

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de Titulación previo a la obtención del título de:

INGENIERA E INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS  
NATURALES

TEMA:

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES  $\beta$ -ACTIN, RUANS Y RUMYB10,  
INVOLUCRADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE ANTOCIANINAS MEDIANTE LA  
TÉCNICA RT- qPCR EN LA ESPECIE *Rubus niveus* RECOLECTADA EN EL  
CANTÓN RUMIÑAHUI – PROVINCIA DE PICHINCHA

AUTORES:

SOFÍA ALEXANDRA PEÑAHERRERA TOLEDO

OSWALDO JAVIER CHICAIZA CASTILLO

DIRECTORA:

VIVIANA PAMELA CHILUISA UTRERAS

Quito, Mayo del 2015

## **DECLARATORIA DE LA RESPONSABILIDAD**

Nosotros, autorizamos a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de titulación y su reproducción sin fines de lucro.

Además declaramos que los conceptos, análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo, son de exclusiva responsabilidad de los autores.

Quito, Mayo del 2015

---

Sofía Alexandra Peñaherrera Toledo  
1721547238

---

Oswaldo Javier Chicaiza Castillo  
0401400403

## **DEDICATORIAS**

Al Todopoderoso y la Virgen María por ser nuestra fortaleza y permitirnos alcanzar esta meta como primer peldaño de nuestra realización profesional por brindarnos sabiduría y fuerzas para no renunciar a nuestros sueños.

Sofía Alexandra Peñaherrera Toledo

Oswaldo Javier Chicaiza Castillo

A mis sobrinos José, Julián, Tomás y Agustina quienes son el motivo más grande de mi felicidad y la alegría de toda mi maravillosa familia, deseo entregarles mi esfuerzo y el mejor ejemplo con todo el amor del mundo.

A mis padres Ruth y Danilo por todo el amor, la fe en Dios y los valores que han cultivado en mí, y a mis hermanos Silvana, Xavier, Paul y Andrés quienes me han dado su ejemplo de amor, constancia y trabajo.

Sofía Alexandra Peñaherrera Toledo

A mis padres Néstor y Gloria, por su apoyo incondicional, por permanecer a mi lado guiándome, dándome ánimos y sobre todo por su amor, en todas las etapas de mi vida.

A mis hermanos Alex y Diego, por animarme, ser un gran ejemplo de calidad humana, con los que he podido confiar incondicionalmente.

Oswaldo Javier Chicaiza Castillo

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Ingeniera Viviana Chiluisa por haber puesto su confianza en nosotros, por su apoyo incondicional y por su abnegada labor de enseñanza tanto académica como personal.

A la Ingeniera Ivonne Vaca; al Doctor Marco Cerna y al Ingeniero Daniel Acurio por su cooperación durante el transcurso de la elaboración de este trabajo de titulación, por implantar en nosotros un pensamiento crítico e incrementar nuestros conocimientos y habilidades en la investigación.

A la Universidad Politécnica Salesiana por formarnos como buenos profesionales con altos valores humanos.

Sofía Alexandra Peñaherrera Toledo

Oswaldo Javier Chicaiza Castillo

## ÍNDICE GENERAL

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	3
<b>ANTECEDENTES</b> .....	3
1.1. Justificación .....	3
1.2. Objetivos .....	5
1.2.1. General .....	5
1.2.2. Específicos .....	5
1.3. Hipótesis .....	5
1.3.1. Nula .....	5
1.3.2. Alternativa .....	6
1.4. Variables .....	6
1.4.1. Variables independientes .....	6
1.4.2. Variables dependientes .....	6
1.5. Población y Muestra .....	6
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	8
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	8
2.1. Cantón Rumiñahui .....	8
2.2. Familia Rosaceae .....	9
2.3. Género <i>Rubus</i> .....	10
2.4. Especie <i>Rubus niveus</i> .....	11
2.4.1. Taxonomía .....	13
2.4.2. Descripción Botánica .....	14
2.5. Antocianinas .....	14
2.6. Detección de Antocianinas .....	17
2.6.1. Maceración .....	17
2.6.2. Determinación de las antocianinas por cromatografía líquida de alta resolución .....	17
2.6.3. Determinación de antocianinas por HPLC - MS/MS (Espectro de masas tándem) .....	18
2.6.4. Métodos moleculares .....	18
2.8. Transcripción .....	20
2.10. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real .....	23
2.11. Etapas de PCR .....	26
2.11.1. Desnaturalización o Melting .....	26

2.11.2. Hibridación o Annealing.....	27
2.11.3. Elongación o Polimerización.....	27
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	30
<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	30
3.1. Selección, obtención, y preparación de las muestras .....	30
3.2. Extracción de ARN.....	30
3.4. Elaboración de la Curva Estándar.....	32
3.5. Selección de Primers.....	34
3.6. Cuantificación mediante amplificación de RT-qPCR.....	35
3.7. Análisis Estadístico.....	36
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	39
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	39
4.1. Obtención de la Curva Estándar a partir de <i>Rubus glaucus</i> con el gen $\beta$ -Actin como control positivo. ....	39
4.2. Resultados obtenidos mediante la técnica RT- qPCR en el análisis de la expresión de los genes $\beta$ -Actin, RuANS y RuMYB10, en la especie <i>Rubus niveus</i> . ....	40
4.3. Análisis del Test de Shapiro–Wilks.....	43
4.5. Análisis del Test de Tukey.....	45
4.6. Análisis de la Curva de Amplificación .....	47
<b>CONCLUSIONES</b> .....	52
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	52
<b>LISTA DE EFERENCIAS</b> .....	52
<b>ANEXO</b>	

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa del Canton Rumiñahui.....	8
Figura 2. Morfología de <i>Rubus adenotrichos</i> Schltldl.....	11
Figura 3. Morfología de <i>Rubus niveus</i> .....	12
Figura 4. Descripción de la Ruta Biosintética de Antocianinas.....	15
Figura 5. Mecanismo de Replicación, Transcripción y Traducción.....	19
Figura 6. Inicio y Terminación del Proceso de Transcripción.....	21
Figura 7. Acoplamiento entre el ARNm y el ARNt, mediado por los Ribosomas.....	23
Figura 8. Mecanismo Básico de Amplificación de cDNA por PCR.....	25
Figura 9. Proceso de Desnaturalización de la hebra de DNA.....	26
Figura 10. Proceso de Hibridación de la hebra de DNA.....	27
Figura 11. Proceso de Elongación de la hebra de DNA.....	28
Figura 12. Determinación del Test de Shapiro–Wilks.....	36
Figura 13 Descripción del Análisis de Varianza de Una Vía.....	37
Figura 14. Elaboración de Diluciones en Serie.....	38
Figura 15. Curva Estándar obtenido a partir de las Concentraciones de cDNA de <i>Rubus glaucus</i> .....	39
Figura 16. Datos del Test de Shapiro–Wilks, obtenidos mediante InfoStat.....	42
Figura 17. Datos del del Análisis de la Varianza, obtenidos mediante InfoStat.....	43
Figura 18. Datos del Test de Tukey, obtenidos mediante InfoStat.....	45
Figura 19. Análisis de la Curva de Amplificación.....	47

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Taxonomía de <i>Rubus niveus</i> .....	13
Tabla 2: Descripción de Primers.....	33
Tabla 3: Número de Repeticiones.....	40
Tabla 4: Concentración (ng/ml) de la expresión de los genes $\beta$ -Actin, RuANS y RuMYB10, en la especie <i>Rubus niveus</i> .....	41

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Certificación de la especie <i>Rubus niveus</i> utilizada en la investigación.....	57
---	----

## RESUMEN

Aplicaciones biotecnológicas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (RT-qPCR) son técnicas de laboratorio que han revolucionado el mundo de la Biología Molecular, proporcionando resultados en menor tiempo y un alto grado de confiabilidad, permitiendo la comprensión de los genes, funcionamiento y expresión, como es el caso de los genes de las antocianinas de las cuales en los últimos tiempos se ha incrementado su interés debido a su actividad antioxidante, la cual genera efectos terapéuticos como reducción de enfermedades coronarias, mejoramiento de la agudeza visual, efectos anti-cancerígenos, anti-envejecimiento y antitumorales.

Mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa con transcripción inversa (RT-qPCR), se logró analizar el nivel de expresión de los genes  $\beta$ -Actin, RuANS y RuMYB10, involucrados en la biosíntesis de antocianinas en *Rubus niveus*, recolectadas en tres sectores del Cantón Rumiñahui. De acuerdo a los valores obtenidos con los análisis estadísticos Shapiro Wilks, Anova y el test de Tukey, se observó que no existen diferencias significativas en la expresión de los tres genes, generando los siguientes resultados: gen  $\beta$ -Actin presenta mayor concentración (174,65ng/mL), seguido por el gen RuANS (167,43ng/mL) y finalmente el gen RuMYB10 (163,55ng/mL), llegando a la conclusión que la especie estudiada presenta un nivel de expresión similar entre los tres genes analizados.

La presente investigación puede ser considerada como punto de partida para proyectos de mejoramiento de las especies del género *Rubus* (mora), con el propósito de incrementar su valor nutritivo y cultivarlas como fuente para la producción de nutraceuticos, medicamentos y por ende desarrollar la productividad y valor económico que este cultivo representa para el país.

**Palabras claves:** *Rubus niveus*, Antocianinas, RT-qPCR, gen  $\beta$ -Actin, gen RuANS, gen RuMYB10.

## ABSTRACT

Biotechnological applications such as (RT-qPCR) Quantitative Polymerase Chain Reaction, are laboratory techniques that have revolutionized the world of Molecular Biology, providing results in less time and in a high degree of reliability, allowing the understanding of genes, functioning and expression, as in the case of the genes of the anthocyanins, which in recent times have increased their interest due to its antioxidant activity which generates therapeutic effects such as reduction of coronary heart disease, improvement of visual acuity, anti-cancer, anti-aging and antitumor effects.

The Polymerase Chain Reaction with reverse transcription (RT-qPCR) allowed to analyze the level of expression of  $\beta$ -Actin, RuANS and RuMYB10, genes involved in the biosynthesis of anthocyanin in *Rubus niveus*, collected in three different sectors of Rumiñahui. According to values obtained with statistical analyses such as Shapiro Wilks, Anova and Tukey test, it was noted that significant differences in the expression of three genes did not exist and there were generated the following results: gene  $\beta$ -Actin, which has greater concentration (174, 65ngmL), followed by the RuANS gene (167, 43ngmL) and finally the RuMYB10 gene (163, 55ngmL), reaching the conclusion that the studied species presents a level of similar expression among the three analyzed genes.

This research can be considered as a starting point of projects for improving the genus *Rubus* (blackberry), in order to increase their nutritional value moreover grow them as a source for the production of nutraceuticals, drugs and therefore developing productivity and economic value that this crop represents for the country.

**Key words:** *Rubus niveus*, Anthocyanins, RT-qPCR,  $\beta$ -Actin gen, RuANS gen, RuMYB10 gen.

## INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, el interés por las propiedades de las antocianinas se ha incrementado, esto debido a sus propiedades farmacológicas, nutraceuticas y terapéuticas. Miyazawa, Nakagawa, Kudo, Muraishi & Someya (1999), declaran que las antocianinas no sufren ningún cambio durante su paso por el tracto digestivo al torrente sanguíneo, así generan sus efectos terapéuticos como reducción de enfermedades coronarias, mejoramiento de la agudeza visual, efectos anticancerígenos, antienvjecimiento y antitumorales, esto gracias a su actividad antioxidante.

Ciertos frutos ricos en antocianinas justifican esta actividad antioxidante, como la especie *Schizandra chinensis*, la cual demostró que el extracto acuoso de su fruto presentaba propiedades antioxidantes, otro ejemplo son los extractos de frutos de frijoles rojos que reportan efectos antitumorales; Hagiwara, Yoshino, Ichihara, Kowabe, Tomano, Aoki, Koda, Nakamura, Imaida, Ito & Shirai (2002), concluyen que extractos de papas púrpuras dulces y repollo morado causaron supresión de tumores en ratones, se ha comprobado que los arándanos inhiben las etapas de iniciación y avance de la carcinogénesis, estudios realizados en Italia revelaron que el 79% de los pacientes diabéticos que se ofrecieron a consumir 160mg de mora durante un mes mostraron alivio en los síntomas de retinopatía diabética.

El cultivo de mora durante los últimos tiempos se ha incrementado, así por ejemplo el mercado internacional durante el año 2002, generó una producción de 414 mil toneladas, los principales países productores de mora en el continente americano son Estados Unidos, Canadá y Chile y cuyo principal mercado es Europa, por lo que es importante determinar qué concentración y qué genes son los encargados de la biosíntesis de antocianinas en esta especie, que su consumo es de relevante importancia.

El conocimiento de los genes así como su funcionamiento y su expresión en las diversas especies, permite la apertura a una nueva era de la Biología y a su vez a la Biotecnología, pues abre un nuevo mundo de conocimiento más completo y detallado de

las bases moleculares y en últimas instancias su expresión, de esta forma el conocimiento genómico, no solo se basa en el funcionamiento de los genes, sino también por sus aplicaciones, en el campo de la salud, la producción, calidad y el rendimiento de alimentos.

Aplicaciones biotecnológicas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real, han contribuido en forma muy significativa a mejorar la calidad de vida de la población como por ejemplo con la detección de agentes infecciosos como patógenos en alimentos, la cuantificación viral, control de la eficacia de fármacos, el diagnóstico de tumores y la detección de polimorfismos, detección de enfermedades causadas por mutaciones genéticas, mejoramiento de especies de interés medicinal, alimenticio y económico mediante análisis genéticos; obteniendo resultados en menor tiempo y con un mayor grado de confiabilidad y repetitividad, esto debido al continuo crecimiento en la comprensión de las bases genéticas moleculares, estas nuevas tecnologías han venido a sustituir los métodos clásicos.

En la actualidad se dispone de gran cantidad de información concerniente a la actividad biológica, sin embargo, debemos profundizar sobre su funcionalidad, por tanto este estudio es pionero y generador de nuevas expectativas.

# CAPÍTULO 1

## ANTECEDENTES

### 1.1. Justificación

*Rubus* spp., es un cultivo económicamente importante y representa una fuente invaluable de compuestos relacionados con la salud, los cuales son usados tradicionalmente con fines terapéuticos. Además, estos compuestos están en muchos casos involucrados en la resistencia a estrés biótico y abiótico de las plantas (Efroze, 2010). La mora es una fruta de alto interés comercial a nivel nacional e internacional, por sus propiedades organolépticas y su contenido de compuestos benéficos para el organismo, especialmente por la presencia mayoritaria de taninos elágicos y antocianinas (Soto, 2010, p.2).

En Ecuador, *Rubus niveus* se localiza en las provincias de Esmeraldas, Pichincha y Azuay, con un rango de altitud entre los 2500 msnm hasta los 2800 msnm (Romoleroux, 1996, p.88); La fertilidad del suelo del Cantón Rumiñahui permite que este sea generoso en la producción agrícola como la arveja, fréjol, cebada, habas, maíz, papas, trigo, guabas, tomate, limón, aguacate, mora, capulí. Su tierra es propicia para la siembra y cosecha de todos los productos que se cultivan en el Callejón Interandino (Rivas A. , 2004, p.8).

