

Clonación del gen *PCA3* para cuantificación absoluta por PCR en tiempo real

IRIGOYEN-ARREDONDO, Martín*†, ARAMBULA-MERAZ, Eliakym, BENÍTEZ-GARCÍA, Israel, y GARCÍA-MAGALLANES, Noemí

Universidad Politécnica de Sinaloa. Carretera Municipal Libre Mazatlán Higuera Km 3, 82199 Mazatlán, Sinaloa

Recibido 24 Junio, 2017; Aceptado 06 Septiembre, 2017

Resumen

El cáncer de próstata (CaP) es una de las neoplasias más frecuente en varones y es la segunda causa de muerte por cáncer a nivel mundial. En 2015 en México la mortalidad fue de 6,447, siendo la principal causa de muerte por cáncer en varones. La etiología de la enfermedad es poco conocida, se ha relacionado con factores como; edad, raza y factores genéticos. En el presente estudio se realizó la clonación del mensajero de *PCA3* a partir de muestras de tejido prostático de pacientes con CaP, posteriormente se estandarizó la cuantificación absoluta del número de copias del mensajero del gen *PCA3* utilizando el sistema de sondas Taqman®. Se logró obtener en el ensayo de tiempo real una R^2 de 0.999 y una eficiencia del 88.65%. Se cuantificó el número de copias del mensajero de *PCA3* en muestras procedentes de tejido y orina. La eficiencia y el valor de R^2 de la prueba de *PCA3* muestran que puede ser utilizada como un marcador tumoral en orina en pacientes mexicanos con lo cual se podría aumentar la precisión en el diagnóstico del CaP. Este es el primer trabajo realizado con este gen en pacientes con CaP en el estado de Sinaloa.

PCA3, Clonación, Cuantificación, DD3

Abstract

Prostate cancer (PCa) is one of the most common neoplasms in men, being the second leading cause of cancer death in men worldwide. In 2015 in Mexico the PCa claimed the lives of 6,447 men, according to data reported by INEGI, being the main cause of cancer death in men in the country. Although the etiology of the disease is little known, it has been related to some factors such as; Age, race and genetic factors. In the present study, cloning of the *PCA3* messenger from a prostatic tissue sample with prostate cancer was performed, the absolute quantification of the copy number of the *PCA3* gene messenger in prostate cancer using the Taqman® probe system was standardized and analyzed by means of real-time PCR with the StepOne Plus. An R^2 of 0.999 and an efficiency of 88.65% were obtained in the real-time test. In addition, data extrapolation can be performed with the program for samples of unknown concentrations. It was possible to quantify the number of copies of the *PCA3* messenger in samples from both tissue and urine samples. The efficacy and R^2 value of the *PCA3* test that can be used as a tumor marker in urine in Mexican patients that could increase the accuracy in the diagnosis of prostate cancer. This is the first work done with this gene in patients with prostate cancer in the state of Sinaloa.

PCA3, Prostate Cancer, q-PCR, DD3

Citación: IRIGOYEN-ARREDONDO, Martín, ARAMBULA-MERAZ, Eliakym, BENÍTEZ-GARCÍA, Israel, y GARCÍA-MAGALLANES, Noemí. Clonación del gen *PCA3* para cuantificación absoluta por PCR en tiempo real. Revista de Simulación y Laboratorio. 2017, 4-12: 46-52

*Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: mirigoyenmca@upsin.edu.mx)

†Investigador contribuyendo como primer autor

1. Introducción

El cáncer es una acumulación anómala de células ocasionada por el desequilibrio entre la división celular y la apoptosis, lo que conduce a un proceso patológico denominado carcinogénesis. Las células cancerígenas poseen un grupo de características que las diferencian de las células normales, entre las cuales destacan; poseen alteración de su metabolismo, evaden señales celulares, pueden realizar metástasis, presentan inestabilidad genómica y pueden realizar angiogénesis, entre otras (Gupta et al, 2006; Finkel et al, 2007; Lou et al, 2015; Ghaffari et al, 2015).

Durante 2012 hubo 8.2 millones de muertes relacionadas al cáncer, siendo los principales el pulmonar, hepático, gástrico, colorrectal, mamario, esófago y próstata (OMS, 2015). En México en 2015 se reportó que 6,447 varones murieron por cáncer de próstata, siendo una de las principales causas de muerte por cáncer en hombres, según datos reportados por INEGI.

