



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE BIOQUÍMICO
CLÍNICO**

**DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL TERAPEUTICO DEL ARN DE
INTERFERENCIA EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON EN MODELOS
INDUCIDOS CON ÁCIDO NITROPROPIÓNICO**

SOFÍA CAROLINA CABRERA FIALLOS

DIRECTOR: MSc.PABLO PALACIOS

QUITO, 2015

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, SOFÍA CAROLINA CABRERA FIALLOS, C.I. 1721042370, autora del trabajo de graduación intitulado: “DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL TERAPEUTICO DEL ARN DE INTERFERENCIA EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON EN MODELOS INDUCIDOS CON ÁCIDO NITROPROPIÓNICO” previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICO CLÍNICO en la Escuela de Bioanálisis:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

SOFIA CAROLINA CABRERA FIALLOS,

C.I. 1721042370

DEDICATORIA

A Dios y a mi madre.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por guiarme todos estos años en mis estudios y en mi formación profesional.

A mi madre que es mi apoyo incondicional, gracias por su paciencia y por su constante motivación para seguir adelante.

Un agradecimiento sincero a mi tutor de disertación, el MSc. Pablo Palacios que me guió y me dio la oportunidad de formar parte del proyecto de investigación en que se basa este trabajo. Gracias por su dedicación, su tiempo para culminar esta investigación y por su apoyo.

Gracias a mi compañero de proyecto David Sánchez por su trabajo en esta investigación. Muchas gracias a todos mis amigos que me han apoyado desde el inicio hasta la culminación de este trabajo.

Gracias a la Escuela de Bioanálisis y a la Pontificia Universidad Católica por guiarme en el crecimiento intelectual y personal durante los años de formación académica de la carrera de Bioquímica Clínica.

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTO.....	IV
TABLA DE CONTENIDOS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	XI
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS.....	XIII
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XV
ÍNDICE DE SIGLAS.....	XVII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
CAPITULO I.....	6
1.1 JUSTIFICACIÓN.....	6
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
1.3 OBJETIVOS.....	8
1.3.1 OBJETIVO GENERAL.....	8
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
1.4 HIPÓTESIS.....	8
CAPITULO II.....	9
MARCO TEÓRICO.....	9
2.1 ANTECEDENTES.....	9

2.2 Enfermedad de Huntington.....	11
2.2.1 Generalidades.....	11
2.2.2 Origen- causas.....	12
2.2.3 Signos y síntomas.....	15
2.2.4 Diagnóstico.....	18
2.2.5 Tratamientos paliativos.....	18
2.3 Modelos animales experimentales químicamente modificados.....	20
2.3.1 Características Ácido- 3 nitropropiónico.....	23
2.3.2 Ácido- 3 nitropropiónico en relación con daño celular.....	24
2.3.3 Ácido- 3 nitropropiónico en relación con daño metabólico.....	25
2.4 ARN de interferencia.....	27
2.4.1 Potencial Terapéutico.....	28
2.4.2 Aplicación a la terapia genética.....	29
2.5 Proteína ácida gliofibrilar (GFAP).....	30
2.5.1 Características.....	30
2.5.2 Función.....	31
2.5.3 Interacción con astrocitos y neuronas.....	32
2.6 Electroforesis de proteínas.....	32
2.6.1 Generalidades.....	33
2.6.2 Cuantificación de Proteína ácida gliofibrilar(GFAP).....	33
CAPITULO III.....	34
MATERIALES Y METODOS.....	34
3.1 TIPO DE ESTUDIO.....	34
3.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO Y MUESTRA.....	34
3.2.1 Criterios de inclusión.....	35
3.2.2 Criterios de exclusión.....	35
3.3 METODOLOGÍA DEL ESTUDIO.....	35

3.4 TAMAÑO DE MUESTRA.....	36
3.5 EQUIPOS Y MATERIALES.....	37
3.6 PROCEDIMIENTOS.....	39
3.6.1 Manejo de Modelos Animales Experimentales.....	39
3.6.2 Aplicación y administración del químico 3-NP (Acido Nitropropiónico).....	39
3.6.3 Perfusión de modelos animales experimentales y extracción de cerebro.....	41
3.6.4 Preparación del ARN de interferencia (ARNi).....	41
3.6.5 Inyección con ARN de interferencia a los modelos animales químicamente modificados.....	42
3.6.6 Electroforesis con gel denaturalizante (SDSPAGE).....	43
3.7 ASPECTOS ÉTICOS.....	44
CAPITULO IV.....	45
4.1 RESULTADOS.....	45
4.2 DISCUSIÓN.....	70
4.3 CONCLUSIONES.....	72
4.4 RECOMENDACIONES.....	74
4.5 BIBLIOGRAFÍA.....	76
4.6 ANEXOS.....	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1 1° Inoculación con Ácido 3 Nitropropiónico.....	39
Tabla N° 2 2° Inoculación con Ácido 3 Nitropropiónico.....	40
Tabla N° 3 3° Inoculación con Ácido 3 Nitropropiónico.....	40
Tabla N° 4 Volumen de soluciones de ARNi.....	41
Tabla N° 5 Inoculación con Ácido 3- Nitropropiónico y ARN de interferencia.....	42
Tabla N° 6 Cambio porcentual de pesos corporales de ratones inoculados con 3NP.....	54
Tabla N° 7 T de <i>Student</i>	55
Tabla N° 8 ANOVA.....	58
Tabla N° 9 Cambio porcentual de pesos de ratones inoculados con 3NP + ARNi.....	63
Tabla N° 10 R de <i>Cronbach</i>	66
Tabla N° 11 R de <i>Cronbach</i>	67
Tabla N° 12 Chi cuadrado.....	67
Tabla N° 13 ANOVA.....	68
Tabla N° 14 Fórmula Ácido 3- Nitropropiónico.....	115
Tabla N° 15 Fórmula de Anestésicos para ratones	116
Tabla N° 16 Fórmula de Solución Madre de ARNi.....	117
Tabla N° 17 Concentración de ARNi.....	118
Tabla N° 18 Preparación de concentraciones de ARNi.....	118
Tabla N° 19 Resolución de gel por porcentaje de Acrilamida.....	120
Tabla N° 20 Preparación de Gel de poliacrilamida.....	120

Tabla N° 21 Preparación de Solución Stock 4X Resolving.....	121
Tabla N° 22 Preparación de Solución Stock 4X Staking.....	121
Tabla N° 23 Preparación de Solución Persulfato de amonio.....	121
Tabla N° 24 Preparación de Solución Stock de Gel Acrilamida 30%.....	121
Tabla N° 25 Preparación de Solución 1X Tris glicina.....	122
Tabla N° 26 Preparación de Solución Tampón de Lisis.....	122
Tabla N° 27 Preparación de Solución de Fijación.....	124
Tabla N° 28 Preparación de Solución de Impregnación.....	124
Tabla N° 29 Preparación de Solución de Revelado.....	124
Tabla N° 30 Datos de ratones en cada dosis de 3 NP.....	125
Tabla N° 31 Datos de ratones con 3 NP + ARNi +.....	131

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1 Huntingtina.....	14
Figura N° 2 Procesos celulares de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP).....	31
Figura N° 3 Sujeción del ratón.....	116

ÍNDICE DE GRAFICAS

Gráfica N° 1 Respuesta de modelos experimentales al 3-NP.....	45
Gráfica N° 2 Pérdida de movilidad de modelos experimentales con 3-NP en 1° dosis.....	46
Gráfica N° 3 Pérdida de movilidad de modelos experimentales con 3-NP en 2° dosis.....	47
Gráfica N° 4 Pérdida de movilidad de modelos experimentales con 3-NP en 3° dosis.....	47
Gráfica N° 5 Rigidez muscular en la cola en modelos experimentales con 3-NP en 1° dosis.....	48
Gráfica N° 6 Rigidez muscular en la cola en modelos experimentales con 3-NP en 2° dosis.....	49
Gráfica N° 7 Rigidez muscular en la cola en modelos experimentales con 3-NP en 3° dosis.....	49
Gráfica N° 8 Temblores- Espasmos en modelos experimentales con 3-NP en 1° dosis.....	50
Gráfica N° 9 Temblores- Espasmos en modelos experimentales con 3-NP en 2° dosis.....	51
Gráfica N° 10 Temblores- Espasmos en modelos experimentales con 3-NP en 3° dosis.....	51
Gráfica N° 11 Reducción de Ingesta de agua y alimentos en modelos experimentales con 3-NP en 1° dosis.....	52
Gráfica N° 12 Reducción de Ingesta de agua y alimentos en modelos experimentales con 3-NP en 2° dosis.....	53
Gráfica N° 13 Reducción de Ingesta de agua y alimentos en modelos experimentales con 3-NP en 3° dosis.....	53

Gráfica N° 14	Peso (Kg) de modelos experimentales con 3-NP en el 1° día.....	55
Gráfica N° 15	Peso (Kg) de modelos experimentales con 3-NP en el 15° día.....	56
Gráfica N° 16	Porcentaje de pérdida de peso de modelos experimentales con 3-NP.....	57
Gráfica N° 17	Análisis Regresión Lineal: Pérdida de Pesos.....	58
Gráfica N° 18	Respuesta al tratamiento con ARNi en modelos animales experimentales químicamente modificados.....	59
Gráfica N° 19	Aumento de movilidad en modelos animales experimentales químicamente modificados tratados con ARNi.....	60
Gráfica N° 20	Disminución de Temblores – Rigidez en la cola en modelos animales experimentales químicamente modificados tratados con ARNi.....	61
Gráfica N° 21	Aumento de ingesta de agua - alimentos en modelos animales experimentales químicamente modificados tratados con ARNi.....	62
Gráfica N° 22	Pesos (Kg) 1° día de modelos animales experimentales químicamente modificados tratados con ARNi.....	64
Gráfica N° 23	Pesos (Kg) 15° día de modelos animales experimentales químicamente modificados tratados con ARNi.....	65
Gráfica N° 24	Ganancia de peso en modelos animales experimentales químicamente modificados tratados con ARNi.....	66
Gráfica N° 25	Análisis Regresión Lineal: Ganancia de Pesos.....	68