Deighton (2000), menciona que *Rubus niveus* posee alto contenido de antocianinas (1,186 g.kg<sup>-1</sup>) proveniente del jugo y que aumenta según el grado de maduración (Chen, Yu, Tang & Wang, 2012, p.61). La mora posee una capacidad antioxidante superior al de otras frutas como el tomate de árbol (*Ciphomandra betacea*) (Farinango, 2010, p.13).

Las antocianinas son compuestos fenólicos del grupo de los flavonoides, en la naturaleza se presentan en forma de pigmentos en flores, frutos, bayas y hojas con diferentes estructuras químicas (Guerra, 2006, p.38). El interés por dichos pigmentos antociánicos y su investigación científica se ha incrementado en los últimos años, debido a las

propiedades medicinales enfocadas en la reducción de las enfermedades coronarias, cáncer, diabetes y procesos inflamatorios (Garzón, 2008, p.29).

La investigación biotecnológica en el campo de la biología molecular e ingeniería genética ha incursionado en el estudio de las técnicas para el análisis de la expresión génica (Rivas F. , 2010, p.31), como es el caso de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), una reacción bioquímica *in vitro* catalizada por una enzima; con esta técnica se podrán determinar ácidos nucleicos y secuencias específicas del material genético de organismos de interés y adicionalmente determinar la expresión génica en los experimentos realizados (Paz y Miño, 1998, p.47).

Se utiliza el término de expresión génica para referirse a la producción de mRNA de una célula, todas las células de un organismo contienen el mismo genoma, pero no todos los genes son transcritos y traducidos de la misma manera en un momento dado de una célula, sólo algunos genes se activan o expresan para producir proteínas, mientras que muchos otros son silenciados o reprimidos (Thieman, 2010, p.46).

El aporte de esta investigación, contribuirá a posteriores proyectos relacionados con la expresión génica de antocianinas, el protocolo llevará la metodología necesaria para la aplicación de herramientas o técnicas moleculares, para el aislamiento del material genético, y cuantificación de la expresión de los genes de interés.

En base a este estudio, el cual es novedoso y pionero en el país, favorecerá a desarrollar varias aplicaciones, en especial en la industria farmacéutica, alimenticia, cosmética y prácticas como el mejoramiento de productos agrícolas en base al conocimiento de las especies con mayor concentración de antocianinas, para conseguir beneficios en toda la cadena productiva.

## 1.2. Objetivos

### 1.2.1. General

- ❖ Analizar la expresión de los genes  $\beta$ -Actin, RuANS y RuMYB10, involucrados en la biosíntesis de antocianinas mediante la técnica RT- qPCR en *Rubus niveus* recolectadas en el Cantón Rumiñahui – Provincia de Pichincha.

### 1.2.2. Específicos

- ❖ Generar cDNA mediante la enzima transcriptasa inversa a partir de ARN extraído de frutos de *Rubus niveus*.
- ❖ Establecer una curva de calibración estándar de la concentración de cDNA obtenido del extracto del fruto mediante la técnica RT – qPCR, con la finalidad de determinar la concentración del DNA presente en las muestras, proveniente de los genes de interés.
- ❖ Cuantificar las concentraciones de cDNA para determinar la expresión génica para antocianinas en la especie *Rubus niveus*, mediante la técnica de PCR en Tiempo Real y establecer un proceso estándar.

## 1.3. Hipótesis

### 1.3.1. Nula

- ❖ Ninguno de los genes  $\beta$ -Actin, RuANS y RuMYB10, involucrados en la biosíntesis de antocianinas presenta expresión determinada mediante la técnica RT – qPCR.

### 1.3.2. Alternativa

- ❖ Al menos uno de los genes  $\beta$ -Actin, RuANS y RuMYB10, involucrados en la biosíntesis de antocianinas presenta expresión determinada mediante la técnica RT – qPCR.

## 1.4. Variables

### 1.4.1. Variables independientes

- ❖ Frutos maduros de *Rubus niveus*

### 1.4.2. Variables dependientes

- ❖ Concentración (ng/ml) de cDNA: Es la medición de la cantidad de ARN extraído en correlación con la curva estándar a partir de diluciones seriadas de muestras de *Rubus niveus* mediante PCR en Tiempo Real.

## 1.5. Población y Muestra

La población se encuentra representada por las muestras de frutos maduros de *Rubus niveus* recolectadas en el Cantón Rumiñahui – Provincia de Pichincha.

En base a los criterios de investigación se determinaron los siguientes atributos para el estudio:

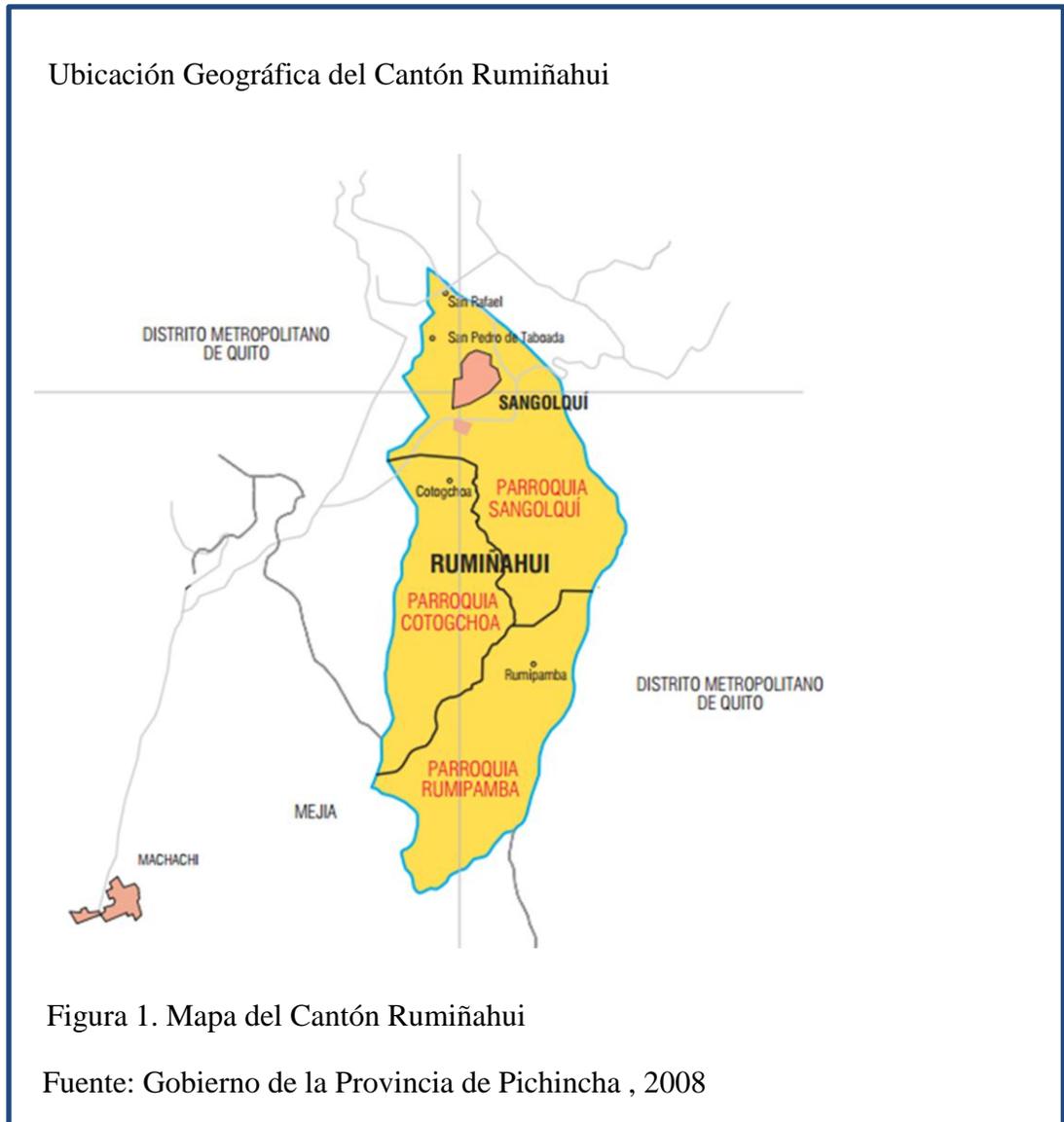
- ❖ Unidad experimental: 1 tubo eppendorf de 1,5ml que contiene 50 $\mu$ l de ARN extraído del frutos maduros de *Rubus niveus*.
- ❖ Unidades de estudio: Sectores del Valle de los Chillos: San Rafael, Capelo, San Pedro de Taboada.

- ❖ Intervalo de toma de muestras: 1 mes.
  
- ❖ Número de ensayos por muestra: 1 ensayo
  
- ❖ Número de análisis por ensayo: 2 análisis, cuantificación y detección de expresión génica.
  
- ❖ Número de repeticiones: 15 repeticiones por muestra.

## CAPÍTULO 2

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Cantón Rumiñahui



El cantón Rumiñahui constituye a uno de los ocho cantones que integran la provincia de Pichincha y se encuentra ubicado en el centro de la misma, el cantón está constituido por

tres parroquias urbanas: San Pedro de Taboada, San Rafael y Sangolquí; y, dos parroquias rurales: Cotogchoa y Rumipamba (Figura 1). El cantón lleva el nombre del héroe indio defensor de nuestra patria, el general Rumiñahui, se ubica al sureste de la Provincia de Pichincha, a veinte minutos del Distrito Metropolitano de Quito. (Gobierno de la Provincia de Pichincha , 2008, p.2)

Se caracteriza por un clima templado y propicio para la agricultura, el Cantón Rumiñahui presenta una temperatura promedio es de 17°C, la temperatura mínima se encuentra en los 6,5 °C y la máxima en 25,6 °C, la precipitación anual es de 824,8mm y posee una extensión de 134,15 km<sup>2</sup> (Gobierno de la Provincia de Pichincha , 2008, p.3).

El cantón Rumiñahui posee cuatro tipos de suelo: suelos que provienen de materiales piroclásticos con gran capacidad para retener el agua, suelos erosionados poco profundos, arenosos provenientes de material piroclástico meteorizado y otros erosionados con presencia de pómez (Salguero, 2012, p.27), los cuales son aptos para la siembra de toda clase de cereales, hortalizas, leguminosas y plantas frutales. Su tierra es propicia para la siembra y cosecha de todos los productos que se cultivan en el Callejón Interandino (Rivas A. , 2004, p.11).

## 2.2. Familia Rosaceae

Planta dicotiledónea perteneciente al orden de las Rosales, una de las familias más importantes y numerosa, con unos 100 géneros, en los que se reparten alrededor de 3000 especies, cuya distribución es casi mundial, pero principalmente en regiones templadas y subtropicales, incluye la mayor parte de las especies de frutas de consumo masivo: manzana, pera, membrillo, durazno, cereza, fresa, almendra, zarzamora, frambuesa, etc. También incluye muchas especies ornamentales, principalmente, las rosas, flores por excelencia, con importancia para la jardinería y la industria de perfumería (Rzedowsk & Calderón, 2005, p.36).

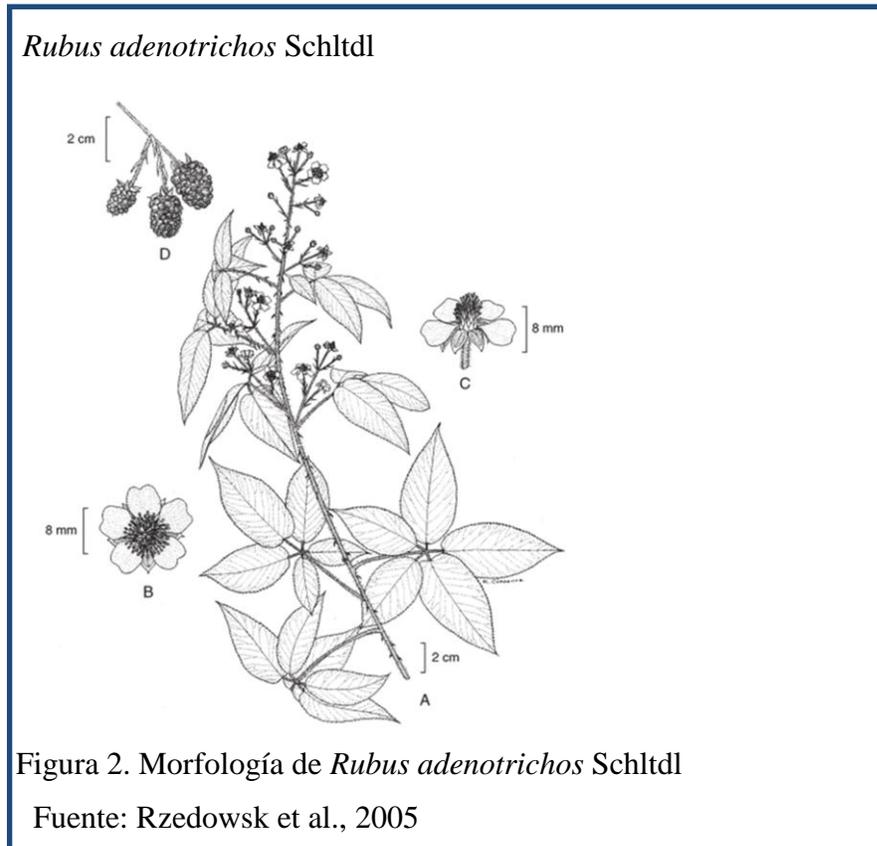
Son plantas herbáceas o leñosas, en ciertas especies provistas de espinas y trepadoras, sus hojas casi siempre alternas, simples o compuestas, poseen flores solitarias o dispuestas en inflorescencias variadas, su pedicelo a menudo se encuentra ensanchado en el ápice, de prefloración imbricada, los estambres se encuentran en número variable, por lo común 10 o más, libres o casi libres, dispuestos en verticilos, disco nectarífero por lo general presente; gineceo súpero o ínfero, frutos de formas variadas: folículo, pomo, aquenio, drupa, etc. y sus semillas por lo común desprovistas o casi desprovistas de endospermo (Rzedowsk et al., 2005, p.40).

### 2.3. Género *Rubus*

Perteneciente a la familia Rosaceae, es el género de mayor abundancia en especies del reino vegetal, se encuentran diseminadas en casi todo el mundo, excepto en las zonas desérticas y comprende cerca de 500 especies. Son arbustos perennes con tallos bianuales, erectos, arqueados o rastreros, frecuentemente aculeados y pilosos y a veces también con glándulas pediculadas o cerdas sin glándulas. En la Figura 2, se puede observar una planta de *Rubus* que presenta hojas alternas, pinnadas, estipuladas. Inflorescencias laterales o terminales en los tallos del segundo año, flores solitarias o en corimbos o panículas; sépalos 5, persistentes; pétalos 5 en un disco alrededor de la base del receptáculo; estambres y carpelos numerosos, su fruto es una drupa compuesta de 0.5–2 cm (Jennings, 1998, p.110).