El cáncer de próstata (CaP) se produce cuando células de la próstata mutan y comienzan a dividirse sin control. En las primeras etapas de la enfermedad, el cáncer se limita a la próstata y no suele ser mortal, pero en etapas más avanzadas puede realizar metástasis a ganglios linfáticos y huesos (Barry, 1997; Kok et al, 2002).

Los factores de riesgo establecidos para CaP son: edad, origen étnico e historial familiar. Estudios de incidencia específicas por edad revela que el riesgo de CaP comienza a elevarse bruscamente después de la edad de 55 años a 70-74 años de edad. Entre los genes implicados en el desarrollo del CaP se destacan; la fusión ERG-TMPRSS2, PRUNE2 y el Gen Asociado a Cáncer de Próstata 3 (PCA3) (Verhaegh et al, 2000; Gann, 2002).

El gen PCA3 es el biomarcador de mayor relevancia gracias a su elevada sensibilidad y especificidad, ya que a diferencia otros marcadores moleculares, este no se encuentra influenciado por otras enfermedades benignas de la próstata, debido a que es un gen altamente sobre expresado en esta neoplasia (Kok et al, 2002; Marks et al, 2007; Heidenreich et al 2010; Fontenete et al, 2011).

Las ventajas precisamente de este tipo de pruebas es reducir el número de biopsias realizadas a los pacientes, porque además de ser una práctica dolorosa, los varones se reusan a practicarla al igual que practicarse el tacto rectal, lo que puede ser determinante al momento de un diagnóstico futuro para la detección en etapas invasivas del CaP. Por lo que PCA3 se posiciona como el marcador molecular para CaP más prometedor.

Diseño de Experimento

Se llevó a cabo un diseño de experimento para el establecimiento del protocolo de clonación por medio del kit pGEM®-T Easy Vector II de Promega, el protocolo consistió en un diseño central compuesto por tres pasos; ligación del vector con los mensajeros de PCA3, transformación de las células competentes JM109 con el vector transformante y por último la selección y propagación de las células transformadas.

Por otra parte para la estandarización de la cuantificación absoluta se estableció el protocolo a partir de diluciones de ADN plasmídico obtenido de las células transformadas. Se generación 5 puntos en la curva con diluciones seriadas 1:10. Todas las muestras se analizaron por duplicado. El ensayo se llevó a cabo por medio del uso de sondas de hidrolisis y se analizaron por medio de PCR en tiempo real con el equipo StepOne Plus.

Extracción de RNA

Se realizó la extracción ARN de tejido por medio de trizol LS. Por medio del kit NucleoSpin® RNA se realizó la extracción de ARN de orina.

Generación de ADNc

A partir del RNA obtenido, se procedió con la obtención de ADNc por medio del kit ImProm-II™ Reverse Transcription System de Promega.

Clonación del mensajero de PCA3

Se procedió a realizar la clonación de los fragmentos de interés del gen PCA3 mediante el kit pGEM®-T Easy Vector II de Promega. La clonación se conformó en tres etapas; ligación, transformación y selección.

Se procedió con la reacción de ligación en tubos de 0.5 ml, se realizaron tres reacciones; reacción estándar, control positivo y un control negativo. Las reacciones incluyeron 2x rapid buffer ligation, pGEM®-T Easy Vector, productos de PCR, inserto control de DNA, DNA ligasa T4 y se ajustaron con agua desionizada. Posteriormente, se incubaron toda la noche a 4°C en un termociclador para evitar cualquier contaminación.

Pasado el tiempo, se centrifugaron brevemente las reacciones de ligación y se añadieron 2 µl de cada reacción a un tubo estéril de 1.5 ml respectivamente, los cuales se colocaron sobre hielo. Las células competentes se expusieron a baño de hielo hasta que se descongelaron (aproximadamente 5 minutos). Se transfirieron 50 µl de las células a cada tubo de reacción de ligación y se mezclaron suavemente para posteriormente incubarlos durante 20 minutos en hielo. Después, se colocaron las células en baño María a 42°C durante 50 segundos, transcurrido el tiempo se devolvieron a baño de hielo durante 2 minutos.