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía N° 1 Microambiente de modelos animales experimentales.....	102
Fotografía N° 2 Identificación de cada modelo animal en jaulas.....	102
Fotografía N° 3 Identificación de cada modelo animal en jaulas.....	102
Fotografía N° 4 Ratón inoculado con 3NP: Rigidez en la cola.....	103
Fotografía N° 5 Ratón 3NP + ARNi.....	103
Fotografía N° 6 Alimentación de los modelos animales experimentales.....	103
Fotografía N° 7 Alimentación de los modelos animales experimentales.....	103
Fotografía N° 8 Suministro de agua a modelos animales experimentales.....	104
Fotografía N° 9 Suministro de agua a modelos animales experimentales.....	104
Fotografía N° 10 Peso de los modelos animales experimentales.....	104
Fotografía N° 11 Peso de los modelos animales experimentales.....	104
Fotografía N° 12 Sujecion y aplicación de ARNi /3NP/Ketamina y Xilocina.....	104
Fotografía N° 13 Ratón sedado y Asegurado antes de Perfusión.....	105
Fotografía N° 14 Inicio de la Perfusión del Ratón.....	105
Fotografía N° 15 Inicio de la Perfusión del Ratón.....	105
Fotografía N° 16 Inyección de solución salina en el ventrículo izquierdo del corazón.....	106
Fotografía N° 17 Aclaramiento del hígado, después de la inyección de solución salina.....	106
Fotografía N° 18 Aclaramiento del hígado, después de la inyección de solución salina.....	106
Fotografía N° 19 Cerebros extraídos.....	107

Fotografía N° 20	Cerebros extraídos.....	107
Fotografía N° 21	Características macroscópicas de los modelos experimentales tratados con 3-NP y Control negativo.....	107
Fotografía N° 22	Características macroscópicas de los modelos experimentales tratados con 3-NP y Control negativo.....	107
Fotografía N° 23	Concentraciones de ARNi.....	108
Fotografía N° 24	Muestras de Tejido para análisis de electroforesis.....	108
Fotografía N° 25	Soluciones para llenar gel de poliacrilamida.....	108
Fotografía N° 26	Llenado del gel de poliacrilamida.....	109
Fotografía N° 27	Polimerización del gel.....	109
Fotografía N° 28	Llenado de muestras en el gel de poliacrilamida.....	110
Fotografía N° 29	Sistema de Gel de Electroforesis conectado a la fuente de voltaje.....	110
Fotografía N° 30	Corrida de las muestras.....	111
Fotografía N° 31	Corrida de las muestras.....	111
Fotografía N° 32	Gel en Solución Fijadora.....	111
Fotografía N° 33	Gel en Solución Fijadora.....	111
Fotografía N° 34	Gel en Solución de Impregnación.....	112
Fotografía N° 35	Gel en Solución de Impregnación.....	112
Fotografía N° 36	Gel en Solución de Enjuague.....	112
Fotografía N° 37	Gel en Solución de Revelado.....	113
Fotografía N° 38	Gel en Solución de Revelado.....	113
Fotografía N° 39	Gel de policrilamida.....	113

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N° 1 Ficha de Datos de Seguridad de Ácido 3-Nitropropiónico.....	82
Anexo N° 2 Ficha de Datos de Seguridad de GFAP.....	84
Anexo N° 3 Ficha de Datos de Seguridad de Invivofectamina.....	85
Anexo N° 4 Inserto de <i>Silencer</i> ® Seleccionado Pre-designado y Validado siRNA.....	87
Anexo N° 5 Inserto de Factor VII siARN.....	88
Anexo N° 6 Ficha de Datos de Seguridad de Acrilamida.....	90
Anexo N° 7 Ficha de Datos de Seguridad de NN-Metilenbisacrilamida.....	91
Anexo N° 8 Ficha de Datos de Seguridad de Tris Base.....	93
Anexo N° 9 Ficha de Datos de Persulfato de Amonio.....	96
Anexo N° 10 Ficha de Datos de TEMED.....	99
Anexo N° 11 Manejo de los Modelos Animales Experimentales.....	102
Anexo N° 12 Procedimientos de la investigación y Resultados.....	107
Anexo N° 13 Procedimientos de la investigación y Resultados.....	107
Anexo N° 14 Condiciones para el manejo de modelos animales experimentales.....	114
Anexo N° 15 Preparación y Administración Ácido 3- Nitropropiónico (3-NP).....	116
Anexo N° 16 Preparación y Administración de Anestésicos para modelos animales experimentales.....	117
Anexo N° 17 Preparación y Administración de ARN de interferencia.....	118
Anexo N° 18 Técnica de Electroforesis de proteínas.....	120

Anexo N° 19 Datos de modelos animales experimentales inoculados con 3- ácido Nitropropiónico (3-NP).....	126
Anexo N° 20 Datos de modelos animales experimentales inoculados con 3- ácido Nitropropiónico (3-NP) y tratados con ARN de interferencia (ARNi).....	131

ÍNDICE DE SIGLAS

- **ACh:** Acetilcolina
- **ADN:** Ácido Desoxiribonucleico
- **AP:** Fosfatasa alcalina
- **APS:** Solución persulfato de amonio
- **ARNi:** ARN de interferencia
- **ATP:** *Adenosina trifosfato*
- **Ca²⁺:** Calcio
- **CAT:** Enzima de síntesis transferasa colina-acetil
- **CNTF:** Factores neurotróficos ciliar
- **CIOMS:** Consejo de Organizaciones Internacionalesde las Ciencias Médicas
- **D2:** Dopamina
- **ERN:** Especies reactivas de nitrógeno
- **ERO:** Especies reactivas de oxígeno
- **FADH₂:** Flavín adenín dinucleótido
- **FDA:** Administración de comida y drogas
- **GABA:** Ácido aminobutírico
- **GAD:** Glutamato descarboxilasa
- **GDNF:** Factor neurotrófico derivado glial de la línea celular
- **GFAP:** Proteína ácida fibrilar glial
- **GP:** Globo pálido
- **HAP1:** Proteína huntingtina asociada 1
- **HD:** Enfermedad de Huntington
- **HIP1:** Proteína interactuante con la huntingtina 1

- **HIP14:** Proteína interactuante con la huntingtina 14
- **HIP1R:** HIP1-proteína relacionada
- **HRP:** Peroxidasa de rábano
- **HTT:** Gen de la Huntingtina
- **H₂O₂:** Peróxido de hidrógeno
- **IL:** Interlucina
- **LDH:** Lactato deshidrogenasa
- **NADH:** Nicotinamida adenina dinucleótido
- **NGF:** Factor de crecimiento nervioso
- **NMDA:** N-metil-D-aspartato
- **NO:** Óxido nítrico
- **NST:** Núcleo subtalámico
- **O₂:** Oxígeno
- **PACSLN1:** Proteína quinasa C y la caseína quinasa sustrato en las neuronas-1
- **PGE-2:** Prostaglandina E2
- **polyQ:** Poli-glutamina
- **SBMA:** Atrofia muscular bulbar
- **SDH:** Succinato deshidrogenasa
- **SDS:** Dodecil sulfato de sodio
- **SN:** Sustancia nigra
- **TEMED:** Tetrametiletilendiamina
- **TNF- α :** Factor necrosis tumoral alfa
- **TGF- β :** Factor beta transformador de crecimiento
- **3-NP:** Ácido 3- Nitropropiónico
- **VMAT:** Transportador vesicular de mono amina inhibido

RESUMEN

El ARN de interferencia (ARNi) es una terapia experimental para varias enfermedades de origen genético como la enfermedad de Huntington. Esta terapia se clasifica en dos categorías; la primera, incluye el ARNi que silencia genes con aplicación terapéutica; y la segunda categoría es el ARNi que silencia genes endógenos.

La enfermedad de Huntington es una patología neurodegenerativa que no posee cura en la actualidad. En esta patología, el ARN de interferencia (ARNi) inhibe la expresión de la proteína huntingtina, evita la neurodegeneración y ayuda a combatir la fisiopatología característica de esta enfermedad. También al ARN de interferencia (ARNi) se considera un mecanismo biológico ya que se introduce en las células y con el uso de vectores de ADN generan siARNs, en forma constante, la supresión de la producción de la proteína huntingtina.

Varios estudios se utilizan ratones (*Mus musculus*) como modelos animales experimentales para generar nueva información sobre las patologías y tratamientos que se puedan aplicar en un futuro.

En esta investigación se dividió en dos grupos los modelos animales experimentales: el primer grupo consistió en ratones que fueron modificados químicamente con ácido 3-Nitropropiónico (3-NP) por vía intraperitoneal; y el segundo grupo fue en ratones modificados químicamente con ácido 3-Nitropropiónico (3-NP) más el tratamiento con ARN de interferencia (ARNi) por la misma vía de inoculación.

La técnica para determinar la presencia de proteína ácida glial fibrilar (GFAP) fue la electroforesis con gel desnaturalizante (SDS PAGE) en 10 muestras de tejido de cerebro, las cuales fueron obtenidas de los modelos animales experimentales que cumplieron con los criterios de inclusión propuestos en este estudio, pero no se obtuvieron bandas visibles de proteínas ya que las muestras estaban degradadas.

Todos los resultados fueron analizados estadísticamente permitiendo realizar una correlación de dependencia de las variables de los pesos de los modelos animales experimentales, estableciendo una regresión simple determinando la relación de pérdida o ganancia de peso, mostrando la relación de independencia entre las respuestas de

ácido 3 Nitropropiónico (3-NP) más el ARN de interferencia (ARNi) en los modelos animales experimentales y la confiabilidad del experimento realizado.

Los resultados obtenidos a partir de esta investigación evidencian que el primer grupo de modelos animales experimentales químicamente, modificados con ácido 3-Nitropropiónico (3-NP), se reprodujo la fisiopatología de la enfermedad de Huntington y mostraron una disminución de peso ya que esta neurotoxina afecta al metabolismo del ATP. Mientras que en el segundo grupo de modelos animales químicamente modificados y tratados con ARN de interferencia (ARNi), mostraron que puede ser un tratamiento efectivo ya que sus funciones motoras tuvieron una mejora, mayor supervivencia de vida y un aumento de peso.

Palabras clave:

ARN de interferencia, Enfermedad de Huntington, ácido 3 nitropropiónico, western blo

ABSTRACT

RNA interference (RNAi) is an experimental therapy for several genetic diseases such as Huntington's disease. This therapy is classified into two categories; the first, includes RNAi silencing genes with therapeutic application; and the second category is the RNAi silencing endogenous genes.