El óptimo ecológico de la mayoría de las especies es sobre suelos moderadamente ricos en nutrientes y en emplazamientos húmedos, sin embargo existen especies que se caracterizan por requerir suelos ricos con pH básico y otras por el contrario los prefieren ácidos, otorgando así al género un amplio espectro de distribución y hábitat para su crecimiento. La mitad de los cultivos de este género en el mundo son semi-erectos, el 25% son erectos y 25% rastreros, de los cuales, para la producción de frutos de consumo fresco se prefiere a los cultivares erectos y semi-erectos, mientras que las frutas de los cultivares rastreros se utilizan principalmente como alimento procesado. En los últimos años el interés en las moras y otras especies del género *Rubus* ha crecido gracias a sus altos contenidos de antocianinas, compuestos fenólicos y flavonoides, dado que son

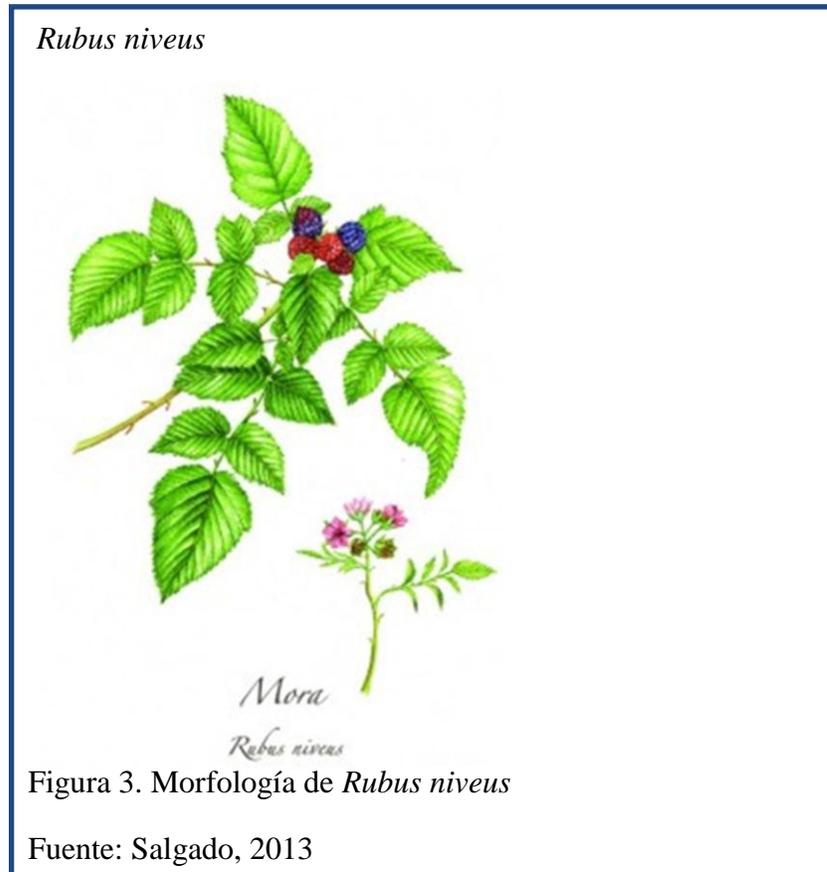
reconocidos en medicina por su destacada actividad antioxidante, como retardante de la oxidación de los tejidos causantes del envejecimiento físico y mental (Patel, 2004, p.1505).



#### 2.4. Especie *Rubus niveus*

Quinton (2011), indica que *Rubus niveus* es originaria de Asia, sin embargo en la actualidad se la puede encontrar en todo el mundo, la diversidad de este género forma una gran variedad de frutos, los cuales poseen compuestos quimiopreventivos como las antocianinas (Martínez, 2011, p.68). *Rubus niveus* presenta hojas verdes biserradas, tallo blanco protegido por espinas, las inflorescencias son hermafroditas con pétalos rosa y estambres color fucsia, los frutos son bayas de colores rojos a morados (Figura 3).

Tiene un rango climático grande, esta especie prefiere un suelo bien drenado, y soporta heladas leves, en las zonas tropicales *Rubus niveus* crece como una planta perenne y en zonas con inviernos severos, la especie se comporta como anual, es susceptible a las sequías largas (Morton, 1987, p.109). En el Ecuador se encuentra presente en las provincias de Azuay, Esmeraldas, Galápagos, Loja, Napo, Pichincha, Sucumbíos y Zamora-Chinchipe (Landázuri, 2010. p.28).



Los frutos son consumidos por las aves, roedores y seres humanos, la composición del fruto es aproximadamente de 7,8 % de azúcar, proteína 0,13 %, y 0,77 % de cenizas (Morton, 1987, p.109).

Landázuri (2010), manifiesta que *Rubus niveus* se desarrolla mejor en las zonas húmedas, brindándole un hábitat muy apropiado para su propagación, la cual lo realiza mediante sus semillas y por estolones que le permiten expandirse. Los seres humanos

consumen los frutos en fresco, mermeladas, vinos y dulces, además, la fruta se puede utilizar para crear colorantes que van de azul mate a púrpura y, según Uniyal, Singh, Jamwal & Lal (2006), las raíces frescas de *Rubus niveus* se utilizan para curar el sangrado excesivo durante la menstruación.

#### 2.4.1. Taxonomía

Según Landázuri (2010), *Rubus niveus* presenta la siguiente descripción botánica: (Tabla 1).

Tabla 1.

Taxonomía de *Rubus niveus*

<b>Reino</b>	<b>Vegetal</b>
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Dicotiledonea
<b>Subclase</b>	Arquiclamidea
<b>Orden</b>	Rosales
<b>Familia</b>	Rosaceae
<b>Genero</b>	<i>Rubus</i>
<b>Especie</b>	<i>Niveus</i>

Nota: Autores, 2015

Fuente: Landázuri, 2010

#### 2.4.2. Descripción Botánica

Landázuri (2010), señala que *Rubus niveus* presenta un arbusto suberecto, que puede llegar a medir 5m de alto, sus tallos son glabrosos, cortantes, espinosos, con una base ancha y en ocasiones recta o un poco curvada, consta de estípulas lanceoladas con una medida de 6-15 x 1-3mm, su pecíolo puede alcanzar los 50mm. Las hojas toman la forma imparipinada, ovada con una dimensión de 2-7,5 x 1,5-5cm, con 9 a 11 pares de venas secundarias y generalmente base redondeada, con punta aguda y margen biserrado. (Romoleroux, 1996, p.91), menciona que las flores pueden llegar a medir de 3 a 7 mm de largo, con un diámetro entre 10 a 15 mm, la inflorescencia presenta de 20 a 50 flores, con pedicelos de 5 a 10 mm de largo, sus sépalos son ovado-trianguulares, de 3-6 x 2-3 mm y cuyos frutos son ovoides-globosos, de 8 a 15 mm, tomando una coloración rosa a profundamente morado.

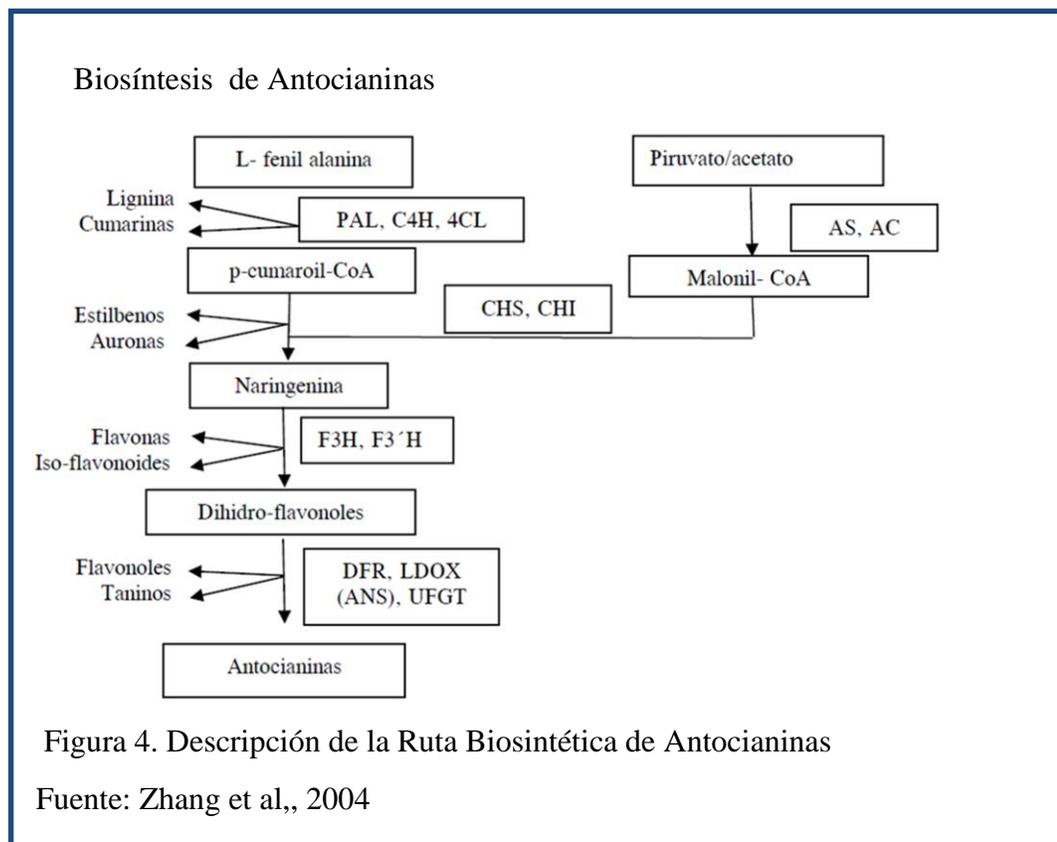
Landázuri (2010), en su estudio sobre *Rubus niveus* menciona que esta especie posee ciertas características biológicas muy importantes para su dispersión, durante dos meses se pudo establecer, que el periodo de aparición de la flor dura 1 semana y el desarrollo del botón floral hasta llegar a fruto necesita alrededor de 63 días, en dicho estudio se comprobó que el 76% de las ramas producen frutos, los arbustos pueden producir continuamente semillas durante todo el año, dependiendo de las lluvias y la temperatura, las semillas pueden permanecer cierto tiempo en el suelo en estado de latencia y cerca del 23% de semillas enterradas son capaces de germinar después de un año.

#### 2.5. Antocianinas

Las antocianinas son metabolitos secundarios que pertenecen al complejo grupo de compuestos fenólicos solubles en agua y son los responsables de otorgar los colores rojo, azul y violeta a frutos, flores y hojas de las plantas, según Ugaz (1997), el término antocianina se aplica para el glicósido y el término de antocianidina para la aglicona.

Aguilera, Reza, Chew & Meza (2011), revelan que se han descrito doce diferentes antocianidinas, sin embargo las más comunes en plantas son: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina y malvidina, de las cuales las tres primeras son más frecuentes en frutos, mientras tanto el resto están presentes en flores.

Zhang, Franco, Curtin & Conn (2004), mencionan que se generan a partir de los precursores fenilalanina y acetato, en la Figura 4 se puede observar la vía de biosíntesis de antocianinas, las mismas que son sintetizadas en el citoplasma y transportadas en la vacuola donde se unen con una proteína matriz y forman las inclusiones vacuolares de antocianinas (AVI's), las cuales son consideradas los sitios de almacenamiento de las antocianinas, en la actualidad se están convirtiendo en una importante alternativa a muchos colorantes sintéticos.



Este tipo de compuestos son importantes por su capacidad antioxidante, se ha reportado que las antocianinas inhiben el crecimiento de las células cancerígenas y ayudan a prevenir el cáncer del colón, en la prevención de enfermedades del corazón al inhibir la síntesis del colesterol, mejorando la circulación, pueden ser usados en el diseño de alimentos nutraceuticos, por su capacidad de neutralizar radicales libres, responsables de muchas enfermedades degenerativas, cataratas, arterioesclerosis, muerte celular y cáncer, apoyando así en una calidad de vida y un envejecimiento saludables (Martínez, 2011, p.69).

Muchas frutas son ricas en antocianinas, como por ejemplo frutos pertenecientes a la familia de las Rosaceas, Vitaceae, Solanaceae, Ericaceae y Passifloraceae, la delphinidina solo se encontró en el mortiño y la pelargonidina en la fresa. La ingesta de antocianinas en la actualidad se ha incrementado de manera significativa debido a la presencia de extractos y jugos de frutas disponibles comercialmente hoy en día, y los beneficios a la salud de las antocianinas han llegado a ser evidentes (Aguilera et al., 2011, p.18).

En la actualidad en la industria alimentaria y cosmetológica, se utilizan una gran cantidad de compuestos obtenidos por vía sintética que ocasionan graves daños a la salud, la tendencia actual es sustituir este tipo de compuestos de amplio uso, por pigmentos de origen natural (Guerra, 2006, p.42), como por ejemplo extractos de distintas frutas como mora, frambuesa y diferentes cultivos de grosella, las cuales pueden impartir coloraciones rojas brillantes, brindando un aspecto más atractivo para la comercialización de algunos productos y sobre todo natural.

Las antocianinas no son estables en soluciones neutras y alcalinas, generando cambios durante el procesamiento del material crudo y el almacenaje, además presentan serios inconvenientes relacionados a su estabilidad, son afectadas por la luz, cambios en pH, temperatura, oxidación, presencia de otros flavonoles y metales, el conocimiento de estos factores es vital para una eficiente extracción y purificación (Ugaz, 1997, p.59).

## 2.6. Detección de Antocianinas

### 2.6.1. Maceración

En este método se procede a poner en contacto la muestra macerada con una solución de HCl al 1% en metanol, luego siendo conservada en refrigeración por 12 horas a una temperatura menor a 30°C y luego se realiza la cromatografía sobre papel Whatman N°3, obteniendo bandas de antocianinas las cuales se eluyen con metanol, ácido acético y agua en relación 1:1:1 (MAW) (Leyva, 2009, p.15).

### 2.6.2. Determinación de las antocianinas por cromatografía líquida de alta resolución

Para Del Carpio, Serrano & Giusti (2009), el objetivo de este método es obtener los aglicones, por separación de los azúcares, con el único propósito de identificar las antocianidinas presentes en el pigmento, por lo cual menciona que en un tubo de ensayo, se procede a disolver 1ml de extracto acuoso acidificado con 10ml de HCl 4N.

El contenido se pone en contacto con gas nitrógeno y se procede a tapar herméticamente, el pigmento fue hidrolizado durante 45 minutos a 100°C, luego se enfrió en un baño de hielo, posteriormente la muestra es semi-purificada con la ayuda de un cartucho C-18 y la fracción fenólica (conteniendo antocianinas) fue eluida con metanol acidificado con HCl 1%; se evaporó el metanol en un rotavapor, se utilizó agua acidificada con HCl 0,01% para lograr un volumen conocido y se filtró usando un filtro de polipropileno Whatman de 0,45 mm antes de la inyección en el equipo HPLC.

La separación de las antocianinas se lleva a cabo en una columna C-18, para constatar se procedió a una detección simultánea de las longitudes de onda: 520 nm para antocianinas, 280 nm para compuestos fenólicos y a 320 nm para ácidos cinámicos. La identificación de los picos de las antocianinas fue realizada en base a la comparación de los cromatogramas y tiempos de retención de los extractos concentrados de antocianinas, corridos bajo las mismas condiciones.

### 2.6.3. Determinación de antocianinas por HPLC - MS/MS (Espectro de masas tándem)

La espectrometría de masas se basa en la medida directa de la relación de la masa con el número de cargas elementales positiva o negativa de los iones en la fase gaseosa obtenida de la sustancia a analizar. La espectrometría de masas tándem (MS-MS), tiene la ventaja de lograr dos separaciones de los componentes de la muestra, siendo ambas separaciones iónicas; debido a esta especificidad, esta técnica es usada para lograr análisis cuantitativos de analitos en mezclas simples en cuestión de minutos sin necesidad de una separación cromatográfica u otro tratamiento químico que elimine interferentes (Del Carpio et al., 2009, p.81).