Se añadieron 950 µl de medio SOC a la reacción de ligación-transformación y se incubaron por 1 hora y media a 37°C (temperatura fisiológica) a 150 rpm. Una vez concluida la reacción ligación-transformación, se sembraron 100 µl de cada cultivo transformado por duplicado en medio LB/ampicilina/IPTG/X-gal, se incubaron toda la noche a 37°C en una incubadora.

Para finalizar, se seleccionaron las colonias blancas presentes en las cajas, lo cual nos indica la presencia del vector en las bacterias. Las colonias seleccionadas se cultivaron en caldo LB/ampicilina. Una vez en el caldo se dejaron incubando hasta una DO600nm de 0.4. Se conservaron 800 µl de cultivo en 200 µl glicerol y se almacenaron a -20°C para su posterior uso.

Extracción de ADN plasmídico

A partir de las células transformadas se procedió a la obtención de plásmidos por medio de lisis alcalina.

Curva estándar PCA3

Para realizar la cuantificación absoluta se generó una curva patrón estándar de los plásmidos transformados con el mensajero de PCA3. Para la estandarización de PCA3 se tomó en cuenta el número de copias de dsDNA y la concentración de DNA plasmídico generado en las colonias seleccionadas. Posteriormente se preparó el ADN a diferentes 5 diferentes concentraciones, con un factor serial 1:10. En todas las muestras se incluyeron duplicados y controles negativos para asegurarse de la fiabilidad de los datos obtenidos.

3. Resultados y Discusiones

Se realizó una amplificación por medio de PCR a partir del ADNc de una muestra de CaP. En la figura 1 podemos observar los productos de PCR de dicha reamplificación, donde observamos un tamaño de banda aproximadamente de 116 pb, lo cual concuerda con el fragmento esperado, por lo que se comprueba la presencia y expresión de PCA3.

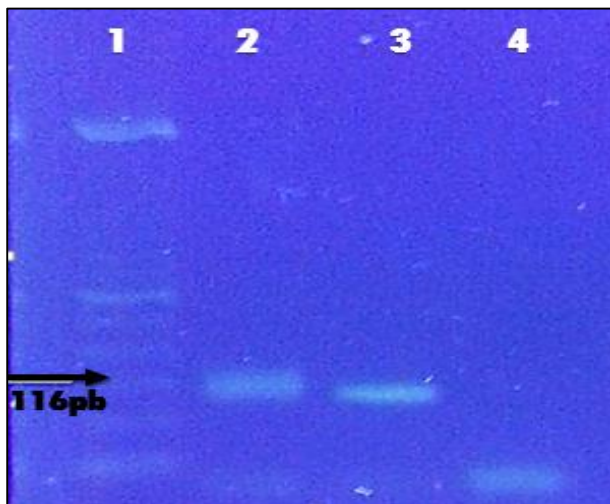


Figura 1 PCR de ADNc de PCA3. En el carril 2 y 3 se encuentran muestras positivas para CaP. En el carril 4 se muestra el control negativo. El marcador de peso molecular de 50pb se localiza en el carril 1

A partir de los productos de PCR se procedió con la clonación del mensajero de PCA3. Donde se obtuvo una densidad óptima de crecimiento en el medio SOC de $0.717 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, las cuales posteriormente fueron propagadas en medio LB/IPTG/X-GAL/AMP. Se hizo la selección de una colonia por sus características morfológicas; presencia de coloración blanca lo cual indica la presencia del vector y que estuvieran aisladas de otras colonias, así como ninguna anomalía en su forma.

Las semillas conservadas en glicerol se propagaron para probar la viabilidad de la cepa una vez almacenadas, lo cual se puede observar en la figura 2.

