⁺)=70°C Tm (50 mM Na⁺)=48°C GC%=58

Estos cebadores no generan horquillas, heterodímeros ni homodímeros lo suficientemente estables para producir una amplificación durante la PCR. Además, no hay posibles amplicones en *Mus musculus* para estos cebadores.

El producto de la PCR es un fragmento de 132 pares de bases:

GACTCAAAAGGGATGGAAGTCGGGAAAGAAGATTTCAAATGCATGGGTCAAGGAAGAGAGTGTGA
TCTGCCATGTTG**TCCA-CTT**CTCTTGCAGCTGACTTGATTGTCTACAGTCTCTGGGTGGTC

La zona marcada en rojo corresponde a la zona de circularización, marcada por un guion.

-CircDbc1:

Cebador directo: **GCCGACTGAACAACTTCTC**

Tm (1 M Na⁺)=68°C Tm (50 mM Na⁺)=47°C GC%=50

Cebador reverso: **GAGGCTCAGAGGCAGAAA**

Tm (1 M Na⁺)=67°C Tm (50 mM Na⁺)=45°C GC%=56

Estos cebadores no generan horquillas, heterodímeros ni homodímeros lo suficientemente estables para producir una amplificación durante la PCR. Se detectan 3 posibles amplicones en *Mus musculus* para estos cebadores, pero tienen baja afinidad por los cebadores y una temperatura de melting muy baja, por lo que no suponen un problema. Si se quiere comprobar que no se produce esta amplificación indeseada, se puede hacer un gel de agarosa para observar el tamaño del amplificado. Los amplicones no deseados son todos de más de 500 pb, mientras que el deseado tiene 150, por lo que es fácil discriminarlos por tamaño.

El producto de la PCR es un fragmento de 150 pares de bases:

GCCGACTGAACAACTTCTCTTGCAGATACTGCGGAAGATTATCTGA**AGAC-**
CTCTCTCTAGGCAGCTGGTGGTTGGATTGTGGCGGCAGCGCACACTGAGGCCAAAGAGCTTGC
GCGTCTCTGGATTTCTGCCTCTGAGCCTC

La zona marcada en rojo corresponde a la zona de circularización, marcada por un guion.

-CirCasc5:

Cebador directo: **GACTCAAAAGGGATGGAAGT**

Tm (1 M Na⁺)=66°C Tm (50 mM Na⁺)=45°C GC%=45

Cebador reverso: **GACCACCCAGGAGACTGTA**

Tm (1 M Na⁺)=70°C Tm (50 mM Na⁺)=48°C GC%=58

Estos cebadores no generan horquillas, heterodímeros ni homodímeros lo suficientemente estables para producir una amplificación durante la PCR. Además, no hay posibles amplicones en *Mus musculus* para estos cebadores.

El producto de la PCR es un fragmento de 132 pares de bases:

GAACTCAAAGGGATGGAAGTCGGGAAAGAAGATTTCAAATGCATGGGTCAAGGAAGAGAGTGTGA
TCTGCCATGTTG **CCA-CTT** CTCTTGCGCAGTCTGACTTGATTGTCTACAGTCTCCTGGGTGGTCA

La zona marcada en rojo corresponde a la zona de circularización, marcada por un guion.