### 2.6.4. Métodos moleculares

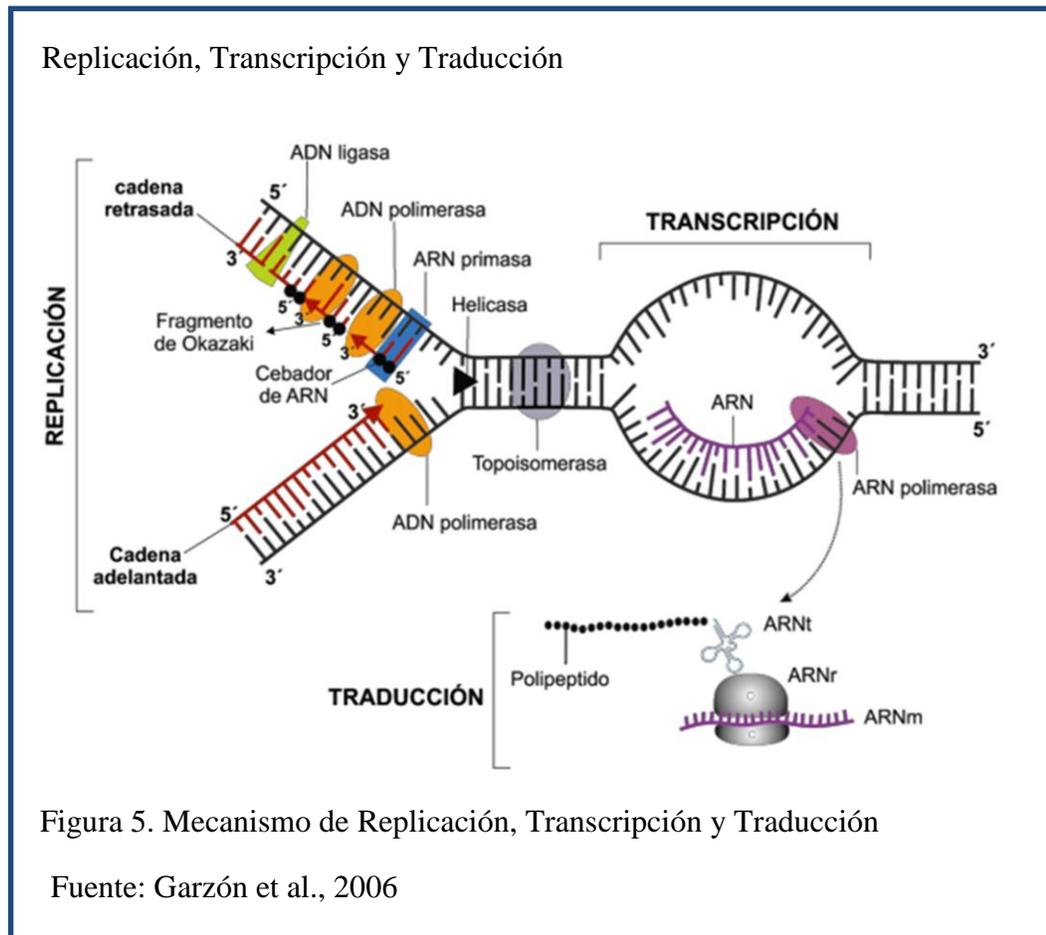
Son técnicas que permiten aislar DNA de alta pureza, para visualizar su estado, cortarlo y pegarlo, base fundamental de la Ingeniería genética, amplificar una región utilizando DNA polimerasa, cebadores y oligonucleótidos que hibridan la cadena complementaria a la secuencia que se va a amplificar, corte de una determinada región con enzimas de restricción para ver que sucede con la mutación, esto mediante RFLP o Restriction fragment length polymorphism, por su siglas en inglés (Wilhelm, 2003, p.1124).

Todas estas técnicas tienen diversas aplicaciones generalmente en el diagnóstico de enfermedades hereditarias, búsqueda de alelos mas o menos frecuentes asociados a una característica que nos interesa, diagnóstico de contaminación en alimentos, selección de marcadores moleculares para asistir en el mejoramiento genético de una especie, test de paternidad, diagnóstico de identidad forense, etc.

## 2.7. Expresión Génica

Se utiliza este término para la transcripción de la información almacenada en un gen para crear una molécula de ARN, en la Figura 5 se pueden observar los esquemas de los

procesos involucrados en la expresión génica “Las células son extremadamente eficaces para controlar la expresión génica y la traducción para satisfacer sus necesidades. No todos los genes son transcritos y traducidos con la misma tasa en todas las células” (Thieman, 2010, p.47).



Hernández (1995), menciona que el término expresión génica abarca desde la activación del gen hasta que la proteína madura llega al lugar adecuado y realiza su función, de tal manera dicha proteína pasa a contribuir en la expresión del fenotipo celular, el grado de expresión de un gen puede ser estudiado con gran aproximación mediante detección o cuantificación de los mARN's funcionales del citoplasma y los métodos de estudio utilizados como el Northern blot, RT-PCR e hibridación *in situ* se basan en su capacidad para detecta mr ARN's específicos y no productos proteicos.

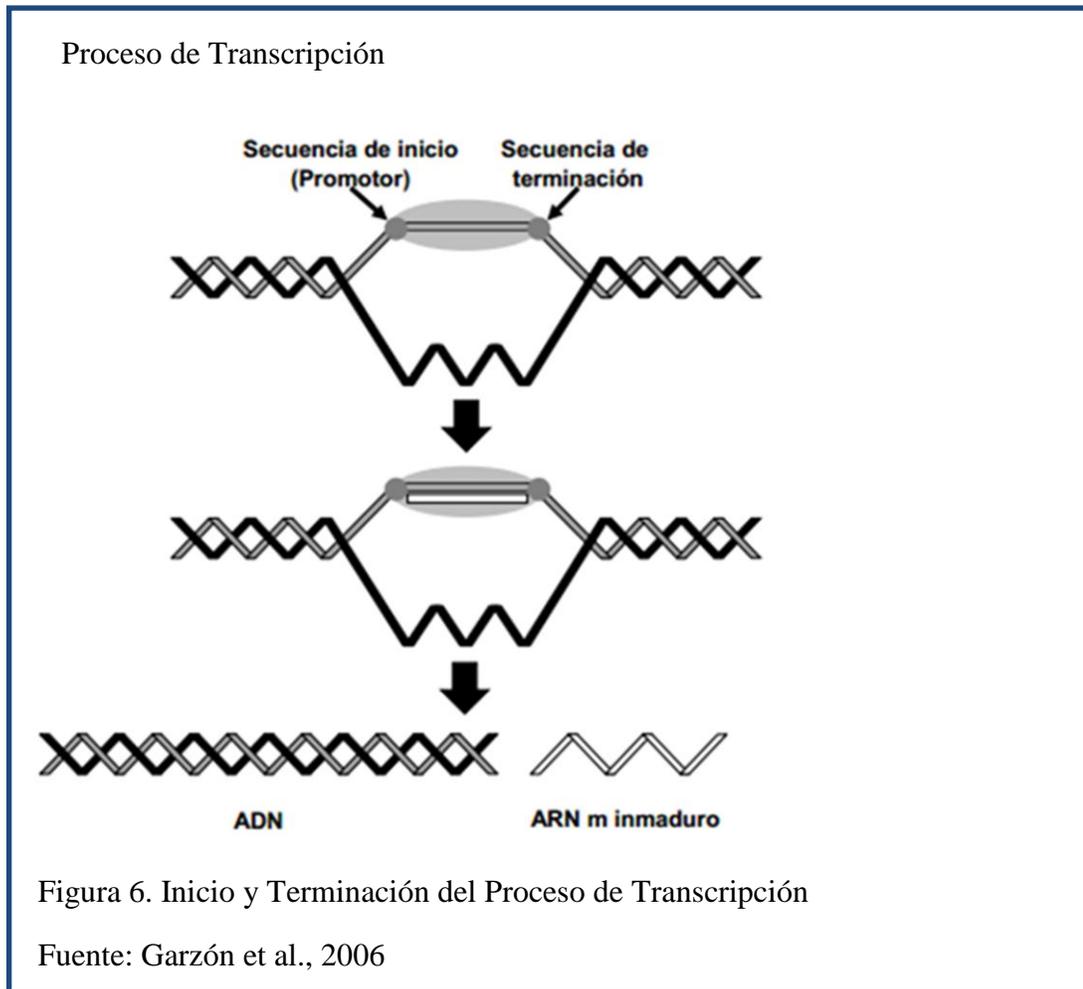
La actividad de un gen comienza con la transcripción, proceso que consiste en la síntesis de una molécula de ARN mediante el copiado de una porción de una de las hebras de DNA que se extiende desde una secuencia promotor hasta el terminador; esta reacción es catalizada por una ARN polimerasa (Hernández, 1995, p.73). Hay varios condicionantes a tener en cuenta: el tipo de célula, una determinada enfermedad, una respuesta dinámica a estímulos externos, etc (Rodríguez, 2006, p.2).

Los principales genes involucrados en la biosíntesis de antocianinas son  $\beta$ -Actin, RuANS y el gen RuMYB10, los cuales han sido estudiados con anterioridad en investigaciones con distintas especies de *Rubus*, en una de ellas se menciona que los niveles de transcripción de dichos genes controlan mayoritariamente la expresión de antocianinas para ello se realizan estudios de los patrones de expresión de los genes mediante PCR (Chen et al., 2012, p.64).

Para obtener éxito en la extracción de ARN, es necesario tener en cuenta la eliminación de toda posible contaminación con ribonucleasas (ARNasas), puesto que dichas nucleasas degradan el ARN durante y después de la extracción, provocando bajos rendimientos.

## 2.8. Transcripción

En la Figura 6 se observa el proceso de transcripción desde su inicio hasta terminación donde se genera el ARNm inmaduro, las moléculas de ARNm son copias (transcriptos) de secuencias de DNA, pero a diferencia de las moléculas de DNA, las moléculas de ARN son de cadena única (monocatenaria), en dicho proceso solo se transcribe una de las dos cadenas del DNA según el gen en cuestión, nunca las dos (Garzón et al., 2006, p.62).



Los ribonucleótidos presentes en la célula son añadidos por una enzima ARN polimerasa, que se desplaza por la cadena patrón de DNA y va insertando nucleótidos de ARN siguiendo la complementariedad de bases. Es importante señalar que el ARNm, tiene una secuencia complementaria a la cadena molde de DNA, salvo el remplazo de timina (T) por uracilo (U) y a diferencia de la DNA polimerasa, la ARN polimerasa no necesita un cebador para comenzar la síntesis (Hernández, 1995, p.76).

Las moléculas de ARN transcriptas (ARNr, ARNt y ARNm) desempeñan luego sus distintos papeles en la traducción a proteína, a diferencia de las procariotas que poseen una sola ARN polimerasa para catalizar la biosíntesis de los tres tipos de ARN, las eucariotas tienen tres polimerasas diferentes: una transcribe los genes que se traducirán a

proteínas, una segunda transcribe los genes de los ARN ribosómicos grandes, y una tercera transcribe para una variedad de ARN pequeños (Garzón et al., 2006, p.53).

En una primera etapa, la enzima ARN polimerasa se asocia a secuencias específicas de nucleótidos del DNA, que se conoce como promotoras, la cual define el punto exacto de inicio junto con otros factores de transcripción, y la dirección hacia la cual avanzará la ARN polimerasa. Una vez unida la ARN polimerasa, abre y desenrolla la doble hélice del DNA, esta va añadiendo ribonucleótidos, moviéndose a lo largo de la hebra de DNA que se utiliza como patrón, hasta que se encuentra con otras secuencias específicas del DNA las secuencias llamadas terminadoras que señalan la detención de la síntesis de ARN, generando una replicación semi-conservativa, transmitiendo las instrucciones de la célula madre a la célula hija y de generación en generación (Paz y Miño, 1998, p.49).

## 2.9. Traducción

La síntesis de proteínas requiere además del ARNm, del ARNr y ARNt, este proceso se da en los ribosomas los cuales consisten de dos subunidades formadas aproximadamente por 2/3 de ARN y 1/3 de proteínas y son diferentes en procariotas y eucariotas.

La subunidad pequeña del ARNr, contiene un sitio de unión para el ARNm, cuando este se encuentra en el citoplasma, es reconocido mediante secuencias específicas (en bacterias) y por la caperuza (en eucariotas), presentes en el extremo 5' de la molécula de ARNm. La subunidad más grande tiene dos tipos de unión para el ARNt, el cual funciona como adaptador entre ARNm y los aminoácidos (Figura 7); es decir, es el diccionario por medio del cual se traduce el lenguaje de los ácidos nucleicos al lenguaje de las proteínas. (Thieman, 2010, p.47)

## Proceso de Traducción

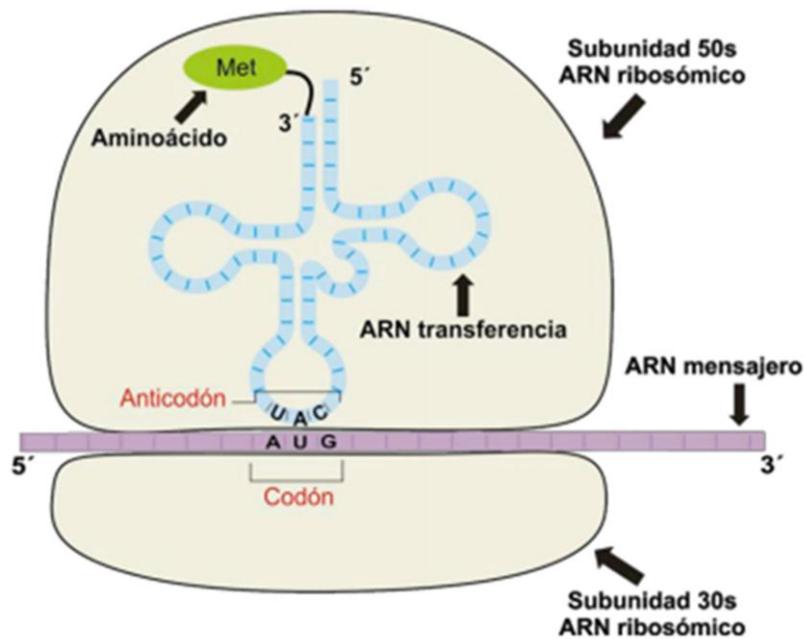


Figura 7. Acoplamiento entre el ARNm y el ARNt, mediado por los Ribosomas

Fuente: Garzón et al., 2006

Los ARNt, tienen dos sitios de unión importantes, uno de ellos se conoce como anticodón, que se acopla al codón. El otro sitio, en el extremo 3' del ARNt, se acopla a un aminoácido el cual siempre termina en una secuencia que posee el triplete CCA (Garzón et al, 2006, p.53).

### 2.10. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real

La reacción en cadena de la polimerasa denominada PCR por sus siglas en inglés, es una herramienta molecular que ha revolucionado la biología molecular, sus insuperables características de sensibilidad, especificidad, eficiencia, velocidad y relativa sencillez permiten realizar ensayos como expresión génica, elaboración de genotipos, detección de patógenos y validación de fármacos.