Huntington's disease is a neurodegenerative disease which has no cure at present. In this condition, RNA interference (RNAi) inhibits the expression of the huntingtin protein, prevents and helps fight neurodegeneration characteristic pathophysiology of this disease. Also RNA interference (RNAi) is considered as a biological mechanism is introduced into the cells and using DNA vectors constantly generate siRNAs for suppressing the production of huntingtin protein forms.

Several studies mice (*Mus musculus*) are used as experimental animal models to generate new information on diseases and treatments that can be applied in the future.

This research was divided into two groups experimental animal models: the first group consisted of mice that were chemically modified with 3- nitropropionic acid (3-NP) via intraperitoneal; and the second group was chemically modified mice nitropropionic 3- (3-NP) plus treatment with RNA interference (RNAi) for the same route of inoculation.

The technique for determining the presence of glial fibrillary acidic protein (GFAP) was electrophoresis denaturing gel (SDS PAGE) in 10 samples of brain tissue, which were obtained from experimental animal models that met the inclusion criteria proposed in this study, but no visible protein bands were collected as the samples were degraded.

All results were statistically analyzed allowing a correlation dependence of variables weights experimental animal models, establishing a simple regression determining the ratio of loss or weight gain, showing the relationship of independence between responses of 3- nitropropionic (3-NP) plus RNA interference (RNAi) in experimental animal models and reliability of the experiment performed.

The results obtained from this research show that the first group of experimental animal models chemically modified 3- nitropropionic acid (3-NP), the pathophysiology of Huntington's disease was reproduced and showed a decrease in weight as this neurotoxin ATP affects metabolism. While in the second group of animal models and treated with chemically modified RNA interference (RNAi), they showed that it may be an effective treatment because its motor functions were an improvement, longer survival of life and weight gain.

Keywords:

RNA interference, Huntington's disease, 3- Nitropropiónico acid, western blot.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Huntington es una patología neurodegenerativa autosómica dominante, se origina por mutaciones al existir un aumento del número de repeticiones del triplete CAG del gen (IT15) que codifica la proteína huntingtina. Esta patología se caracteriza por tener síntomas progresivos y una degeneración paulatina del sistema nervioso central desencadenando incapacidades físicas y psíquicas. El cerebro de los pacientes presenta pérdida progresiva de neuronas y falta de desarrollo intranuclear neuronal, esto provoca que la huntingtina se acumule y forme agregados junto con otras proteínas mal plegadas en el citoplasma y en el núcleo (Boudreau et. alt, 2011).

En la actualidad no tiene un tratamiento, por esta razón se busca varias terapias experimentales. Una de las terapias investigadas en este trabajo es el ARN de interferencia (ARNi). Esta terapia ayuda a inhibir la expresión de la proteína huntingtina y evita la degeneración de las neuronas. El ARN de interferencia es un mecanismo biológico que se produce de forma natural en las células, su potencial terapéutico radica en proporcionar un mecanismo de defensa celular que disminuya los elementos patógenos. Su acción se centra en bloquear selectivamente el gen de la huntingtina y ayuda al mejoramiento de la fisiopatología característica de la enfermedad y de comportamiento. Su uso depende de algunas variables como el procesamiento del tejido, la estabilidad, la vida media y la aplicación de los métodos adecuados, también depende de algunos factores como una transfección adecuada para evitar efectos tóxicos (Schulte, et. alt, 2011).

El objetivo principal de esta investigación es comprobar la efectividad del ARN de interferencia como un tratamiento experimental mediante el uso de modelos animales químicamente modificados a través de la administración del ácido 3 nitropropiónico y su posterior tratamiento con ARN de interferencia (ARNi).

CAPITULO I

1.1 JUSTIFICACIÓN

La investigación de la enfermedad de Huntington (HD) radica en generar nuevos estudios y tratamientos adecuados para pacientes que padecen esta enfermedad. Uno de los tratamientos que se estudia actualmente es el ARN de interferencia (ARNi) ya que permite reducir la expresión del gen de la Huntingtina (HTT), la remodelación de la cromatina e inhibe la traducción en la secuencia de poli-glutamina (polyQ) en la región N-terminal de la proteína huntingtina de manera específica (Abdulrahman, 2011).

Para realizar esta clase de estudios se utiliza modelos experimentales para imitar químicamente o genéticamente algunos aspectos esenciales de esta patología permitiendo realizar experimentos para encontrar nuevos datos sobre posibles tratamientos. El uso de modelos experimentales genéticamente modificados involucra tener un laboratorio equipado para estos ensayos y el costo sería elevado para ejecutarlo; razón por lo cual en el presente estudio se utilizarán ratones químicamente modificados (Landles et. al,2004).

La investigación se centrará en la observación de la evolución de los modelos animales experimentales químicamente modificados tratados con ARN de interferencia (ARNi) y en la electroforesis de la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) en tejido cerebral de modelos animales químicamente modificados. Esta proteína indica neurodegeneración e hipertrofia en los astrocitos (J. Middeldorp, 2011).

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad de Huntington es un desorden neurodegenerativo provocado por una extensión del segmento de ADN que contiene un trinucleótido polimórfico que codifica la proteína de la huntingtina (Htt), responsable de los síntomas de esta patología. Las investigaciones sobre esta enfermedad actualmente se centran en los tratamientos experimentales con el objetivo de convertirse en un tratamiento efectivo para esta patología (Schulte et. alt, 2011).

El ARN de interferencia (ARNi) tiene un uso potencial para los tratamientos de esta patología; en varios estudios se afirma que inhibe la expresión de la proteína huntingtina y evita la degeneración neuronal (Liu, A, Rosas, et. alt 2008) (Jodi L. et. alt, 2008).

El ARN de interferencia (ARNi) busca determinar su potencial terapéutico genético o químico y se realiza en varios modelos experimentales principalmente en ratones (*Mus musculus*) modificados genéticamente ya que se pueden investigar mecanismos patológicos de la enfermedad, la producción de la proteína de la huntingtina o posibles efectos terapéuticos del ARNi (Rational Design of Therapeutic siRNAs: et. alt, 2011).

En varios países como en Estados Unidos, Japón, entre otros se ha estudiado las enfermedades neurodegenerativas a nivel experimental. En el 2013 la Escuela de Bioanálisis-PUCE está desarrollando el proyecto de investigación J13130 “Identificación del potencial terapéutico del ARN de interferencia en la Enfermedad de Huntington mediante modelos animales experimentales” y una parte del mismo corresponde al presente estudio que intenta dar respuesta a la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es el potencial terapéutico del ARN de interferencia (ARNi) de forma indirecta en la enfermedad de Huntington en modelos experimentales inducidos con ácido Nitropropiónico (3NP)?

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

-Determinar el potencial terapéutico del ARN de interferencia en modelos experimentales químicamente inducidos en la enfermedad de Huntington.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Determinar la dosis de Ácido Nitropropiónico (3-NP) para obtener un daño químico significativo en los cerebros de los modelos experimentales semejante al daño producido por la Enfermedad de Huntington (HD).

- Establecer el nivel de restablecimiento de la capacidad motriz de los modelos químicamente inducidos tratados con ARN de interferencia (ARNi) en la enfermedad de Huntington (HD).

- Diferenciar cuantitativamente la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) en los modelos experimentales tratados con Ácido Nitropropiónico (3-NP) y ARN de interferencia (ARNi).

1.4 HIPÓTESIS

El ARN de interferencia tiene un efecto terapéutico en la Enfermedad de Huntington al aumentar el peso, detener el daño de los astrocitos, mejorar la coordinación matriz y permitir la sobrevivencia de los modelos experimentales químicamente modificados con un desorden neurológico y disminuir los niveles tisulares de la proteína ácida glial fibrilar (GFAP).

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1 ANTECEDENTES

Los estudios sobre ARN de interferencia (ARNi) como una alternativa para el tratamiento de la enfermedad de Huntington se han desarrollado hace varios años, lo que nos permite llegar a conocer varios aspectos genéticos y moleculares de las alteraciones características de esta patología. Estos estudios se han probado en varios modelos experimentales como roedores para evaluar y optimizar la seguridad del uso terapéutico del ARN de interferencia.

Uno de los estudios que centra su análisis en el ARNi es: “Alto contenido de sustancias químicas y pantallas de ARNi para los supresores de neurotoxicidad en los modelos de la enfermedad de Huntington” permitiendo obtener datos sobre el estado fisiológico de los astrocitos en los modelos experimentales y la cuantificación de las morfologías complejas facilitando la identificación de genes modificadores de la enfermedad (Schulte, et. alt 2011).

Otro estudio importante es el “Silenciamiento de Huntingtina y la Eficacia Terapéutico en ratones con enfermedad de Huntington” ya que muestra la posibilidad de invertir el daño celular y promover la supervivencia celular con el ARNi logrando una disminución de Huntingtina pero su desventaja fue que provocaron una inducción tóxica en las células de los modelos experimentales. (Scott Q. ,et. alt2005).

El desarrollo de modelos experimentales que asemejen los signos y síntomas de esta patología fueron tratados en el estudio de “Perfiles de expresión de los modelos de la enfermedad de Huntington” sugiere que el factor neurotrófico derivado del cerebro juega un papel importante en la degeneración estrial enfocándose en la modificación química de los ratones a través del Ácido Nitropropiónico (3NP) para comprobar que el químico asemeje la fisiopatología de la enfermedad y establecer las dosis específicas de este reactivo. Los análisis se centraron en la observación de las capacidades motrices de los ratones y el análisis del daño tisular a través de placas histológicas (Andrew D, et. alt, 2007).

Los estudios realizados actualmente sobre el ARNi se centran en el desarrollo de terapias de protección neuronal en modelos experimentales para retrasar el inicio y la progresión de la enfermedad de Huntington. El análisis de estos estudios se realiza por Western Blot (Abdulrahman, et. alt, 2011).

En América Latina, también, se han realizado estudios enfocados en silenciar la proteína Huntingtina como en México sobre Aplicaciones terapéuticas in vivo del ARNi en ratones transgénicos para la producción de la proteína Huntingtina y de las características fenotípicas de esta patología al usar el reactivo 3-NP (acidonitropropiónico) que interacciona con el ARNi para observar el potencial terapéutico del mismo y cuantificar la proteína Huntingtina por Western Blot (Nakamura López, et. alt 2009).

Todos los estudios indican que aún falta mucho que investigar sobre el ARN de interferencia y sobre los ensayos en modelos experimentales químicamente modificados.

2.2 Enfermedad de Huntington

2.2.1 Generalidades

La enfermedad de Huntington es considerada una neurodegeneración autosómica dominante. Existen tres etapas de acuerdo a la gravedad de esta patología: temprana, media y tarde (Flint Beal et. alt, 2004).