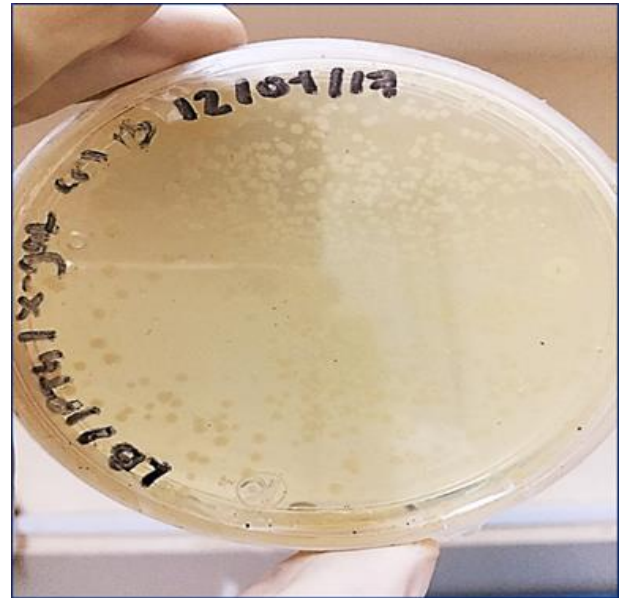


Figura 2 Colonias transformadas procedentes de la semilla de la colonia inicial con el vector recombinante

Una vez obtenidas las colonias transformadas se procedió a realizar la extracción del ADN plasmídico. La integridad y concentración de ADN se evaluó por espectrofotometría utilizando una longitud de onda de 260 y 280nm. Donde se obtuvo una concentración de ADN plasmídico de $2.097 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ y una pureza de 1.039. Posteriormente se realizó una amplificación por medio de PCR.

Una vez obtenidos los productos de PCR del ADN plasmídico se procedió a la verificación de la integridad del mismo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con Gel Red, los cuales se observaron posteriormente en un transiluminador de UV.

En la figura 3 se puede observar que el ADN plasmídico presenta el tamaño del fragmento esperado de 116 pb, lo cual indica la incorporación del vector recombinante en las bacterias transformadas.

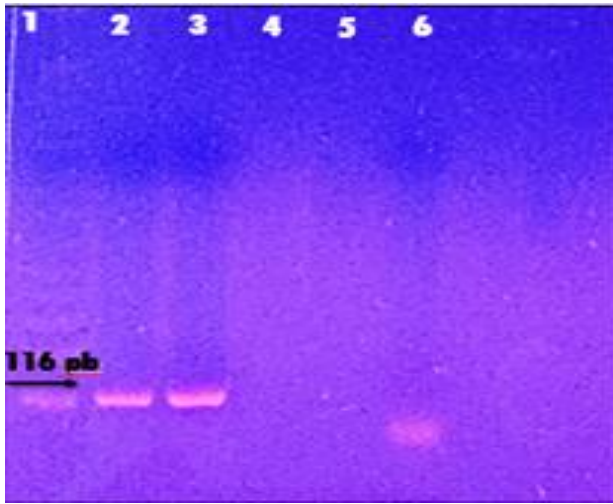


Figura 3 En el carril 1 se encuentra el marcador (100pb), en el carril 2 y 3 se encuentran los productos de PCR de ADN plasmídico y en el carril 6 se encuentra el negativo

Una vez que se comprobó la presencia del mensajero de PCA3 en el ADN plasmídico, se procedió con la estandarización de la cuantificación absoluta para PCA3 por medio de PCR en tiempo real. En la Tabla 1 podemos observar las 5 concentraciones que conformaron la curva, cada una se realizó por duplicado y no se observan desviaciones estándar significativas entre los duplicados. Por otra parte, se observa el comportamiento del CT el cual aumenta en las muestras con menores concentraciones, lo que corresponde un comportamiento esperado.

#	Well	Sample N...	Target Na...	Ct	Ct SD	Quantity	Quantity SD
COL B2							
1	A1	COL B2	PCA3	17.170	0.119	0.25	
2	A2	COL B2	PCA3	17.338	0.119	0.25	
3	B1	COL B2	PCA3	20.729	0.096	0.025	
4	B2	COL B2	PCA3	20.865	0.096	0.025	
5	C1	COL B2	PCA3	24.251	0.022	0.002	
6	C2	COL B2	PCA3	24.220	0.022	0.002	
7	D1	COL B2	PCA3	27.888	0.057	0	
8	D2	COL B2	PCA3	27.968	0.057	0	
9	E1	COL B2	PCA3	31.771	0.118	0	
10	E2	COL B2	PCA3	31.939	0.118	0	
11	F1	COL B2	PCA3	Undetermi...			
12	F2	COL B2	PCA3	Undetermi...			