La PCR es un ensayo cualitativo es decir permite generar respuestas negativas o afirmativas a una pregunta, mientras que la RT-qPCR nos permite realizar mediciones cualitativas y cuantitativas de genes específicos en una muestra dada (Sethi, 2011, p.63).

La cuantificación de la PCR en tiempo real, en la Figura 8 se observa el mecanismo de amplificación de cDNA a partir del ADN molde que se realiza en el termociclador, de esta manera se disminuye el riesgo de posterior contaminación en el laboratorio y permite aumentar el rendimiento, este sistema incluye dos componentes: elementos ópticos integrados al termociclador y marcadores fluorescentes que proporcionan información acerca de amplificación a lo largo de los ciclos de la PCR (Vinueza, 2009, p.7).

Entre los marcadores más utilizados están los colorantes SYBR<sup>®</sup> Green y SYBR<sup>®</sup> Gold, estos marcadores son populares para el uso en la PCR en tiempo real porque son distribuidos por los proveedores de reactivos como cócteles listos para usar, por lo que no se necesita un diseño experimental adicional (Edwards, Logan & Saunders 2004, p.203).

La cuantificación de mRNA ha sido problemática, donde pequeñas diferencias en la amplificación pueden alterar de manera significativa el rendimiento del amplicón, por lo que en los últimos años se introdujo una nueva tecnología que permite la cuantificación precisa de los amplicones, en la cual se emplean marcadores fluorescentes, que en base a su fluorescencia emitida en cada ciclo refleja la cantidad de producto amplificado, como el SYBR Green I, que mediante la unión a ácidos nucleicos de doble cadena permite valorar la cantidad de DNA presente, la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR), disminuye considerablemente el tiempo de los experimentos (Bonilla, 2002, p.5).

## Amplificación de cDNA por PCR

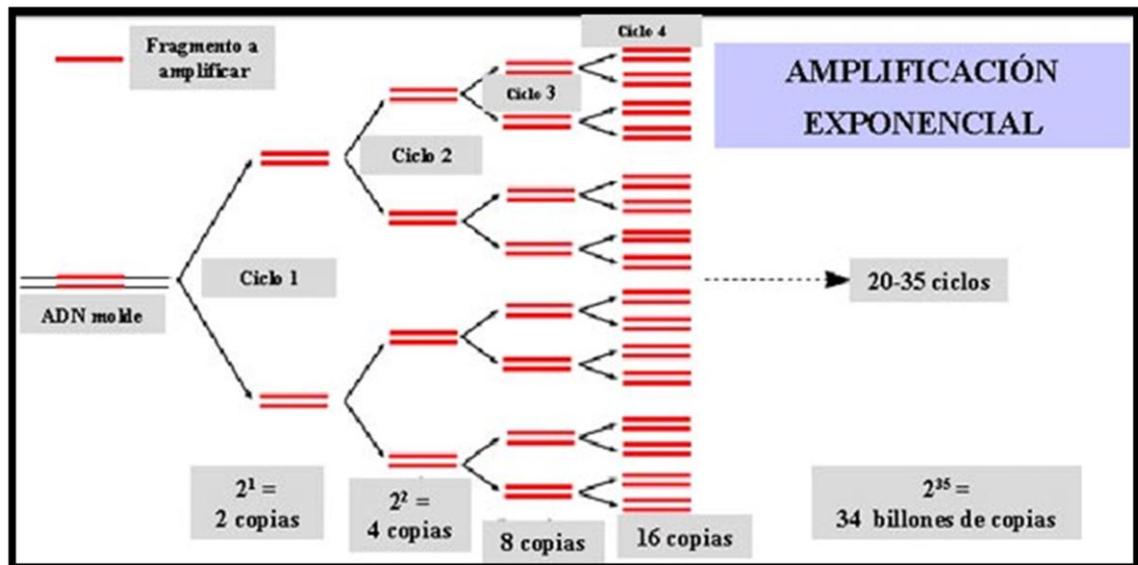


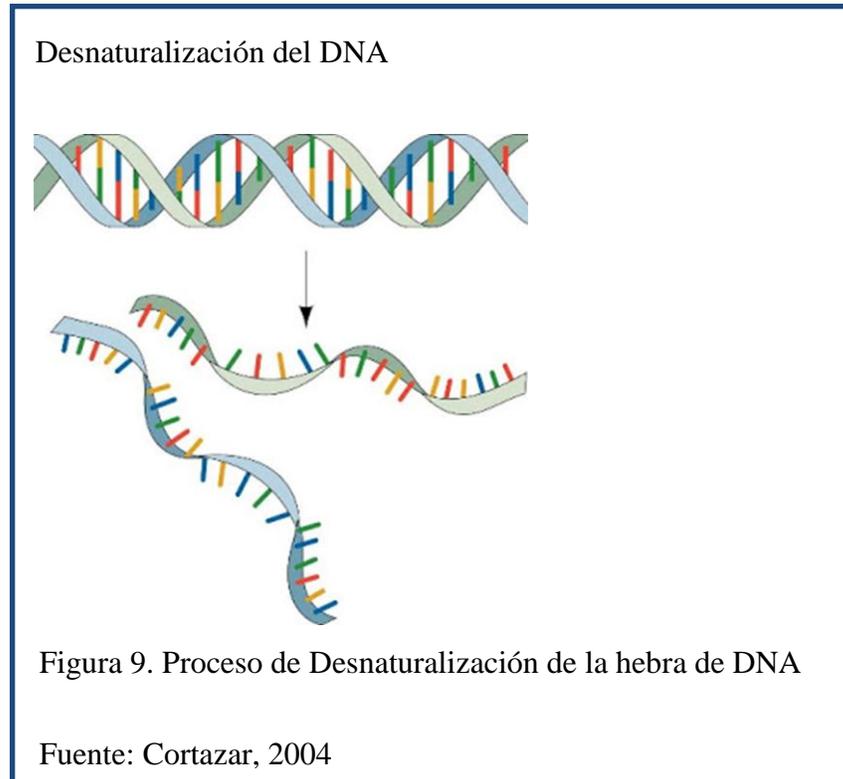
Figura 8. Mecanismo Básico de Amplificación de cDNA por PCR

Fuente: Hernández, 1995

Debido a su sensibilidad, rapidez y exactitud, el método de RT-PCR puede ser usado para estudiar la expresión génica de un modo más extensivo que las técnicas convencionales, permitiendo medidas cuantitativas en pequeñas muestras de tejidos, que puede ser valiosa en el diagnóstico y análisis de enfermedades infecciosas, genéticas, metabólicas, neoplásicas, inmunes, etc. (Hernández, 1995, p. 82).

## 2.11. Etapas de PCR

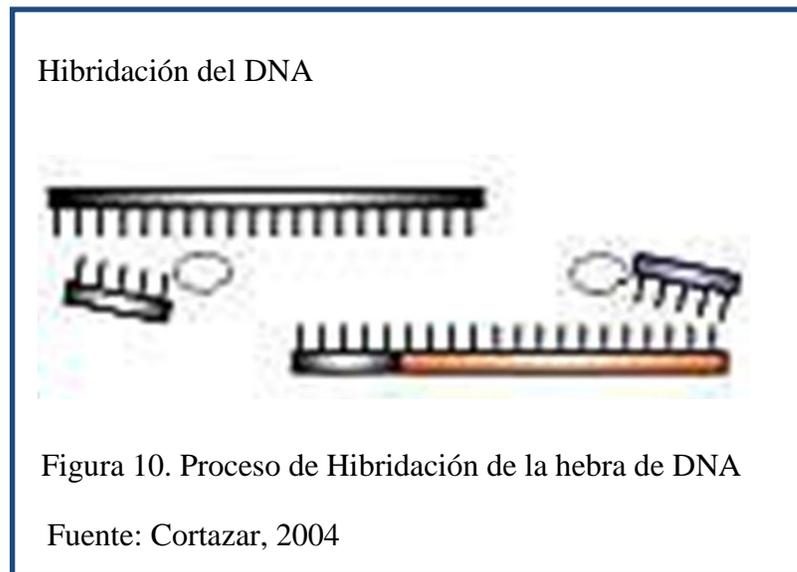
### 2.11.1. Desnaturalización o Melting



Esta fase consta en la separación de las dos cadenas por ruptura de los enlaces de hidrógeno, como se observa en la Figura 9, esto se consigue gracias al incremento de temperatura que oscila entre los 90 a 95°C, generando la separación de ambas cadenas, sin embargo temperaturas más altas pueden ser apropiadas especialmente para templados ricos en G + C. Para asegurar la completa separación de la doble cadena del DNA esta temperatura debe mantenerse unos minutos, si el DNA solo se desnaturaliza parcialmente éste tenderá a renaturalizarse muy rápidamente dificultando con esto el proceso de hibridación (Cortazar, 2004).

### 2.11.2. Hibridación o Annealing

Según Cortazar (2004), una vez que el DNA está desnaturizado es necesario disminuir la temperatura para que se pueda realizar la hibridación de los primers. La temperatura y el tiempo requerido para esta fase dependen de la composición, tamaño y concentración de los primers amplificadores (Figura 10). La temperatura de hibridación óptima es 5°C por debajo de la  $T_m$  de los primers, esta recomendación se la realiza ya que las DNA polimerasas son activas en un amplio rango de temperaturas, generalmente van en un rango de 55 a 65°C generando buenos resultados.

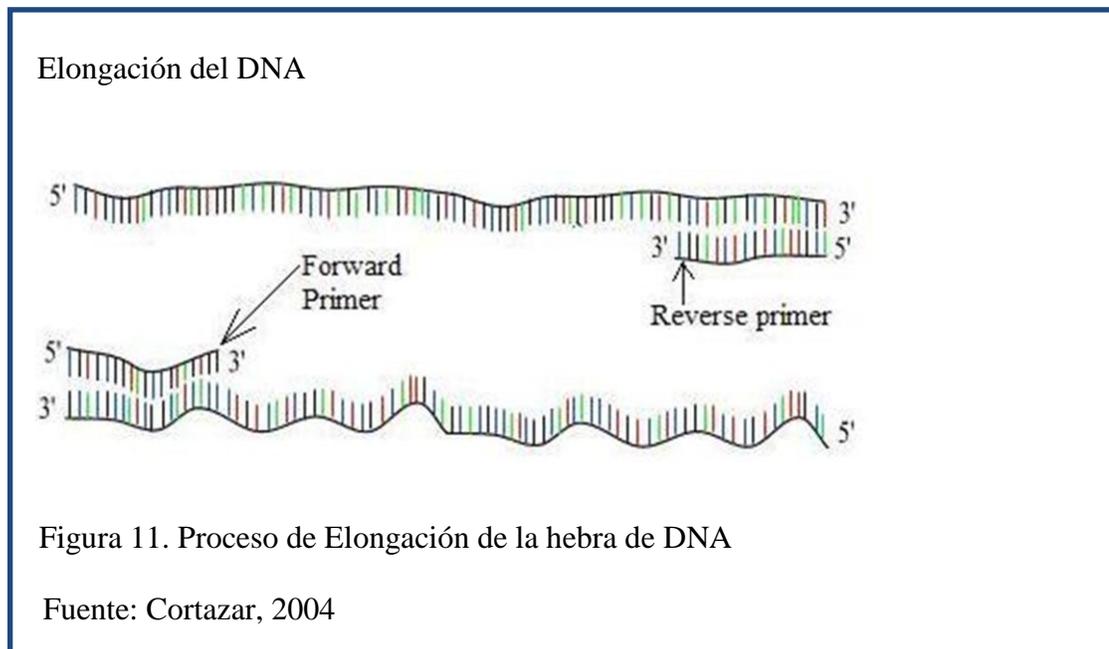


### 2.11.3. Elongación o Polimerización

Durante esta etapa la DNA polimerasa termo-resistente incorpora nucleótidos en el extremo 3' del cebador utilizado como molde la cadena de DNA previamente desnaturizada (Figura 11). La temperatura a la que se realiza esta etapa de la reacción suele ser de 72°C ya que es la temperatura a la que la "*Taq polimerasa*" alcanza su máxima actividad (Bonilla, 2002, p.6).

El tiempo de extensión depende de la longitud y concentración de la secuencia blanco, tiempos mayores de extensión pueden ser útiles cuando la concentración del sustrato es muy pequeña o cuando la concentración del producto excede la concentración de la enzima (Bonilla, 2002, p.7).

Para Cortazar (2004), una extensión de 20 segundos es suficiente para fragmentos menores de 500 pares de bases, y 40 segundos para fragmentos por encima de 1,2Kb. Al finalizar cada uno de los ciclos el número de copias obtenidas se duplica y después de 20 ciclos ya tenemos aproximadamente 1 millón de copias de cada una de las moléculas molde iniciales DNA.



## 2.12. Selección de Primers

Uno de los aspectos más importantes del éxito de la técnica RT-PCR es la fabricación de los primers adecuados. Para ello existen criterios generales válidos para cualquier

reacción de PCR y unos criterios aplicables específicamente a la técnica de PCR para estudio de ARN (Hernández, 1995, P.83).

Para Huggett, Dheda, Bustin & Zumla (2005), existen varios genes utilizados como referencia, los más utilizados son:  $\beta$ -actin, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, hipoxantina guanina phosphoribosil-transferasa y 18S del ARN ribosomal, la elección correcta de los genes de referencia es de vital importancia, puesto que estos nos permiten la normalización de PCR en tiempo real y de esta manera reflejar datos fiables sobre los procesos biológicos de las proteínas objeto de estudio.

Entre los criterios generales es necesario que estos cumplan complementariedad entre sí, especialmente en los extremos 3', ya que este se irá consumiendo durante la reacción por la formación de dímeros de primer, el tamaño es importante debido a que deben ser suficientemente grandes para favorecer la unión con alta especificidad a la región de interés y por último tenemos el porcentaje de (G+C) que debe rondar el 50% en ambos primers, dándonos así una temperatura media de hibridación de 60-65°C (Hernández, 1995, p.83).

Para obtener resultados confiables y reproducibles, hay que tener en cuenta las mezclas maestras de reactivos, la concentración de los primers, concentración de los marcadores fluorescentes y la concentración de la muestra, llevadas a cabo con controles positivos o calibradores (Edwards et al., 2004, p.206).

## CAPÍTULO 3

### MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1. Selección, obtención, y preparación de las muestras

Para la selección de las muestras de frutos maduros de *Rubus niveus*, se tomaron en cuenta 3 zonas comunes representativas del Valle de los Chillos, Cantón Rumiñahui – Provincia de Pichincha, con características geográficas y climáticas importantes, dichas zonas presentan temperaturas que oscilan desde los 16 a 23°C durante el día y 8°C en la noche, siendo Julio y Agosto los meses más calurosos, presenta precipitación media anual de 1000mm, esto hace que la zona sea muy fértil, en donde se encuentran gran cantidad de cultivos silvestres de esta especie, y estas son San Rafael, Capelo y San Pedro de Taboada. *Rubus niveus* presenta características que muestran claramente una alta presencia de los componentes de interés para el estudio, los cuales son las antocianinas.

Se realizaron dos salidas de campo durante los meses de Septiembre y Octubre del 2014, se recorrieron los distintos sectores seleccionados del Valle de los Chillos, recolectando asépticamente 1kg de frutos por cada sector, posteriormente lavados y conservados en fundas ziploc seguido por el transporte al laboratorio de Biología Molecular de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana.