La enfermedad de Huntington al presentarse generalmente en adultos de mediana edad con síntomas de disminución motora y cognitiva tiene una muerte aproximada de 15 a 20 años después del inicio de la enfermedad. Esta patología está caracterizada por la degeneración selectiva de las neuronas espinosas medias en el núcleo caudado y el putamen. Se caracteriza por ser una enfermedad con síntomas progresivos y la degeneración paulatina del sistema nervioso provocando incapacidades físicas y psíquicas (Curtis, et. alt, 2003).

Las personas que heredan esta patología se desarrollan y llevan una vida normal hasta la adultez temprana, sin embargo los movimientos involuntarios pueden iniciarse en cualquier momento después de la infancia. En esta patología, el trastorno cognitivo se considera un síndrome subcortical ya que carece de características clínicas como afasia, amnesia, agnosia o asociados con la demencia. Los deterioros cognitivos que se evidencian en esta patología son las habilidades ejecutivas como la organización, regulación y percepción. Este grupo de habilidades afectan principalmente el rendimiento de áreas cognitivas como la velocidad, razonamiento, planificación, juicio, toma de decisiones, control de impulsos, control de temperamento, percepción, conciencia, lenguaje, aprendizaje y memoria entre otros (Bonilla, 2000).

La etapa temprana está caracterizada por la neurodegeneración estriatal y la fase final se caracteriza por el adelgazamiento cortical. Las etapas juveniles se pueden presentar desde los dos años y las etapas tardías o seniles se pueden presentar de los setenta a los ochenta años, aunque existen varias etapas de esta patología la duración de la enfermedad no cambia, suele ser siempre de 10 a 15 años. Los síntomas son difíciles de reconocer en el inicio de la enfermedad ya que se manifiestan anormalidades motoras menores como temblor general, movimientos excesivos de dedos, manos. (Abdulrahman, 2011).

En la etapa avanzada de esta patología se presenta una reducción del cuerpo estriado, corteza cerebral, hipocampo y el tálamo. Se presentan síntomas como movimientos más lentos, posturas anormales, dificultad en la relajación de los músculos, movimientos involuntarios de larga duración que son repentinos y aleatorios. En la fase terminal se presenta movimientos involuntarios de ojos, brandiquinesia, aquinesia, rigidez muscular, temblor en descanso y dificultades en prestar atención (García De Yérbes, et. alt, 2003).

La prevalencia de esta enfermedad es de 5 personas de cada 100.000 en el mundo. Actualmente no existe una cura para esta patología pero se siguen desarrollando varios tratamientos para controlar los síntomas y dar una mejora en su vida diaria. La prevalencia es más alta en Europa, ya que se presentan entre 5 a 10 casos por cada 100000 personas. Otra alta incidencia dentro de 15000 miembros de un grupo de familias en un pueblo pescador en la frontera del Lago de Maracaibo en Venezuela (Schulte, et. alt,2011).

2.2.2 Origen- causas

La enfermedad de Huntington fue descrito por primera vez por el médico estadounidense George Huntington en 1872 al estudiar varios casos (Boudreau et. alt, 2011).

En la actualidad no se ha aclarado totalmente el mecanismo patogénico de la neurodegeneración característica en la enfermedad de Huntington pero se han descrito los efectos bioenergéticos y modificaciones epigenéticas (Pérez De La Cruz, 2007).

Esta patología se origina por mutaciones ya que existe un aumento del número de repeticiones del triplete CAG que codifica el aminoácido glutamina. Estas repeticiones se encuentran en genes que codifican factores de transcripción. El gen que se afecta en esta patología es el (IT15) ubicado en el cromosoma 4 y que codifica la proteína huntingtina. La proteína huntingtina no tiene una función conocida pero se la relaciona con el desarrollo embrionario, la hematopoyesis y la neurogénesis. Esta proteína presenta 35 residuos de glutamina en el extremo N terminal en estado normal, cuando esta proteína muta presenta 38 o más residuos formando agregados que producen

translocaciones e induciendo a la muerte celular por apoptosis (Perez De la Cruz et. alt, 2007).

El cerebro de los pacientes que padecen la enfermedad de Huntington presenta pérdida progresiva de neuronas y falta de desarrollo intranuclear neuronal. Esto provoca que la huntingtina se acumule y forme agregados junto con otras proteínas mal plegadas en el citoplasma y en el núcleo entre ellas se incluyen los componentes del sistema de ubiquitina-proteosoma, chaperonas, proteínas sinápticas y factores de transcripción.

La Huntingtina es una proteína multidominio de 348-kDa, tiene una glutamina polimórfica que en su extremo amino terminal que es rico en prolina. La polyQ induce a cambios de formación en la proteína formando agregados intracelulares. La función específica de la Huntingtina no está descrita en la actualidad ya que tiene poca homología de secuencia con otras proteínas conocidas. Está localizada en varios compartimientos sub-celulares como el núcleo, cuerpo celular, dendritas y terminales nerviosas de la neurona. También puede estar relacionada con organelos celulares como el aparato de Golgi, retículo endoplasmático y la mitocondria. Se ha relacionado a la Huntingtina con la interacción directa con β tubulina, incluyéndola en la función del transporte de vesículas, anclaje del citoesqueleto, endocitosis, transporte neuronal y señalización postsináptica. La proteína de la huntingtina se expresa en forma amplia y se encuentra niveles altos en los testículos y el cerebro. En el cerebro los principales sitios de expresión son el neocórtex, el cerebelo, el cuerpo estriado y el hipocampo. La proteína de Huntington también se asocia con muchas proteínas que regulan el transporte intracelular o la endocitosis como la proteína huntingtina asociada 1 (HAP1), proteína interactuante con la huntingtina 1 y 14 (HIP1 y HIP14), HIP1-proteína relacionada (HIP1R), proteína quinasa C y la caseína quinasa sustrato en las neuronas-1 (PACSIN1) (Landles et. alt, 2004).

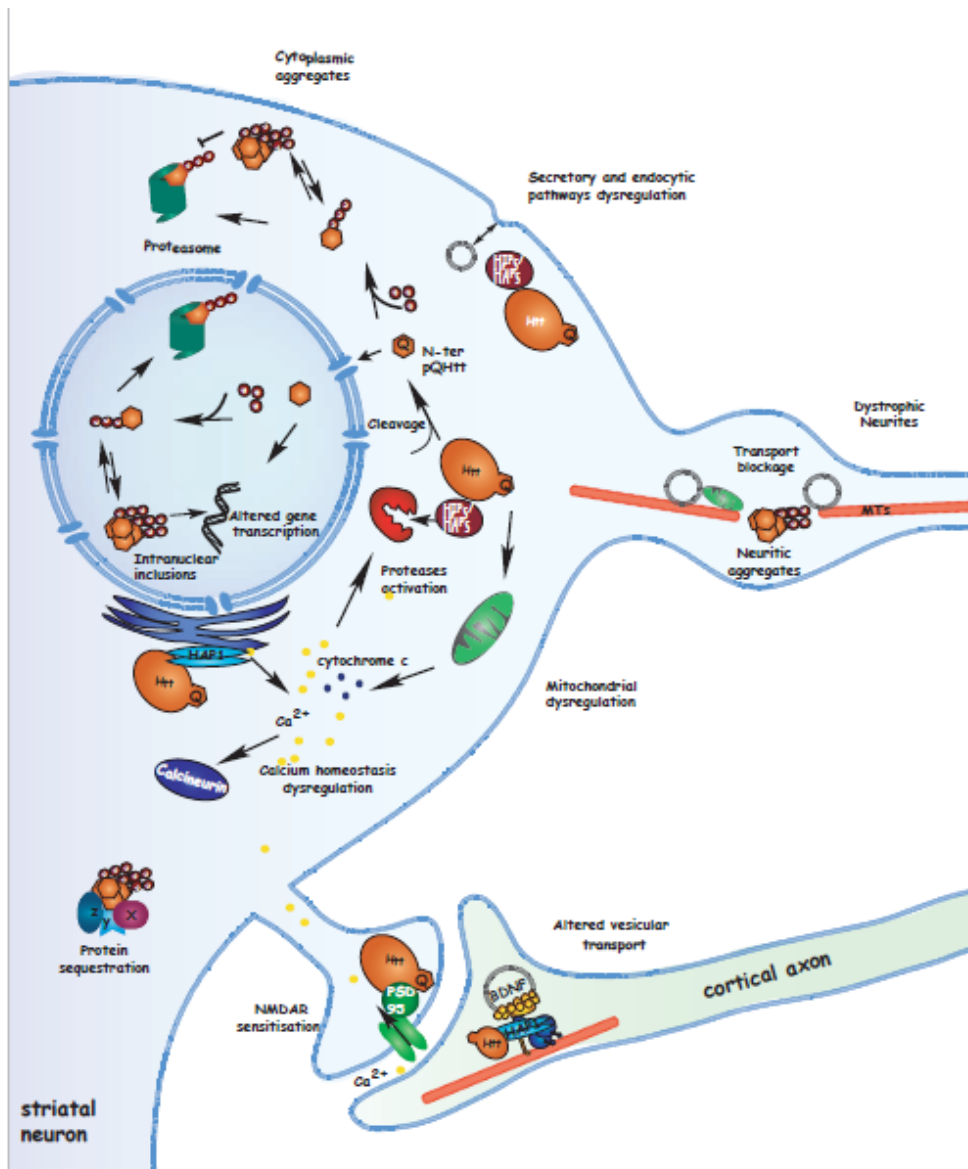


Figura N°1: La huntingtina produce varias modificaciones y defectos intracelulares al formar agregados citoplasmáticos. Altera el transporte vesicular, la homeostasis y aumenta la susceptibilidad de muerte neuronal (Borrell-Pagès, et. alt, 2006).

La repetición de los tripletes CAG normal es de 10 -26 pero en la enfermedad de Huntington se ve aumentada, mayor a 35 repeticiones. Se presenta por el deslizamiento durante la replicación del ADN, esto provoca la formación de proteínas defectuosas causando un adelgazamiento cortical y una pérdida de cuerpo estriado en el cerebro (Ventura, et. alt, 2013).