Tabla 1 CT, CT SD obtenidos de la curva de estandarización para PCA3

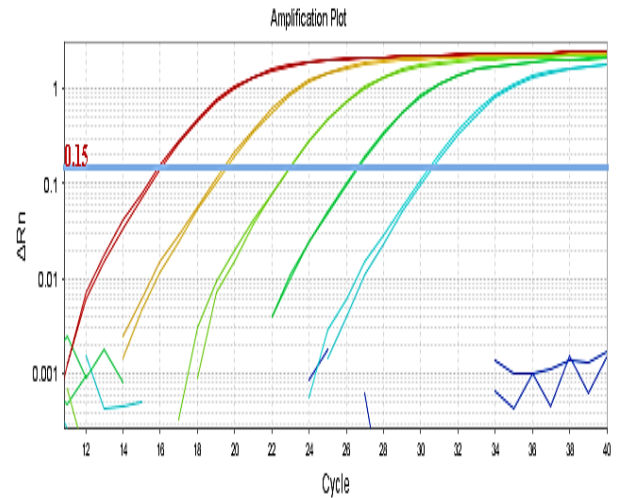


Grafico 1 Plot de amplificación de la curva de estandarización para PCA3

En el grafico 1 podemos observar gráficamente lo anterior. En la Grafico 2 se ilustra la curva de regresión lineal para el experimento. Donde se observa una R2 de 0.999 y una eficiencia del 88.65% lo cual nos indica que el experimento es reproducible. Se comprobó la reproducibilidad realizando un experimento con los estándares y una muestra de concentración desconocida para ver la capacidad del equipo de extrapolar los datos. Donde obtuvimos la concentración de la muestra desconocida correspondiente a 0.21 µg. Grafico 7.

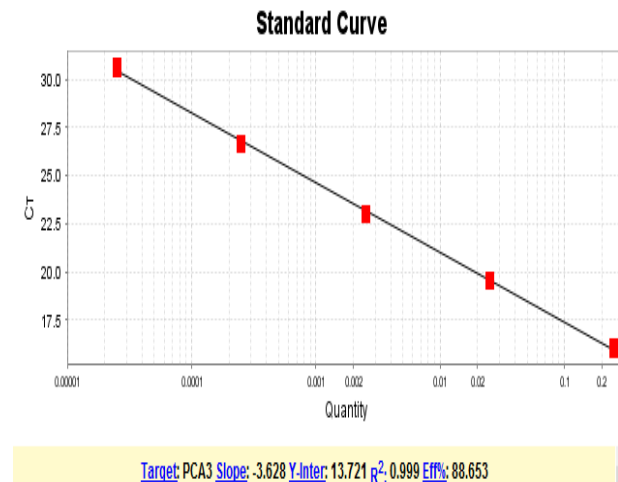


Grafico 2 Regresión lineal obtenida para la curva estándar PCA3

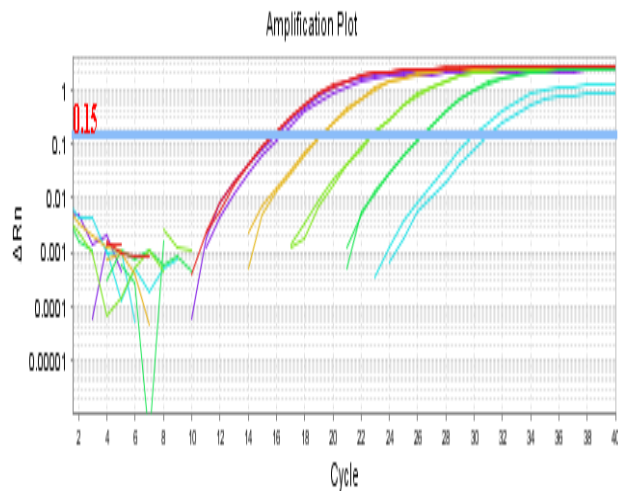


Grafico 3 Plot de amplificación. Estándares y muestra desconocida

Para comprobar la reproducibilidad del experimento en muestras de orina se realizó un experimento donde se amplificó una muestra de orina y un control positivo. En muestras de orina el experimento es reproducible, pues si logró amplificar el mensajero de PCA3, aunque las concentraciones del mismo están por debajo de las muestras provenientes de tejido. Esto se debe a que se obtienen pocas células que se arrastran desde la próstata hasta la uretra a través de la orina, por lo cual la concentración del mensajero es menor. Grafico 4.