Para la preparación de las muestras, los frutos maduros de *Rubus niveus* que se utilizaron para la extracción de ARN (Anexo 1), se colocaron en criotubos de 50ml (Anexo 2), los cuales se los conservó en un tanque de Nitrógeno Líquido a -197 °C.

#### 3.2. Extracción de ARN

Para todo trabajo con material biológico, es necesario realizar una desinfección con rayos UV, durante 15min en la cámara de flujo laminar (Anexo 3), evitando así tener contaminación cruzada.

Para obtener las muestras de los ácidos nucleicos que fueron analizadas en el equipo de RT- qPCR, se utilizó el PureLink<sup>®</sup> ARN Mini Kit (Ambion, Life) (Anexo 4).

Se inicia con una maceración de 250mg de la muestra de los frutos en morteros con hielo seco o nitrógeno líquido, hasta obtener una masa homogénea, posteriormente pasar 0,5mg del macerado a un tubo eppendorf de 1,5ml.

En un tubo falcon se prepara la solución del Buffer de Lysis que debe contener 1% de 2-mercaptoetanol por cada procedimiento de purificación, para el cual se adiciona 10µl de 2-mercaptoetanol por cada 1ml de Buffer de Lysis; se adiciona 1ml de Buffer de Lysis en el tubo eppendorf que contiene la muestra macerada y se lleva la preparación al vórtex durante un minuto para realizar una homogenización, es necesario llevar a la microcentrifuga por 2min a 12000 x g para obtener una sedimentación de la muestra, pasar 1ml del sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo y colocar 500µl de etanol al 70%, llevar el tubo al vórtex hasta obtener una homogenización (Anexo 5).

Pasar 700µl a un tubo de columna y llevar a la centrifuga por 15s a 12000 x g, descartar el líquido y repetir este procedimiento por duplicado (Anexo 6).

A continuación se adicionan 700µl de Wash Buffer I y centrifugar por 15s a 12000 x g, se descarta el líquido, se adiciona 700µl de Wash Buffer II y se centrifuga nuevamente por 15s a 12000 x g, este procedimiento se realiza por duplicado y se descarta el líquido.

La columna se coloca en un tubo de recuperación y se adicionan 50µl de agua libre de ARNasas y se lleva a la centrifuga por 2min a 12000 x g obteniendo de este modo 50µl de ARN y se adiciona 1µl del protector inhibidor de ARNasas (Roche) para evitar degradación (Anexo 7).

Conservar la muestra a -20°C hasta realizar la transcripción, que debería ser realizada el mismo día, de no ser el caso se puede congelar la muestra a -80°C.

### 3.3. Transcripción Inversa

Para obtener las muestras de cDNA que fueron analizadas en el equipo de RT- qPCR, se utiliza el Kit de transcripción inversa: Transcriptor First Strand cDNA synthesis Kit (Roche) (Anexo 8).

Se inicia colocando 9µl de ARN extraído en un microtubo de 200µl, a esto se adiciona 1µl del vial 5 (Anchored-oligo (dT)<sub>18</sub> Primer), posteriormente colocar 2µl del vial 6 (Random Hexamer Primer) y finalmente 1µl del vial 7 (H<sub>2</sub>O grado PCR), obteniendo 13µl.

Llevar el tubo con la mezcla al termociclador convencional, para realizar la desnaturalización de ARN.

Al mismo tiempo se prepara la Master Mix de Transcripción Inversa de la siguiente manera: En un tubo eppendorf de 200µl colocar 4µl del vial 2 (Transcriptor RT Reaction Buffer(5x)), adicionar 0,5µl del vial 3 (Protector ARNase Inhibitor), 2µl vial 4 (Deoxynucleotide Mix) y finalmente 0,5µl del vial 1 (Transcriptor reverse Transcriptase), obteniendo 7µl de Master Mix. Estas cantidades son para una reacción de 20µl.

Posteriormente se colocan los 7µl de la Master Mix en el microtubo proveniente del termociclador obteniendo 20µl, llevar la mezcla nuevamente al termociclador convencional para realizar la transcripción inversa. Se obtiene el cDNA, se lo guarda a -20° C para luego ser cuantificado y analizado por el RT-qPCR.

### 3.4. Elaboración de la Curva Estándar

Para la elaboración de la curva estándar se utilizó *Rubus glaucus*, con el gen β-Actin, Wang, Bolitho, Grafton, Kortstee, Karunairetnam, Mc Ghie, Espley & Hellens (2010), mencionan que β-Actin es seleccionado como un gen de referencia debido a su constante nivel de transcripción a lo largo de frutas y hojas.

Paralelamente a esta tesis, se trabajó en un Proyecto de Investigación con varias especies de *Rubus*, el cual reportó que *Rubus glaucus* contenía grandes concentraciones de cDNA, por lo que esta especie fue elegida como control positivo y de esta se generó la curva estándar en el RT-qPCR.

Para la obtención de los valores referenciales se prepararon soluciones seriadas en escala logarítmica del cDNA obtenido anteriormente, las muestras fueron cuantificadas en el Qubit<sup>®</sup> 2.0 Fluorometer, para medir la fluorescencia se utiliza Qubit<sup>®</sup> dsDNA HS Assay Kit (Life) (Anexo 9) que se prepara de la siguiente manera:

Se preparó la solución “working solution” en un tubo eppendorf de 1.5ml colocando 199µl del Qubit<sup>®</sup> dsDNA HS Buffer con 1µl del Reactivo fluorescente, para los standards, se utilizarán 190µl de la “working solution” en un tubo eppendorf Qubit<sup>®</sup> con 10µl de Qubit<sup>®</sup> ARN Standard # 1 como punto de inicio de la curva, en otro tubo eppendorf se colocan 190µl de la working con 10µl de Qubit<sup>®</sup> ARN Standard # 2 para el punto final.

Seguidamente se prepararon las muestras para lo cual tomó 190µl de la “working solution” con 10µl de la muestra de cDNA, estas cantidades son para análisis de una sola muestra, se realiza la lectura con el programa dsDNA High Sensitivity, aplicando la fórmula para la cantidad de muestra utilizada en la cuantificación, obteniendo así concentraciones específicas que serán incorporadas al equipo, para cuantificar la cantidad de expresión de los genes de interés.

Se ingresan los datos en el software del equipo Light Cycler 2.0 (Roche) en un “Nuevo Experimento”. La configuración se realiza en base al tipo de organismo o secuencia de estudio, con valores de longitud de onda, número de ciclos, número de muestras y temperaturas por tiempo.

Una vez realizada la configuración se selecciona la pestaña de “Analysis Type” y se escoge el ítem de “Absolute Quantification”, aquí se ingresan los datos obtenidos de las concentraciones cuantificadas mediante el uso del Qubit<sup>®</sup> dsDNA HS Assay Kit, las cuales son los estándares para las posteriores cuantificaciones de las muestras de interés.

Se inicia la corrida de amplificación por el RT-qPCR, dando como resultado final la curva estándar de concentración del material genético de las especies de estudio en ng/ml.

Se deben considerar los valores de error y eficiencia de la curva, los cuales deben estar entre 0,0 y 0,05; 1,8 y 2,2 respectivamente.

La curva estándar guardada como “External”, fue posteriormente utilizada en corridas de la RT-qPCR para cuantificación de muestras con concentración desconocida.

### 3.5. Selección de Primers

Los Primers a utilizar fueron seleccionados a partir de referencias bibliográficas, se deben obtener las secuencias específicas de los genes que expresan antocianinas en mora a partir de referentes del gen de expresión o pathway de genes involucrados en la expresión. Dichas referencias son relacionadas con estudios de expresión génica, con especies de las mismas características, considerando las variaciones que puedan existir entre especies y géneros con la especie de estudio.

Posterior a la identificación del o los genes de interés para la investigación, se busca la información sobre la secuencia de dichos genes. La búsqueda se realizó en la base de datos del GenBank, la cual es de acceso libre en internet, siguiendo los siguientes pasos:

En GenBank, se selecciona la opción Gene, luego en la pestaña de búsqueda SEARCH que se encuentra en la parte superior de la pantalla se debe colocar el nombre del gen que se desee buscar, para la investigación son los genes:  $\beta$ -Actin, RuANS, RuMYB10; a partir de esta búsqueda se tienen las secuencias de los genes de interés, dichas secuencias se las debe exportar a otro programa llamado Primer Quest, el cual nos indica todos los posibles pares de primers para cada uno de los genes, de estos se analiza características de tamaño, temperatura de melting, porcentaje de Guanina-Citosina (cercano a 50%).

Finalmente con ayuda del programa llamado Blast, se procede a comparar los primers con todas las especies que tengan afinidad, la especificidad con *Rubus niveus* y complementariedad entre primers forward y reverse.

Tabla 2

<b>β-Actin</b>	
<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
5' TGACAATGGGACTGGAATGGT	5' GCCCTGGGAGCATCATCA
<b>RuANS</b>	
<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
5' GGCCTCGGGAAAAATTCAAG	5' GCCCGGAAGCATTGTTTG
<b>RuMYB10</b>	
<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
5' CCATCAGCATCACACCTA	5' CACCTGTTCCCTGTCAATGAG

Nota: Autores, 2015

Fuente: (Chen, Yu, Tang, & Wang, 2012)

### 3.6. Cuantificación mediante amplificación de RT-qPCR

Previamente a la corrida de la RT-qPCR se requiere realizar un “Self Test” del equipo antes de cada corrida, esto se hace para que el equipo trabaje en perfectas condiciones (Anexo 10).

Se prepara la Master Mix Light Cyclor Fast Start DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I (Roche) previamente preparado con 14µl del tubo 1a (Polymerase Enzyme) en el tubo 1b (Reaction Mix) (Anexo 11).

Posteriormente, se preparan los primers de los genes  $\beta$ -Actin, RuANS y RuMYB10 con 9,4  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O (PCR grade) con 0,8  $\mu$ l del primer Forward, 0,8  $\mu$ l del primer Reverse más 4  $\mu$ l de la Master Mix, considerando que se requiere un control negativo y un positivo por cada uno de los genes, se deben preparar los primers para 3 capilares, de este modo procedemos a preparar las muestras en cada capilar con 15  $\mu$ l del primer más 5 $\mu$ l de la muestra de cDNA de la especie de estudio, en el caso de los controles negativos 5 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O (PCR grade) y en el caso del control positivo 5 $\mu$ l del control, se deben centrifugar los capilares cuidadosamente a 12000 x g por 15s para asegurar que la muestra esté en el fondo del mismo y se realice una correcta lectura (Anexo 12).

A continuación se procede a colocar los capilares en el carrusel del Light Cycler (Anexo 13) y se realiza la siguiente programación del RT-qPCR:

Para la desnaturalización inicial se programa la temperatura target a 95°C y es de 1 ciclo

Se procede al ciclado el cual posee 65 ciclos con tres diferentes temperaturas target que son 95, 60 y 72°C.

Seguidamente se pasa al programa denominado Melting que contiene 1 ciclo, con temperaturas target de 95, 65 y 95°C.

Finalmente está el enfriamiento, este consta de 1 ciclo y una temperatura target de 40°C, obteniendo de esta manera los resultados gráficos (Anexo 14).

### 3.7. Análisis Estadístico

Para contrastar la normalidad de un conjunto de los datos se empleó el Test de Shapiro–Wilks, el cual se calcula de la siguiente manera (Figura 12):

Test de Shapiro–Wilks

$$W = \frac{\sum_{i=1}^n a_i (Y_{n-i+1} - Y_i)}{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}$$

Figura 12. Determinación del Test de Shapiro–Wilks

Fuente: Delgado, 2004

Los datos obtenidos de la cuantificación de expresión de los genes  $\beta$ -Actin, RuANS y RuMYB10, involucrados en la biosíntesis de antocianinas mediante la técnica RT-qPCR, se analizaron estadísticamente de acuerdo a un Análisis de Varianza (ANOVA) (Figura 13), la cual comprueba si dos o más promedios de dos o más grupos de datos son similares o existe alguno que difiera significativamente de los demás (Yáñez, 2007, p.43), la cual adoptará la siguiente forma:

Análisis de Varianza de Una Vía

F.V.	S.C.	g.l.	M.C.	Estadístico de contraste
Entre niveles	$SC_{inter}$	$I-1$	$MC_{inter} = \frac{SC_{inter}}{I-1}$	$F = \frac{MC_{inter}}{MC_{intra}}$
Dentro de los niveles	$SC_{intra}$	$N-I$	$MC_{intra} = \frac{SC_{intra}}{N-I}$	
Total	$SC_{total}$	$N-1$		

Figura 13. Descripción del Análisis de Varianza de Una Vía

Fuente: Delgado, 2004

Se llevó a cabo el Test de Tukey para comparar el grado de similitud en la expresión de los genes  $\beta$ -Actin, RuANS y RuMYB10, involucrados en la biosíntesis de antocianinas mediante la técnica RT- qPCR en la especie *Rubus niveus*, puesto que dicha prueba estadística sirve para probar todas las diferencias entre medias y cuya única exigencia es que el número de repeticiones sea constante (Delgado, 2004, p.34).

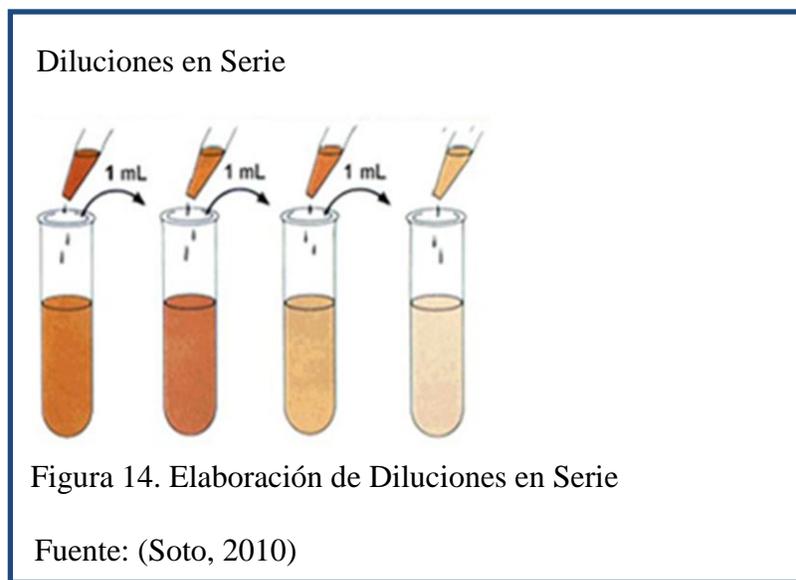
## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtención de la Curva Estándar a partir de *Rubus glaucus* con el gen  $\beta$ -Actin como control positivo.