Este triplete codifica una glutamina en una región codificante, lo que da como resultado una poliglutamina dentro del gen de la huntingtina, esto provoca la formación de agregados que se pueden considerar tóxicos. Al ser una patología hereditaria se puede ver síntomas en edades tempranas en los hijos en comparación con los padres y a través de las generaciones la enfermedad aumenta. La edad promedio de pacientes que desarrollan la enfermedad es de 38 años, aunque existe un grupo minoritario que presenta síntomas de movimiento involuntario de las extremidades, rigidez o deterioro cognitivo antes de los 20 años (Boudreau, et. alt, 2009).

La repetición de aminoácidos, la presencia de poliglutaminas cerca del amino terminal de la proteína huntingtina contribuyen a la patogénesis de la enfermedad. Se presenta una disfunción de la transcripción y problemas de plegamiento de proteínas. La longitud de las repeticiones de los aminoácidos es inversamente proporcional a la edad de la aparición de la enfermedad como en la etapa juvenil que presenta más de 60 repeticiones de aminoácidos (Miller, et. alt, 2010).

La enfermedad de Huntington al ser una enfermedad neurodegenerativa que presenta pérdidas de células en los ganglios basales, especialmente en el área responsable de los movimientos motores llamada putamen. La muerte neuronal se distribuye anatómicamente en el núcleo caudado, el putamen, en las capas III, IV y VI de la corteza cerebral (McBride, et. alt, 2008).

2.2.3 Signos y síntomas

Los síntomas aparecen con más frecuencia entre las edades de 35 a 50 años de edad caracterizados por movimientos anormales e involuntarios que afectan mayormente a los miembros inferiores, movimientos voluntarios afectados por falta de coordinación retraso en el inicio de los movimientos y un deterioro progresivo e irreversible de las funciones cognitivas. Existen algunos síntomas conductuales como irritabilidad, compulsiones, alucinaciones, deterioro de memoria, disminución de las funciones (Strand, et. alt, 2007).

Otros síntomas son las alteraciones motoras incluyendo movimientos involuntarios como distonía, corea, inquietud motora y los movimientos voluntarios como la bradicinesia, falta de coordinación, retraso de los movimientos, deterioro de la modulación, entre otros (Kumar, et. alt, 2010).

Los pacientes que presentan esta patología tienen varios cambios característicos como la pérdida de peso que puede ser provocado por el bloqueo de la enzima succinato deshidrogenasa en el Ciclo de Krebs. Existe una relación directamente proporcional entre el grado de atrofia estriatal y la gravedad de las anomalías motoras y psiquiátricas. La pérdida de peso está determinada por factores primarios y secundarios. Los factores primarios son los relacionados con la disfunción neuronal y la neurodegeneración y los factores secundarios que contribuyen a la pérdida de peso como la medicación (Hernandez-Echeagaray, et. alt, 2010).

Las alteraciones en esta patología son: la excitotoxicidad, alteraciones del metabolismo energético que causa daño oxidativo y eliminación de la proteína huntingtina que provoca agregación y daño metabólico. La neurodegeneración de esta patología puede ser selectiva ya que produce una atrofia inicialmente en el cuerpo estriado, núcleo caudado y putamen, lo que produce la dilatación de los ventrículos laterales. Esta atrofia es proporcional a la gravedad de los síntomas e implica la activación de la apoptosis y la gliosis parcial (Mochel, et. alt, 2012).

Existe una lesión celular ya que existe una disminución del metabolismo energético, alteraciones en el funcionamiento mitocondrial, estrés oxidativo y neurotoxicidad. También existe una disminución de los niveles de ácido aminobutírico (GABA) y su enzima de la síntesis de glutamato descarboxilasa (GAD), la acetilcolina (ACh) y su enzima de síntesis transferasa colina-acetil (CAT) y algunos péptidos localizados en las neuronas espinosas medianas. (Mende-Mueller, et. alt, 2001).

Los cambios más significativos en el cerebro en la enfermedad de Huntington son la neurodegeneración, microgliosis y astrocitosis. Otros síntomas de esta patología incluyen pérdida de peso, cambios hormonales de apetito, alteraciones en la homeostasis de la glucosa, trastornos en el equilibrio de la energía y un ritmo circadiano interrumpido (Huang, et. alt, 2011).

El daño neuronal incluye pérdida de neuronas espinosas de tamaño medio que proyectan sustancia nigra (SN) y al globo pálido (GP). La característica neuropatológica más importante es la muerte de neuronas GABAérgicas espinosas. Otros daños se encuentran en las neuronas piramidales de las capas III, V, VI de la corteza. En cada

etapa de esta patología el daño neuronal es progresivo, se extiende a varias regiones cerebrales como el globo pálido, el núcleo subtalámico (NST) y en la etapa tardía existe degeneración del tálamo, la sustancia nigra (SN), el hipocampo, la médula espinal, entre otros. La degeneración del estriado produce el aumento de movimientos involuntarios de cabeza, cara, cuello, extremidades, movimientos lentos y rigidez. Otras áreas afectadas con la degeneración son: la corteza y produce déficit en la memoria, habilidades de realizar tareas, la corteza pre-frontal que está involucrada en procesos cognitivos complejos, la corteza orbito-frontal que produce falla en movimientos motores (Fang, et. alt,2009).

Las inclusiones en la corteza cerebral son directamente proporcionales al tamaño de la expansión de la poliQ y es inversamente proporcional a la edad de inicio de la enfermedad. Estas inclusiones se encuentran generalmente en las neuronas espinosas de tamaño medio y son escasas en el globo pálido, el cerebelo, sustancia negra, núcleo subtalámico y el hipocampo. Las inclusiones están localizadas en la superficie del núcleo. El tamaño de las lesiones en el cuerpo estriatal puede definir el patrón de locomoción, es decir que lesiones más pequeñas se relacionan con hiperactividad y lesiones más grandes se relacionan con hipo-actividad. La pérdida de neuronas se relaciona con la reducción de la actividad locomotora (Drabik, et. alt,2007).

Este proceso de muerte celular provocado por un mal funcionamiento mitocondrial se produce en los pacientes con enfermedad de Huntington como una consecuencia del mal funcionamiento del metabolismo de la glucosa. Otros daños se evidencian en el caudado, putamen y deficiencias en algunas enzimas involucradas en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y de la cadena transportadora de electrones, también se incluye una reducción en la actividad de la aconitasa y de los complejos II, III y IV. El déficit del complejo II se caracteriza por la disminución de la oxidación de los sustratos dependientes del $FADH_2$ como el succinato y en la oxidación normal de los dependientes de NADH como el malato. El bloqueo del complejo III altera la oxidación de ambos. Los déficits enzimáticos que afectan a la cadena respiratoria afectan al metabolismo celular. Al limitar el ciclo del ácido cítrico y la oxidación del piruvato, que pasa a ser metabolizado a lactato se reduce la producción de ATP (Huang, et. alt,2011).

El estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial están conectados en la enfermedad de Huntington, y esto causa un círculo vicioso de déficit de energía que termina en la neurodegeneración. El óxido nítrico (NO) es parte de la patogénesis de la enfermedad de Huntington ya que junto a su metabolito tóxico el peroxinitrito causa daño en la integridad de la membrana mitocondrial, produce disfunción mitocondrial, rotura en el ADN, peroxidación de lípidos y nitrosilación de proteínas (Sandhir, et. al, 2012).

La inflamación en el cerebro es una característica frecuente en las enfermedades neurodegenerativas ya que las células que producen las respuestas inflamatorias son los astrocitos y microglia que liberan mediadores inflamatorios como citocinas, quimiocinas y radicales reactivos libres. Las células de respuesta inmune innata microglía, macrófagos y monocitos se activan en la etapa temprana de esta patología. Al progresar la enfermedad se liberan los mediadores neurotróficos como el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado glial de la línea celular (GDNF), factores neurotróficos ciliar (CNTF) y factor beta transformador de crecimiento (TGF- β) que realizan fagocitosis en lesiones. Otros mediadores neurotóxicos en la neurodegeneración son: factor necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquina (IL), óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE-2) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La activación de estos mediadores es parte de la activación de la inflamación microglial (Strand et. al,2007).

2.2.4 Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad de Huntington depende de tres criterios: la historia familiar del paciente, la alteración motora progresiva y los trastornos psiquiátricos con demencia progresiva sin otras causas (Lim, et. al,2010).

2.2.5 Tratamientos paliativos

Las terapias paliativas para esta patología buscan identificar marcadores biológicos para monitorear la progresión de la enfermedad, los marcadores pueden ser genómicos o proteómicos (Lee, et. al,2011).

Los tratamientos para esta enfermedad dependen de la etapa en que se encuentre el paciente ya que en las primeras de ellas al no existir daño en la corea, no se presentan interferencias en la vida del paciente, pero si se encuentra en una etapa tardía los síntomas afectarían las actividades cotidianas del paciente como caminar, escribir o

alimentarse, por estas razones se comienza el tratamiento de la patología. Los tratamientos actuales para los síntomas de esta patología se centran en los síntomas como insomnio, depresión, agitación, agresividad, desnutrición, corea, entre otros (Boudreau, et. alt,2011).

Los pacientes en la actualidad se están tratando con el fármaco Tetrabencina que ayuda a reducir la corea y está aprobado por la *Food and Drug Administration of Estados Unidos* (FDA). Esta droga actúa como un transportador vesicular de monoamina inhibidor (VMAT), es decir que permite la detección metabólica temprana de la degradación de las monoaminas, especialmente la dopamina, La dopamina es transportada en vesículas sinápticas para ser almacenadas y después liberadas por exocitosis. Los medicamentos neurolépticos se pueden administrarse en las etapas tempranas para controlar los movimientos involuntarios, pero pueden tener efectos secundarios como aumento de rigidez en etapas posteriores (Díaz Hernandez, et. alt, 2003).

Estas terapias permiten retrasar la progresión de los síntomas de la enfermedad, en la actualidad, estas se están probando en modelos animales experimentales ya que se evidencia varios efectos positivos como prevenir la apoptosis al inhibir las caspasas, mejorar el metabolismo energético, inhibir la formación de agregados de poliglutamina, entre otros (Delorme, et. alt, 2012).