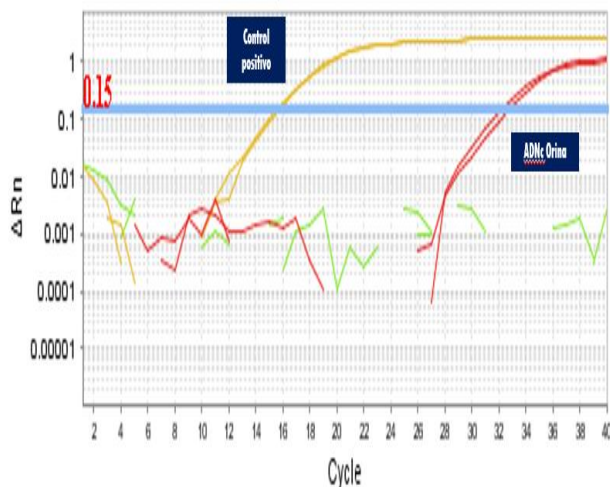


Grafico 4 Plot de amplificación. ADNc de orina y control positivo

Para comprobar que hay mayor número de copias del mensajero en muestras de tejido, se analizaron dos muestras de orina y una muestra de tejido, de concentraciones desconocidas, los resultados se pueden observar en la tabla 2.

Muestra	CT	Concentración (ng)	Número de copias
CaP M.O1	32.517	6.24951E-06	49900
CaP M.O2	32.466	6.45334E-06	51500
CaP001	28.99	5.75203E-05	459399.5

Tabla 2 Valores de CT, concentración y número de copias del gen PCA3 de muestras de pacientes con CaP

5. Conclusiones

La clonación del gen si se logró a partir de las células competentes. Por otro lado la curva estándar obtenida a partir de los plásmidos si permite cuantificar el número de copias tanto en muestras de tejido como en muestras de orina, por lo que el experimento es reproducible.

6. Perspectivas

Relacionar la expresión de PCA3 con otros genes. Relacionar la expresión de PCA3 con los valores de PSA, escala de gleason y enfermedades crónicas degenerativas.

7. Referencias

Barry, M. (1997). A Nationwide Survey of Practicing Urologists: Current Management of Benign Prostatic Hyperplasia and Clinically Localized Prostate Cancer. Pp-488-491.

Fontenete, S. Silva, J. Teixeira, A.L et al. (2011, Noviembre-Diciembre). Clinical Urology. Controversies in using urine samples for Prostate Cancer detection: PSA and PCA3 expression analysis, vol.37, No.6, pp. 719-726.

Ghaffari, P., Mardinoglu, A., Nielsen, J. (2015). Cancer Metabolism: A Modeling Perspective. Frontiers in Physiology, vol.6, pp. 1-9.

Guo, L. et al. (2014). Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 2014, 33:99.

Heidenreich, A. Bolla, M. Joniau, S et al. (2010). Guía clínica sobre el cáncer de próstata. European Association of Urology.

Herranz, F. Verdú, F. Martínez, J. (2006). Cáncer de próstata y ecografía transrectal. Servicio de Urología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón, 59(4), pp.361-375.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2017). Recuperado el 31 de Agosto de 2017. <http://www.inegi.org.mx/>

Jacques B. de Kok, Gerald W. Verhaegh, Rian W. Roelofs, et al. (2002). Cancer Research. PCA3 a Very Sensitive and Specific Marker to Detect Prostate Tumors, pp. 2695-2698.

Marks, L. Frades, Y. Lim I et al. (2007). PCA3 Molecular Urine Assay for Prostate Cancer in Men Undergoing Repeat Biopsy. Urology, 69(3), pp. 532-535.

Organización Mundial de la Salud. (2015). Cáncer. Nota descriptiva N°297. Recuperado el 31 de Agosto de 2017. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es>

Verhaegh, G. Bokhoven, A. Smit, F. Schalken, J. Bussemakers, M. (2000). Isolation and Characterization of the Promoter of the Human Prostate Cancer-specific DD3 Gene. Vol.275, No.48, pp. 37496–37503.