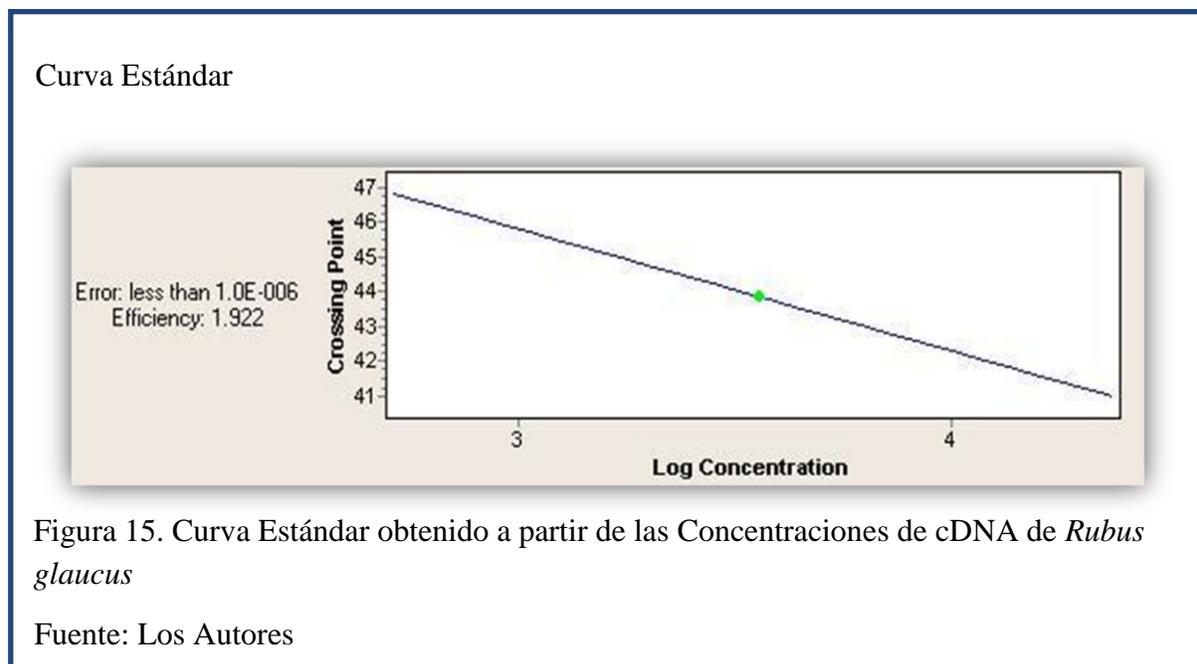
Se logró generar una curva estándar, la cual fue obtenida de las concentraciones de *Rubus glaucus*, con el gen  $\beta$ -Actin, ésta se convirtió en control interno y el parámetro necesario para obtener las concentraciones de la expresión de los genes de interés, en este caso  $\beta$ -Actin, RuANS y RuMYB10.

Como se mencionó anteriormente, fue necesario realizar diluciones (Figura 14) en serie exponencial, las cuales se utilizan para crear disoluciones muy diluidas con precisión, para obtener puntos guías para generar curvas de concentración en una escala logarítmica, el factor de dilución fue 0,1, tal como se explica en el siguiente gráfico:



La Curva Estándar obtenida de estas diluciones en serie, fue efectiva porque se obtuvo una eficiencia de 1,922, la cual se encuentra en el rango requiere el equipo LightCycler 2.0 (Figura 15) que es de 1,8 a 2 y un error muy bajo de 0,016, por lo que los datos generados son confiables. Como todo protocolo, este fue estandarizado para que no genere falsos positivos.

A continuación se representa la Curva Estándar que se utilizó durante el trabajo experimental.



#### 4.2. Resultados obtenidos mediante la técnica RT- qPCR en el análisis de la expresión de los genes $\beta$ -Actin, RuANS y RuMYB10, en la especie *Rubus niveus*.

Durante el proceso de extracción de ARN, se debe tener mucho cuidado debido a la susceptibilidad a la degradación del ARN por acción de exonucleasas presentes en el ambiente, el proceso de transcripción de ARN se lo efectuó el mismo día para evitar degradación y tener grandes cantidades de cDNA así como calidad de este mismo y con este cDNA se obtuvieron las concentraciones de cada uno de los genes sin mayor rango de error entre cada repetición.

El cDNA fue el material de partida para el análisis de la expresión de los genes  $\beta$ -Actin, RuANS y RuMYB10, en la especie *Rubus niveus*, mediante RT- qPCR, obteniendo los siguientes resultados.

Se efectuó el cálculo de N para determinar el número de repeticiones necesarias para el análisis de la expresión de los genes  $\beta$ -Actin, RuANS y RuMYB10, en la especie *Rubus niveus*, mediante RT- qPCR, y así poseer resultados confiables. La fórmula utilizada es la propuesta por Yáñez (2007), la cual se describe a continuación:

$$N \geq \frac{(Error\ Standar)^2}{0.0025(Promedio)^2}$$

Obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 3

Número de Repeticiones

Promedio	174,65	163,55	167,43
Error Estándar	33,91	30,52	32,10
N	15,08	13,93	14,70

Nota: Los Autores

El cálculo del número de repeticiones indicó que era necesario tener 15 análisis de la expresión de los genes  $\beta$ -Actin, RuANS y RuMYB10, en la especie *Rubus niveus*, mediante RT- qPCR (Tabla 3).

Tabla 4

Número de Repeticiones y Concentraciones (ng/ml) de la expresión de los genes  $\beta$ -Actin, RuANS y RuMYB10, en la especie *Rubus niveus*

Gen	$\beta$ - Actin	RuANS	RuMyB10
Numero	Concentración (ng/ml)		
1	180	93	189
2	211,6	193	165
3	141,8	143	142,6
4	179,98	211,8	219,2
5	173,9	167,8	176
6	148,3	151	149
7	166,2	172	222,4
8	137	174	162
9	162	156	180
10	168	138	177
11	194	162	160
12	147	184	197,6
13	136	208	129
14	217	167,2	132,4
15	257	132,4	110,2

Nota: Los Autores

Se efectuaron los análisis estadísticos propuestos en la metodología, los cuales generaron los siguientes resultados.

#### 4.3. Análisis del Test de Shapiro–Wilks

Test de Shapiro–Wilks						
Gen	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
B - Actin	Concentracion	15	174,65	33,91	0,90	0,2079
RuANS	Concentracion	15	163,55	30,52	0,97	0,8826
RuMyB10	Concentracion	15	167,43	32,10	0,96	0,8184

Figura 16. Datos del Test de Shapiro–Wilks, obtenidos mediante InfoStat

Fuente: Los Autores

Para saber si los residuos obtenidos cumplen con una supuesta normalidad y homogeneidad de variancias se utilizó el test de Shapiro-Wilks.

Fueron analizados 3 genes involucrados en la biosíntesis de antocianinas para la determinación de su concentración (Figura 16).

Según Rivas et al., (2013), el test de Shapiro-Wilks se puede utilizar para muestras que se encuentran integradas por 30 o menos muestras, para comprobar la normalidad en la distribución de las concentraciones se efectuó el test de Shapiro-Wilks, dando como resultando un  $p > 0.05$ , aceptando la hipótesis nula de este test la cual menciona que si el valor de  $p$  es mayor a alfa (0.05), se concluye que los datos siguen una distribución normal.

El test de Shapiro-Wilks confirmó que los datos presentaban una distribución normal lo que permite realizar la segunda prueba estadística, para determinar la relación que presentan los genes  $\beta$ -Actin, RuANS y RuMYB10, en la especie *Rubus niveus*, mediante RT- qPCR, a nivel de su expresión.

La normalidad confirmada con el test de Shapiro permite generar datos válidos (Figura 17) conteniendo así todas las variables posibles, ya que Zhang et al., (2004), mencionan en su publicación que las funciones posibles de algunos de los productos de ciertos genes son considerados como información valiosa, ya que los cDNAs analizados en este estudio corroboraron que los genes descritos se encuentran involucrados en los procesos que sustentan la maduración de la fruta, siendo estas herramientas biotecnológicas indispensables para el mejoramiento de calidad de la fruta.

#### 4.4. Análisis de la Varianza (ANOVA)

Análisis de la Varianza (ANOVA)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	952,94	2	476,47	0,46	0,6348
Gen	952,94	2	476,47	0,46	0,6348
Error	43564,71	42	1037,26		
Total	44517,65	44			

Figura 17. Datos del Análisis de la Varianza, obtenidos mediante InfoStat

Fuente: Los Autores

El análisis de la varianza (ANOVA) se puede decir que es el método más exacto cuando se pretende calcular la variabilidad de un proceso, ya sea que dicho proceso se vea afectado por factores externos o internos, puesto que este método es el único que toma en cuenta la variabilidad que presentan las interacciones entre dos factores, en nuestro caso la expresión que tiene los genes  $\beta$ -Actin, RuANS y RuMYB10, en la especie *Rubus niveus*, involucrados en la biosíntesis de antocianinas.

Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) puesto que al analizar factores tanto externos como internos, se obtuvieron resultados reproducibles puesto que Chen et al., (2012), declaran que los altos niveles de antocianinas se presentan en base a factores internos como es el grado de maduración, y externos como humedad, temperatura y luz los cuales pueden ser promotores o inhibidores de los factores de transcripción involucrados en la biosíntesis de antocianinas.

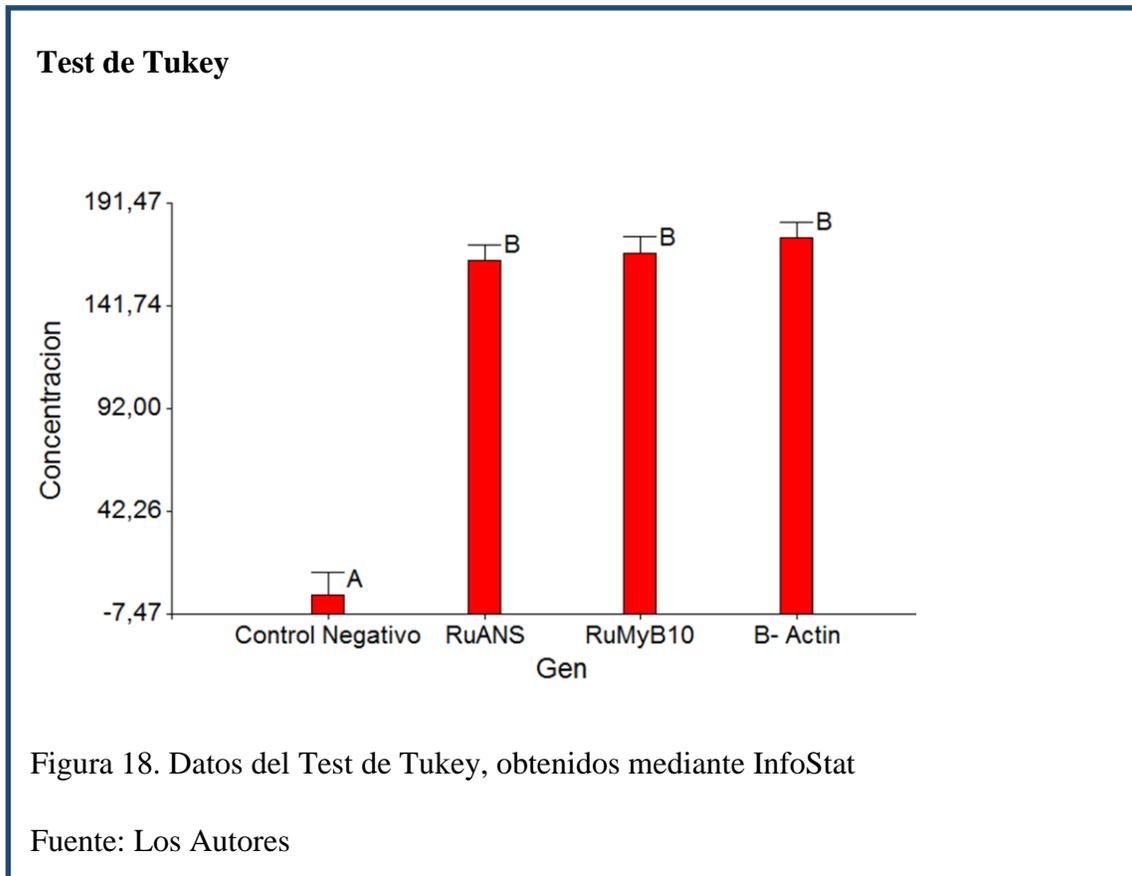
El análisis clasifica a los genes como tres grupos homogéneos que presentan entre sí medias con diferencias estadísticamente no significativas, este análisis se lo realizó con un nivel de confianza del 95%, por lo que se llegó a la conclusión de que al menos uno de los genes  $\beta$ -Actin, RuANS y RuMYB10, se encuentran involucrados en la biosíntesis de antocianinas en la especie *Rubus niveus*, determinada mediante la técnica RT – qPCR.

Paisan (2010), declara que cuando la reproducibilidad es mucho mayor a la repetibilidad, significa que es necesario entrenar al operador tanto en el manejo del instrumento como en la toma de los datos, mientras que si la repetibilidad es mucho mayor a la reproducibilidad esto significa que el instrumento requiere de mantenimiento o que no es el adecuado para realizar dicha medición, de esta forma se obtiene valores que se acercan a la realidad y así poseer un análisis de varianza con mayor grado de confianza.

En cualquier tipo de estudio la repetibilidad y reproducibilidad sirve para calcular su variabilidad y detectar cuando éste se encuentra funcionando en condiciones anormales, de esta manera, se pueden buscar estrategias correctivas que le permitan al proceso volver a trabajar en condiciones normales.

#### 4.5. Análisis del Test de Tukey

Para corroborar los datos obtenidos en el análisis de la varianza (ANOVA), se utilizó un test de Tukey para ver si existían diferencias significativas en la expresión de los genes  $\beta$ -Actin, RuANS y RuMYB10, involucrados en la biosíntesis de antocianinas en la especie *Rubus niveus*.



Como se observa en la Figura 18, se realizó una corrida estadística con el control negativo para diferenciar todos los datos de las corridas realizadas, y en base a esta se analizó que no existe diferencia significativa, por lo que se puede concluir que los 3 genes se encuentran involucrados en la biosíntesis de las antocianinas, el grupo que difiere de los tres genes es el control negativo.

Para el test de Tukey, se consideró un nivel de confianza del 95%, el gen  $\beta$ -Actin muestra un nivel de expresión superior a los genes RuANS y RuMYB10, corroborando lo expuesto por Wang et al., (2010), los cuales mencionan que  $\beta$ -Actin es seleccionado como un gen de referencia debido a su constante nivel de transcripción en las células de la especie estudiada, y por ser el gen escogido para ser el control positivo y de ahí para la creación de la curva estándar para contrastar el nivel de expresión de los demás genes.

#### 4.6. Análisis de la Curva de Amplificación

Para el análisis de fluorescencia se tomó en cuenta el grado de maduración de los frutos de *Rubus niveus* mediante observación organoléptica, Chen et al., (2012), mencionan que factores de maduración tienen elevada influencia en el sabor, propiedades nutritivas del fruto y lo más importante que se analizó es la influencia de los mismos en la constitución bioquímica y biosíntesis molecular, de este modo se obtuvieron las amplificaciones que se observan en la Figura 19.

En las tres curvas que se presentan en el gráfico se puede observar una relación de similitud en cuanto a la expresión, el CP de las tres curvas está alrededor de los 24 y 25 ciclos siendo la curva del gen  $\beta$ -Actin la que inicia en menos ciclos, es decir es el que presenta mayor expresión.