Las terapias farmacológicas experimentales son excitotóxicas que actúan en el bloqueo de la NMDA e inhiben las caspasas. Ejemplos de estos fármacos son:

- Riluzole: Agente antagonista del glutamato, actúa sobre los canales de sodio limitando la liberación del glutamato. El uso en modelos experimentales muestra la reducción de tamaño en la lesión estriatal y mejorar los movimientos coreicos
- Coenzima Q10: Transportador de electrones del Complejo II al III junto con una terapia con un inhibidor no competitivo de los canales NMDA.
- Memantina: Neuroprotector y bloqueador del NMDA (N-metil-D-aspartato)
- Minociclina: Antiinflamatorio e inhibidor de las caspasas y del óxido nítrico sintetasa (Inos)

- Creatina: Estabilizador de la permeabilidad de los poros de transición de la membrana mitocondrial. Su uso en modelos experimentales redujo la atrofia cerebral, la formación de inclusiones intranucleares y la N- acetilaspartato en el estriado.

Los tratamientos actuales para esta patología se centran en terapias de reemplazo y restauración de los transmisores GABAenergéticos, en la terapia neuroprotectora y en la disminución de los niveles sinápticos del neurotransmisor glutamato ya que inhibe los canales de sodio e impide la entrada de calcio (Ca^{2+}) en la neurona presináptica.(Jordan, 2003).

2.3 Modelos animales experimentales químicamente modificados

Los modelos animales experimentales que reproducen los síntomas de la enfermedad de Huntington se pueden generar a través de la inducción de químicos. (Zheng, et. alt, 2010).

Los modelos experimentales como los ratones dan una visión de los procesos fisiopatológicos de la enfermedad que se estudia, pero se debe tener en cuenta que no es un equivalente ya que los modelos experimentales están sujetos a variables como el peso, alimentación, las sustancias químicas inyectadas entre otras. (Cong, et. alt, 2012)

Los modelos experimentales de la enfermedad de Huntington permiten recrear el estrés oxidativo. La función mitocondrial, alteraciones en el transporte axonal y en la transmisión sináptica. Los ratones que se utilizan como modelos experimentales tienen aproximadamente cuatro semanas de edad ya que se encuentran en el proceso del desarrollo de nuevas conexiones inter-neuronales y son más sensibles a los neurotóxicos (Mochelet. alt, 2012).

Se evidencia en el tejido neuronal una proteólisis específica. La muerte de los modelos experimentales se da a la aberración en el desarrollo del cerebro y en la neurodegeneración. Las proteínas relacionadas en el daño oxidativo son la enolasa neuronal específica, aconitasa, proteína de choque térmico y la creatina quinasa. Los procesos relacionados con la neurodegeneración son la glicosilación, la nitración de la célula, la atrofia muscular bulbar (SBMA) y ataxia (Hipp, et. alt, 2012).

La especie de ratones más utilizada en los laboratorios de investigación es el *Mus musculus*, ya que reúnen varias características de crianza y de manipulación genética como: tamaño apropiado para la crianza y manipulación, breve periodo de gestación de 19 a 21 días con alto número de crías, duración de vida de tres años aproximadamente que permite el análisis de la enfermedad en un periodo corto y tienen un genoma muy similar a los humanos al ser mamíferos euterios. (Harper, et. alt, 2011).

Los modelos experimentales químicamente inducidos pueden dividirse en excitotóxicos directos y excitotóxicos indirectos. Los modelos excitotóxicos directos se refieren a los modelos que son tratados con glutamato o sus agonistas como el ácido glutámico en altas concentraciones tanto sea mediante inyección intraestriatal como sistémica. El ácido glutámico o glutamato es un aminoácido esencial perteneciente al grupo de los aminoácidos ácidos y es un neurotransmisor excitatorio y estimula selectiva de receptores ionotrópicos y receptores metabotrópicos. La utilización de estos químicos en los modelos experimentales permite que el tejido neuronal reciba gran cantidad de aportación glutamatérgica de las neuronas aferentes cortico-estriatales provocando una lesión celular y pueden reproducir algunas características como hiperquinesia, déficit en las capacidades motoras y déficit en el aprendizaje. Este tipo de modelos excitotóxicos fueron los primeros en utilizarse en los años de los setenta. Tiene varias limitaciones como no poder reproducir los síntomas progresivos de esta enfermedad y no poder reproducir las inclusiones intranucleares en el tejido neuronal. Entre los químicos que se utilizan en los modelos excitotóxicos indirectos que se utilizan en los modelos experimentales se encuentran el ácido quinolínico y el kainato (Túnez, et. alt, 2010).

Los modelos excitotóxicos indirectos no se producen por la inyección de compuestos agonistas del glutamato sino por la administración de toxinas mitocondriales. Estas toxinas producen aumento en la formación de lactato, una depleción en la cantidad de ATP y degeneración neuronal específica de las neuronas a causa de la disrupción del metabolismo energético de la mitocondria. Con estos modelos se pueden reproducir algunos síntomas progresivos motores de la enfermedad de Huntington. Tiene algunas limitaciones como no reproducir los agregados proteicos ya que carecen de la proteína mutada responsable de su formación. Entre los químicos que se utilizan en los modelos

excitotóxicos indirectos pueden ser el malonato, Mn²⁺- MPP, aminoxiacetato, rotetona, 3- acetil piridina y el ácido 3 nitropropiónico (3-NP) (Brouillet, et. alt, 1998).

Los resultados conductuales que provoca la administración de ácido Nitropropiónico (3 NP), a modelos animales experimentales se encuentra dividido en tres etapas:

- 1. Somnolencia
- 2. Marcha descoordinada con movimientos característicos y movimientos de balanceo.
- 3. Posición decúbito lateral y ventral

Al administrar esta neurotoxina de forma sistémica también pueden presentar una disminución en la actividad motora seguido por episodios de hiperactividad y movimientos anormales como temblores, meneo en la cabeza, vueltas descontroladas, rigidez y elevación de la cola. Si la administración del ácido nitropropiónico (3-NP) se realiza de forma sistémica, por ejemplo cada 4 días durante un mes, el modelo experimental presenta durante las dos primeras semanas un patrón hipercinético seguida por un patrón hipocinética durante las dos últimas semanas (Brambrink, et. alt, 2000).

Los modelos animales experimentales muestran varias características de la enfermedad como movimientos involuntarios que progresan a la rigidez y distonía. El deterioro de la memoria es producto de la disminución de la enzima acetilcolinesterasa en el cuerpo estriado y la corteza, estas áreas son responsables de controlar todo el movimiento del cuerpo. También presenta toxicidad cardiaca, caracterizada por una inflamación difusa de cardiomiocitos, contracción coagulativa multifocal y necrosis de banda. En una exposición crónica del ácido nitropropiónico (3-NP) se puede presentar consecuencias como trombosis auricular, mineralización cardiaca, pérdida de células, hinchazón de cardiomiocitos y necrosis. Otros resultados que se pueden evidenciar en los modelos animales experimentales son: lesiones de los ganglios basales con una inicial disminución de la actividad motora, episodios ocasionales de hiperactividad y movimientos anormales como temblor, meneo de la cabeza, vueltas, rigidez y elevación de la cola. Se evidencia un patrón hipercinético temprano durante las dos primeras semanas que es seguido por un patrón hipocinético durante las últimas dos semanas y esto es dependiente de la edad. Los modelos animales experimentales tienen una alta susceptibilidad a la isquemia cerebral y pérdida de peso por la disminución del

metabolismo de la energía después de la administración del ácido 3-nitropropiónico (Tkac, et. alt, 2012).

2.3.1 Características Ácido- 3 nitropropiónico

El Ácido 3- Nitropropiónico (3 NP) es una toxina fúngica que reproduce los síntomas de la enfermedad de Huntington en modelos animales experimentales. Es un inhibidor irreversible de succinato deshidrogenasa (SDH), que inhibe el ciclo del ácido tricarbóxico y los complejos mitocondriales II y III de la cadena de transporte de electrones. El succinato deshidrogenasa esta en el interior de la membrana mitocondrial y esta enzima es la responsable de la oxidación de succinato a fumarato en el ciclo del ácido tricarbóxico. (Misiak, et. alt, 2010).

Esta toxina es sintetizada por los hongos *Aspergillus flavus*, *Astrágalo*, *Arthrimum* y plantas como *Indigofera endecapylla*. El origen del descubrimiento de los efectos del ácido Nitropropiónico (3NP) ocurrió en China al hallar casos de envenenamiento en seres humanos por consumo de caña de azúcar ya que un grupo de niños ingirió azúcar de caña infectada con el hongo *Arthrimum* cuyo metabolismo produce ácido Nitropropiónico (3-NP), este les produjo una muerte celular en el caudado y el putamen y una astenia severa. También fue conocido como un agente tóxico causante de la encefalopatía aguda en ganado y seres humanos durante los años 1950-1960.

El ácido Nitropropiónico (3-NP) cruza la barrera hematoencefálica, esto muestra que la administración de este químico debe realizarse en forma sistémica para que se produzca una degeneración selectiva bilateral en la zona dorso lateral del tejido neuronal, pero si las dosis son muy altas en un corto tiempo, de uno a cinco días, no se puede reproducir la patología en los modelos experimentales ya que se produce una depleción total de neuronas en el área central de la inyección estriatal y solo existe daño en el centro de la lesión y el resto del tejido se encuentra normal. Para reproducir la enfermedad de Huntington se debe administrar de forma crónica en un periodo de un mes aproximadamente en dosis bajas de 10 – 12 mg/kg, ya que se podrá reproducir los movimientos hipoquinéticos, el déficit de memoria, déficit de atención y algunos síntomas de la etapa temprana de la enfermedad de Huntington. Las lesiones que se pueden observar en el tejido neuronal son una astrogliosis moderada y una disminución en la actividad citocromooxidasa (Fuentes Bello, et. alt, 2013).

El daño en el tejido neuronal en los modelos experimentales con ácido Nitropropiónico (3-NP) está sujeto a varios factores del procedimiento como el tipo de administración del químico, aguda o crónica, la concentración del químico, entre otros.

La administración sistémica del ácido Nitropropiónico (3-NP) causa degeneración selectiva del tejido neuronal. Las limitaciones del ácido Nitropropiónico (3-NP) son la variación de los movimientos anormales que presentan los modelos experimentales ya que no se asemejan mucho a los experimentados por los pacientes con la enfermedad de Huntington ya que la organización de los ganglios basales de los roedores son diferentes a los primates, entre los movimientos que no se pueden reproducir son los coreicos, hiperlocomotores, distonia y bradiquinesia. Otra limitación es la falta de lesiones estriales ya que se producen en la mayoría de los casos en forma extraestriar, en estructuras como el hipocampo, el tálamo o la sustancia negra. Estos resultados muestran que el ácido nitropropiónico (3 NP) reproduce más las características de la etapa juvenil o las últimas etapas de la enfermedad de Huntington (Lan, et. al, 2005).