Al igual que el test de Tukey las curvas de amplificación de los tres genes involucrados en la biosíntesis de antocianinas es muy cercano entre ellos como se observa en la Figura 19, con esto se confirmó que no existen diferencias significativas en la expresión de los tres genes, por lo tanto se aceptó la hipótesis alternativa, la cual menciona que: Al menos uno de los genes  $\beta$ -Actin, RuANS y RuMYB10, involucrados en la biosíntesis de antocianinas presenta expresión determinada mediante la técnica RT – qPCR.

## Curva de Amplificación

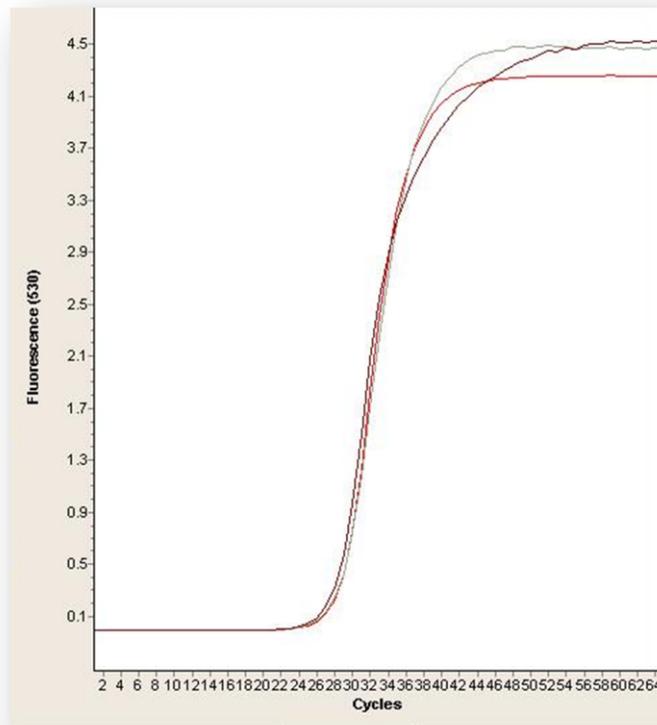


Figura 19. Análisis de la Curva de Amplificación

Fuente: Los Autores

## CONCLUSIONES

- ❖ Con la investigación realizada se logró analizar la expresión de los genes  $\beta$ -Actin, RuANS y RuMYB10, involucrados en la biosíntesis de antocianinas mediante la técnica RT- qPCR de las muestras de *Rubus niveus*, las cuales fueron recolectadas en tres sectores del Cantón Rumiñahui, donde se encuentra gran cantidad de esta planta, obteniendo resultados confiables gracias a la estandarización de un protocolo y repeticiones que nos dieron los resultados de concentración para dicho análisis.
- ❖ Gracias al uso de las técnicas y los kits con los reactivos para cada uno de los procesos desde extracción de ARN, transcripción inversa para obtención de cDNA y análisis de expresión genética, se lograron obtener los resultados esperados, principalmente el uso del RT-qPCR permite obtener resultados en un tiempo menor, analizar y realizar las estadísticas con datos confiables.
- ❖ A partir del ARN obtenido de los frutos de *Rubus niveus* se generó el cDNA mediante una reacción de transcripción inversa con el uso del kit, se obtuvo gran cantidad de cDNA para realizar las cuantificaciones en la RT-qPCR y por si existiese algún error tener reserva de muestra de cDNA.
- ❖ En base a la cuantificación del cDNA se logró establecer una curva de calibración estándar de la concentración, como referencia para el análisis de concentración de las muestras de interés, dicha curva se realizó con datos de las concentraciones más altas obtenidas a partir de una cuantificación de cDNA de tres especies analizadas en un proyecto paralelo a nuestra investigación.
- ❖ Finalmente se obtuvieron las cuantificaciones de concentraciones de cDNA con el uso de la técnica de RT-qPCR, lográndose determinar la expresión de los genes de interés,  $\beta$ -Actin, RuANS y RuMYB10 y así se estableció un proceso estándar para esta investigación.

- ❖ De acuerdo a los valores obtenidos con los análisis estadísticos Shapiro Wilks, Anova y test de Tukey, se observó que no existen diferencias significativas en la expresión de los tres genes analizados, aceptando la hipótesis alternativa, la cual menciona que: Al menos uno de los genes  $\beta$ -Actin, RuANS y RuMYB10, involucrados en la biosíntesis de antocianinas presenta expresión determinada mediante la técnica RT – qPCR.
  
- ❖ Los resultados de esta investigación muestran que los niveles de concentración entre los tres genes involucrados en la biosíntesis de antocianinas en *Rubus niveus* son altos, siendo el gen  $\beta$ -Actin el que presenta mayor concentración (174,65 ng/mL), seguido por el gen RuANS (167,43ng/mL) y finalmente el gen RuMYB10 (163,55ng/mL), llegando a la conclusión que la especie estudiada presenta un nivel de expresión similar entre los tres genes analizados dando a conocer que esta especie es una buena fuente de antocianinas.

## RECOMENDACIONES

- ✓ Analizar la factibilidad de investigaciones relacionadas con la expresión génica con especies de interés comercial e industrial, con el uso de la técnica del RT-qPCR como herramienta principal.
- ✓ Realizar además investigaciones tomando a esta como punto de partida para mejoramiento de especies de mora, género *Rubus*, con el fin de incrementar el valor de este producto en el país, tanto como alimento y como fuente para desarrollo de nutraceuticos y medicamentos.
- ✓ El uso de la técnica del RT-qPCR se la puede utilizar en varios tipos de investigaciones no solo de muestras vegetales si no también con muestras de tejidos animales, de microorganismos y humanas; esta herramienta debe ser mayormente utilizada para cuantificación de la expresión génica, también para detección molecular de genes, para estudiar el genoma de virus de ARN y otras investigaciones relacionadas.
- ✓ Para el proceso de extracción y conservación y el posterior trabajo con ARN, se debe tener mucho cuidado debido a la susceptibilidad de ésta molécula a degradación de exonucleasas presentes en el ambiente, por ello es necesario trabajar preferentemente en cámara de flujo laminar previamente esterilizada al igual que todos los materiales.
- ✓ Cada procedimiento del protocolo debe realizarse de manera controlada tomando en cuenta todos los puntos críticos de asepsia, cantidades de reactivos uso de materiales y metodologías de manera adecuada para obtener resultados válidos.

## REFERENCIAS

1. Aguilera, Reza, Chew, & Meza. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 16 - 22.
2. Bonilla, E. (2002). Cuantificación de la expresión génica a partir de un número limitado de células mediante RT-PCR en tiempo real. *Bioquímica*, 3 - 7.
3. Carpio, D., Serrano, & Giusti. (2009). CARACTERIZACIÓN DE LAS ANTOCIANINAS DE LOS FRUTOS DE Lechler. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 76 - 86.
4. Chen, Yu, Tang, & Wang. (2012). Identification and expression analysis of genes involved in anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in the fruit of blackberry. *Scientia Horticulturae*, 61–68.
5. Cortazar, A. (2004). *Métodos Físico-Químicos en Biotecnología: PCR*. México - México: Universidad Nacional Autónoma de México.
6. Deighton, N. (2000). Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1307 - 1313.
7. Delgado, R. (2004). *Iniciación a la probabilidad y la estadística*. Cataluña: Universidad Autónoma de Barcelona.
8. Edwards, Logan, & Saunders. (2004). *Real-Time PCR: An Essential Guide*. Norfolk, United Kingdom: Horizon Bioscience.
9. Efrese, R. (2010). *The use of qRT-PCR approach for comparative phenylpropanoid gene expression studies in two Rubus spp.* Romania: POS CCE.
10. Espinosa, N. (2011). Evaluación Morfoagronómica y Caracterización Molecular de la Colección de Mora de Corpoica y Materiales del Agricultor. *Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de: Magister en Ciencias*

*Agrarias con énfasis en Genética y Fitomejoramiento*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

11. Farinango, M. (Enero de 2010). Estudio de la fisiología postcosecha de la Mora de Castilla (*Rubus glaucus* B.) y de la Mora variedad Brazos (*Rubus* sp.). *Proyecto previo a la Obtención del título de Ingeniera Agroindustrial*. Quito, Pichincha, Ecuador: Escuela Politécnica Nacional.
12. Garzón, G. (2008). Las Antocianinas como Colorantes Naturales y Compuestos Bioactivos: Revisión. *Acta biol. Colomb*, 27 - 36.
13. Garzón, Riesgo, d., & Orfa. (2006). *Bioquímica I. La pregunta como base de la inquietud científica*. Bogotá – Colombia: Centro Editorial Rosarista.
14. Gobierno de la Provincia de Pichincha . (2008). *Caracterización Cantonal y Parroquia: Cantón Rumiñahui*. Quito - Ecuador: Gobierno de la Provincia de Pichincha.
15. Guerra, M. (2006). Separación, caracterización estructural y cuantificación de antocianinas mediante métodos químico-físicos. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 35 - 44.
16. Hagiwara, Yoshino, Ichihara, Kawabe, Tamano, Aoki, . . . Shirai. (2002). Prevention by natural food anthocyanins, purple sweet potato color and red cabbage color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine. *Journal of Toxicology Science*, 57 - 68.
17. Hernández, A. (1995). Análisis del RNA: Estudio de la expresión génica. *BIOLOGIA MOLECULAR Y NEFROLOGIA*, 67 - 84.
18. Huggett, Dheda, Bustin, & Zumla. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes & Immunity*, 279 - 284.
19. Jennings, D. (1998). Blackberries and Raspberries (*Rubus*). *International Society for Horticultural Science*, 110.

20. Landázuri, O. (2010). La 'mora' *Rubus niveus*, algunos datos importantes sobre la especie en el contexto de la problemática de control y erradicación de la especie. *La Granja. Vol.12*, 28-31.
21. Leyva, D. (Septiembre de 2009). Determinación de Antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en licores y fruto de mora. *tesis para obtención de título de ingeniero en Alimentos*. Huajuapán de León, Oaxaca, México: Universidad Tecnológica de la Mixteca.
22. Martínez, N. (2011). Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schltld (zarzamora). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 66-71.
23. Miyazawa, N. K. (1999). Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 1083-1091.
24. Morton, J. (1987). Fruits of warm climates. *Mysore Raspberry*, 109–110.
25. Paisan, Y. (2010). La Repetibilidad y Reproducibilidad en el aseguramiento de la Calidad de los Procesos de Medición. *Tecnología Química*, 117 - 121.
26. Patel, A. (2004). Therapeutic constituents and actions of *Rubus* species. *Current Medicinal Chemistry*, 1501-1512.
27. Paz y Miño, C. (1998). Genética y Biología molecular-Resúmenes del curso teórico práctico. En *Técnicas de Genética y Biología molecular en Investigación Básica y Aplicada* (págs. 41-53). Quito- Ecuador: Laboratorio de Genética Molecular y Citogenética Humana PUCE.
28. Quinton, J. (2011). Characterisation of *Rubus niveus*: a prerequisite to its biological control in oceanic islands. *Biocontrol Science and Technology Vol. 21*, 733-752.
29. Rivas, A. (2004). Creación de Un Centro de Interpretación y Capacitación de Guías Nativos. *Previa a la obtención del Título en Ingeniería de Empresas*

*Turísticas y Manejo de Áreas Naturales*. Quito, Pichincha, Ecuador: Universidad Tecnológica Equinoccial.

30. Rivas, F. (4 de Octubre de 2010). Análisis de la expresión del gen PR-1, mediante la técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR), en tomate (*Solanum lycopersicum*) infectado con *Phytophthora infestans*. *Previa a la obtención de Grado Académico o Título de Ingeniero en Biotecnología*. Sangolquí, Pichincha, Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército.
31. Rivas, R. (2013). Investigación clínica XVI: Diferencias de medianas con la U de Mann-Whitney. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 414 - 419.
32. Rodríguez, D. S. (Mayo de 2006). *Análisis de datos de Expresión Genética mediante técnicas de Biclustering*. Recuperado el 07 de Diciembre de 2014, de <https://www.lsi.us.es/docs/doctorado/memorias/Memoria-v2.pdf>
33. Romoleroux, K. (1996). *Flora of Ecuador: Rosaceae*. Quito - Ecuador: PUCE.
34. Rzedowsk, & Calderón. (2005). Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes: ROSACEAE. *INECOL*, 1 - 159.
35. Salgado, M. D. (03 de Marzo de 2013). *Museo de Acuarela y Dibujo Muñoz Mariño*. Recuperado el 07 de Febrero de 2015, de <http://www.museoacuarelaydibujo.com/cgi-bin/wd/?pg=47>
36. Salguero, P. (Junio de 2012). Tesis previa a la obtención del título de: Licenciada en Gestión para el Desarrollo Local y Sostenible. *Soberanía Alimentaria: Producción Sana y La Importancia de una Buena Nutrición en las familias de los barrios de Cotogchoa y Jatunpungo ubicados en las parroquias de Cotogchoa y Sangolquí, Cantón Rumiñahui, Provincia de Pichincha, 2009 – 2010*. . Quito, Pichincha, Ecuador.
37. Sethi, M. (2011). qPCR y RT - qPCR con garantía de éxito. *Farmespaña Industrial*, 63 - 65.

38. Snyder et al, S. (2012). Juice, Pulp and Seeds Fractionated from Dry Climate Primocane Raspberry Cultivars (*Rubus idaeus*) Have Significantly Different Antioxidant Capacity, Anthocyanin Content and Color. *Plant Foods for Human Nutrition*, 358–364.
39. Soto, M. (21 de Octubre de 2010). *Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Recuperado el 27 de Abril de 2014, de <http://www.cita.ucr.ac.cr/Alimentica/Articulos/Articulo%20de%20mora,%20Alimentica,%2025oct10.pdf>
40. Thieman, W. (2010). Introducción a la Biotecnología. En W. Thieman, *Introducción a la Biotecnología* (págs. 46 - 47). Madrid - España: PEARSON.
41. Ugaz, O. L. (1997). *Colorantes Naturales*. Perú.
42. Uniyal, Singh, Jamwal, & Lal. (2006). Traditional use of medicinal plants among the tribal communities of Chhota Bhangal, Western Himalaya. *ournal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2-14.
43. Vinueza, C. (2009). PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 1 - 13.
44. Wang, Bolitho, Grafton, Kortstee, Karunairetnam, Ghie, M., . . . Hellens. (2010). An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae. *BMC Plant Biology*, 10 - 50.
45. Wilhelm, J. (2003). Real-Time Polymerase Chain Reaction. *ChemBioChem*, 1120 - 1128.
46. Yáñez, P. (2007). *Biometría y Bioestadística: Analizando la Estructura Numérica de la Información en Proyectos Biológicos y Ecológicos*. Quito - Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana.
47. Zhang, Franco, Curtin, & Conn. (2004). To Stretch the Boundary of Secondary Metabolite Production in Plant Cell-Based Bioprocessing: Anthocyanin as a Case Study. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 264–271.

9 de marzo del 2015

### CERTIFICACIÓN

Mediante la presente certifico que la muestra N° 003, colectada por la Srta. Sofia Peñaherrera Toledo, colectada en Pichincha, Rumiflahui, San Rafael a 2454 msnm, corresponde a la especie:

*Rubus niveus* Wall. ex G. Don

ROSACEAE

Es todo cuanto puedo certificar y autorizo a la Srta. Sofia Peñaherrera hacer uso de este certificado.

Atentamente,



**Dr. Marco Cerna**  
**BIOLOGO – BOTANICO**  
**DOCENTE INVESTIGADOR**  
**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**