2.3.2 Ácido- 3 nitropropiónico en relación con daño celular

La neurodegeneración es selectiva ya que provoca una atrofia más acusada en el cuerpo estriado, exactamente en el núcleo, caudado y putamen, provocando que exista dilatación en los ventrículos laterales. La macro-autofagia es un mecanismo de la célula que permite que los organelos y las proteínas puedan sobrevivir en una privación de nutrientes. Otros mecanismos relacionados con la muerte neuronal son la neuroinflamación y la degeneración axonal. El tejido neuronal presenta concentraciones de hierro relativamente elevado, por lo tanto en el estrés oxidativo o en la reducción del pH intracelular se produce un aumento de hierro libre debido a la oxidación y transferencia desde la ferritina y de enzimas dependientes de hierro. Esto se relaciona con los complejos mitocondriales I, II y III ya que se observa una reducción en sus actividades por contener enzimas dependientes de hierro en forma aumentada y provoca la pérdida neuronal selectiva. La pérdida de neuronas del cuerpo estriado que tienen receptores de la dopamina, D2, produce la inhibición gabérgica en la parte externa del globo pálido produciendo la desinhibición del tálamo sobre la corteza motora. (Rodríguez, et. al, 2010).

La muerte neuronal es resultado de la excitotoxicidad ya que existe una sobre-activación de receptores de aminoácidos excitadores como el glutamato y sus análogos como los receptores glutamatérgicos ionotrópicos de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), provocando una reacción tóxica por la alta permeabilidad a los iones Ca^{2+} . La sobre-activación de los receptores NMDA incrementa las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} y provoca la activación de enzimas proteolíticas calcio dependientes que ocasionan disfunción mitocondrial, alteración del metabolismo energético, formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN). En esta patología se presenta un aumento de deleciones del ADN mitocondrial en los lóbulos temporal y frontal de la corteza y un aumento en la concentración del 8hidroxi-dioxiguanosina que es un marcador de la lesión oxidativa del ADN en la corteza frontal y en el caudado. Los antioxidantes principales endógenos que actúan en el cerebro son las enzimas superóxido dismutasas y el sistema glutatión, las enzimas superóxido degradan el O_2 y generan H_2O_2 . La peroxidasa del glutatión es una enzima dependiente del selenio y glutatión reducida, esta cataliza la transformación de H_2O_2 en agua. La glutatión se oxida al regenerar la vitamina C oxidada en la regeneración de la vitamina E. La glutatión reductasa regenera la glutatión reducida. Los antioxidantes endógenos inhiben la apoptosis neuronal, y la disminución de este proceso que está relacionado con la neurodegeneración (Akashiba, et. alt, 2008).

Las ventajas del uso del ácido Nitropropiónico (3-NP) son; la reproducción de la muerte celular inducida por esta neurotoxina, permite el estudio de las alteraciones mitocondriales y el estudio de los mecanismos de daño celular como la formación de proteasas, astrogliosis, entre otros. El uso de esta neurotoxina permite ver el potencial de la respuesta terapéutica a varios fármacos (Rodríguez, et. alt, 2010).

2.3.3 Ácido- 3 nitropropiónico en relación con daño metabólico

El daño comienza través del proceso irreversible de bloquear el succinato de la enzima deshidrogenasa (SDH), disminuye los niveles de ATP y acelera la apoptosis neuronal. Esta sustancia fúngica induce el estrés oxidativo, la neuroinflamación y la excitotoxicidad que son características en la enfermedad de Huntington. El proceso del daño celular comienza por el alto consumo de oxígeno (O_2) para generar el ATP faltante que necesita el tejido neuronal para mantener su funcionamiento. También existe

alteración en la función mitocondrial, la fosforilación oxidativa y la glucólisis. El aumento de una proteasa de Ca_2 , la calpaina provoca también la muerte celular. Este químico que actúa como inhibidor crónico e irreversible de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa del complejo respiratorio II del ciclo de Krebs, localizada en la membrana interna de la mitocondria y responsable de la oxidación de succinato a fumarato. La energía liberada en estas reacciones se utiliza para bombear protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana generando un gradiente de pH a través de la membrana mitocondrial interna, que se emplea en la producción de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. La disrupción de la actividad mitocondrial está asociada a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como radicales superóxido, radicales hidroxilo y peróxidos de hidrógeno que dañan la membrana celular y el ADN. Las especies reactivas del oxígeno (ERO), son moléculas generadas principalmente en la mitocondria durante el transporte de electrones en la cadena de fosforilación oxidativa, que antes de convertir el oxígeno en agua, originan los radicales superóxido (O_2), hidroxilo (OH) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La producción de radicales libres es responsable del consumo del 2% del oxígeno usado en la respiración. Las especies reactivas del oxígeno (ERO) pueden generar reacciones en cadena con proteínas, lípidos de membrana, ácidos nucleicos y alterar su función. Las alteraciones que se producen se denominan estrés oxidativo. Aunque el estrés oxidativo es parte del metabolismo aeróbico normal y forma especies de oxígeno (ROS), puede haber una oxidación de los residuos derivados de cadenas laterales de aminoácidos (Klivenyi, et. alt, 2000).

El ácido Nitropropiónico (3-NP) no puede reproducir la liberación de glutamato en el cuerpo estriado. El mecanismo de acción de esta toxina implica la inhibición del complejo II (succinato deshidrogenasa (SDH) en la cadena de transporte de electrones, La SDH es una enzima situada en el interior de la membrana mitocondrial y permite la oxidación de succinato a fumarato. Al ser esta enzima bloqueada de forma irreversible por el ácido Nitropropiónico (3 NP), los niveles de ATP disminuye y se observan procesos de muerte celular (Gyung et. alt, 2002).

El ácido 3 nitropropiónico (3-NP) inhibe: el succinato deshidrogenasa (SDH), el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) y el complejo mitocondrial II y III de la cadena de transporte de electrones.

Los mecanismos directamente afectados por la administración del ácido Nitropropiónico (3 NP) son: la reducción de los niveles de ATP, aumento de los niveles de lactato provocado por el metabolismo energético alterado, excitotoxicidad por el cambio de la homeostasis de Ca^{2+} y todo esto desencadena en la muerte celular neuronal. El ácido 3 nitropropiónico en general provoca la pérdida de ATP, por la inhibición de los complejos mitocondriales, causando la disminución de la energía en las regiones cerebrales y alterando el almacenamiento de memoria en las diferentes partes del cerebro, especialmente en el hipocampo. La neurotoxicidad del ácido nitropropiónico (3-NP), se atribuye principalmente a la producción de especies reactivas oxidativas (ROS) durante la falta de ATP. Otros efectos del ácido nitropropiónico (3-NP) son los efectos cardiotóxicos ya que existe inhibición del succinato deshidrogenasa en las mitocondrias del corazón. Los daños producidos en el cerebro y el corazón son ocasionados porque los dos órganos tienen una dependencia de la función mitocondrial y el metabolismo oxidativo para la producción de ATP, estos procesos están alterados por la administración de esta neurotoxina (Lan, et. alt, 2005).

2.4 ARN de interferencia

El silenciamiento de los genes realizado por el ARNi se demostró por primera ocasión en 1998 por Andrew Fire. El ARNi es un proceso biológico que se está probando como una terapia potencial ya que podría bloquear o “silenciar” la expresión de un gen. Los estudios realizados para probar esta terapia se lo está realizando en modelos experimentales como ratones que mostraron un funcionamiento de coordinación motora mejorada y una mayor supervivencia. Se clasifica en dos categorías, según a los genes que silencian. La primera categoría incluye al ARNi que silencian genes que causan daño al organismo, pueden ser genes virales, mutados o resultantes de translocaciones cromosómicas. Estos ARNi tienen una aplicación terapéutica. La segunda categoría incluye al ARNi que silencia genes endógenos que indican su funcionamiento en el organismo (Nakamura López, et. alt, 2009).

El ARNi media la resistencia de ácidos nucleicos patógenos y la regulación de la expresión de genes. Al ser un mecanismo biológico presente en seres vivos, puede ser utilizado como un nuevo tratamiento específico para la inhibición de la expresión de genes que provocan enfermedades. Los mecanismos de acción del ARNi son la remodelación de la cromatina, inhibición y degradación del ARN mitocondrial

específico de un gen. El proceso que utiliza el ARNi para introducirlo en las células comienza con el uso de vectores de ADN, este genera ARN de pequeña interferencia (siARNs) en forma constante y es controlado por un promotor del tejido específico que se va a tratar. Los promotores generan una secuencia para el ARN polimerasa III, que genera ARNs pequeños y despega en la secuencia de ADN al encontrar una cola de poliT. El tratamiento potencial para la enfermedad de Huntington podría ser la supresión de la producción de la proteína ampliado en las regiones afectadas del cerebro a través de la interferencia de ARN (ARNi) (DiFiglia, et. alt, 2007).

2.4.1 Potencial Terapéutico

La función del ARNi se produce de forma natural en las células ya que es un mecanismo de regulación postranscripcional mediada por ARNi endógeno. La aplicación del ARNi en modelos experimentales animales con la enfermedad de Huntington como los ratones permiten ver mejoras en rendimiento y en el funcionamiento de las extremidades traseras del ratón, la falta de funcionamiento de estas partes es un indicador del deterioro neurológico del modelo experimental (Harper, et. alt, 2005).

El potencial terapéutico del ARNi radica en proporcionar un mecanismo de defensa celular para disminuir diferentes elementos patógenos. Se utiliza ARN artificiales aplicados de forma exógena. El alcance terapéutico del silenciamiento de la expresión se ha demostrado en modelos experimentales animales como el ratón que fue tratado con tetraciclina para que se exprese el gen de huntingtina, este gen provocó que se expresaran los síntomas característicos de la enfermedad como las inclusiones neuronales que muestran la neuropatía de esta patología y movimientos motores anormales. El tratamiento con ARNi permitiría la eliminación de la proteína huntingtina dentro de las neuronas. Otra opción es inducir la enfermedad de Huntington a través de fármacos (Nakamura López, et. alt, 2009).

El mecanismo del ARNi se basa en bloquear o “silenciar” selectivamente el alelo que contiene la repetición de los trinucleótidos CAG expandida y exactamente en el exón del gen de Huntingtina ya que en un paciente con esta patología tiene un alelo normal y un alelo mutante causante de la enfermedad. El ARNi podría discriminar los cambios de un solo polimorfismo nucleótido (SNP) y así acoplarse correctamente en el alelo de la enfermedad, reducir la expresión a través de la unión de las isoformas del

polimorfismo del nucleótido. Esto nos daría bases para crear ARNi individuales para cada paciente (DiFiglia, et. alt, 2007).

El empleo del ARNi como: un tratamiento habitual en el futuro se encuentra sujeto a varios procesos como: el procesamiento en tejido blanco, la estabilidad, vida media y la determinación de los métodos adecuados para la aplicación en tejidos específicos. Las terapias basadas en ARNi dependen de múltiples factores como la protección del mismo, una transfección eficaz y eficiente al evitar efectos tóxicos (Boudreau, et. alt, 2011).

Para la transfección del ARNi se utiliza la invivofectamina junto con la proconvertina.

La Invivofectamina es un lípido de origen animal libre basada en un reactivo de transfección de ARNi, es ideal para la inyección en el animal y para evitar una respuesta de estrés y una baja toxicidad.(Technologies, 2011)

El Ambion In Vivo Factor VII siRNA también conocido como proconvertina es una serin proteasa dependiente de vitamina K y es la proteína central en la cascada de coagulación. El factor VII es sintetizado exclusivamente en el hígado, secretado en el plasma donde circula en una forma inactiva y es utilizada para el silenciamiento de siRNA. Las características de este factor son la especificidad, estabilidad, no es tóxico o inmunogénico.(Technology, et, alt 2010)

2.4.2 Aplicación a la terapia genética

El ARNi produce la disminución o la detención de la enfermedad produciendo efectos secundarios. Ayuda a mejorar las anomalías patológicas y de comportamiento de los modelos animales experimentales, por esto se puede utilizar como posible tratamiento para la enfermedad de Huntington (Boudreau, et. alt, 2011).

2.5 Proteína ácida glialfibrilar (GFAP)

La proteína ácida fibrilar glial (GFAP) es una proteína de 51-kD que se expresa en astrocitos y células epindimarias normales, reactivas y neoplásicas.

Es una proteína de filamentos intermedios y es un componente importante del citoesqueleto. Permite la integridad celular, la resistencia y es la proteína principal de filamentos intermedios en los astrocitos maduros a más de ser un componente importante del citoesqueleto en astrocitos durante el desarrollo. Esta proteína es la principal en el cerebro adulto y es característica en los astrocitos maduros. Tiene ocho diferentes isoformas. El marcador de célula glial fibrilar ácida glial proteica (GFAP) indica la muerte celular neuronal. Se encuentra disminuida por la toxicidad del ácido Nitropropiónico (3-NP). También existe una inmunoreactividad, aumento de células apoptóticas, inducción de liberación de citocromos c, activación de la apoptosis y elevación de lactato deshidrogenasa (LDH) (Middeldorp et. alt, 2011).

2.5.1 Características

Esta proteína está involucrada en las funciones de los astrocitos, que son importantes en la regeneración, plasticidad sináptica y gliosis reactiva. Es un marcador de astrocitos que está presente en el daño cerebral o durante la degeneración del sistema nervioso central. Fue descubierta en el cerebro de los pacientes con esclerosis múltiple (EM). Se clasifica como una proteína tipo III del sistema nervioso central (Mamber, et. alt, 2012).

Esta proteína se expresa por la inducción de varios factores como la lesión cerebral y la enfermedad. La expresión inicial de esta proteína en el cerebro en desarrollo se inicia en la glía radial, células bipolares en la zona ventricular. Los daños que se puedan presentar en el sistema nervioso central como daños mecánicos activan la expresión de la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) y formación de una cicatriz glial. La mayor expresión de la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) se da por la hipertrofia celular de los astrocitos en respuesta a la neurodegeneración, isquemia o trauma causada por patologías del sistema nervioso central como la enfermedad de Huntington (Mamber, et. alt, 2012).

2.5.2 Función

La función de esta proteína es la resistencia mecánica y el mantenimiento de la forma de las células. Otras funciones además son: inducción y la regulación de la barrera hematoencefálica, protección de las neuronas contra los excesos de neurotransmisores, promover la plasticidad sináptica, formación de sinapsis, coordinación de la actividad neuronal a través de la comunicación directa con neuronas, homeostasis sináptica de los neurotransmisores y los iones (Middeldorp et. alt, 2011).

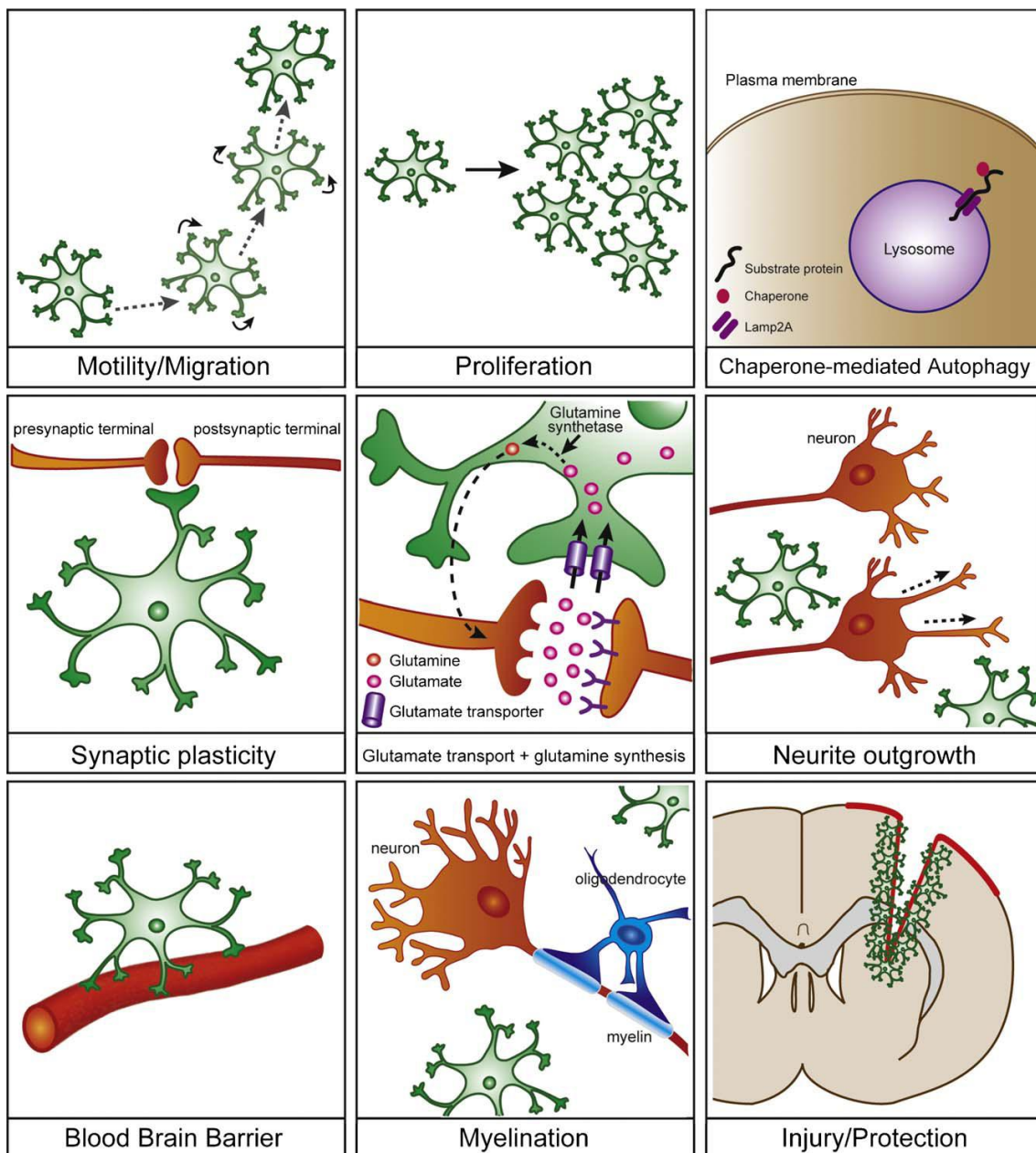


Figura N°2: Revisión de los procesos celulares en el cerebro, en el que la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) desempeña una función. (Middeldorp et. alt, 2011)

2.5.3 Interacción con astrocitos y neuronas

Las células gliales microglia y astrocitos tienen un papel doble en la patogénesis. El aumento de la expresión de la proteína ácida fibrilar glial en el cuerpo estriado se da por la neurotoxicidad del ácido nitropropiónico (3-NP).

El ácido nitropropiónico (3-NP) afecta a los astrocitos al aumentar la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Esta neurotoxina tiene un uso farmacológico en los modelos animales experimentales ya que reproduce el fenotipo de la degeneración estriatal por las modificaciones metabólicas (Kumar, et. al., 2010).

2.6 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida

La electroforesis fue definida por primera vez en 1907 por Michaelis como un fenómeno por el cual una molécula con carga neta se desplaza en respuesta a la aplicación de un campo eléctrico que depende de factores como: la intensidad del campo, la carga neta, tamaño y forma de las moléculas, fuerza iónica, viscosidad y temperatura del medio en el cual las moléculas se mueven (Maldonado, et. al., 2013).

Fue realizada por primera vez en 1937 por Tiselius, en 1959 Raymond y Weintraub utilizaron como soporte el gel de poliacrilamida. Con el pasar de los años esta técnica fue perfeccionada por varios investigadores como Davis y Ornstein.

Es considerada una técnica analítica simple, rápida y muy sensible para la separación y el estudio de moléculas cargadas como son las proteínas. También se puede conocer características ácido básico, peso molecular, punto isoelectrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas (García; et. al., 2000).

Los geles de poliacrilamida tienen una buena resolución ya que tienen varias ventajas como ser químicamente inertes, estables en un rango de pH, temperatura y fuerza iónica y fácil de realizar con la polimerización de la acrilamida. La versatilidad de este gel se centra en que se puede preparar una amplia variedad de los tamaños de poros, esto permite que las proteínas de diferentes tamaños puedan migrar. El gel se pone entre dos receptáculos independientes y separados que contienen un tampón de electroforesis y los electrodos positivo y negativo. Al terminar la electroforesis el gel se puede teñir, documentar o purificar la molécula al cortar el fragmento del gel. La

detección de las moléculas es a través de bandas en diferentes posiciones en el gel (Maldonado, et. alt, 2013).

2.6.1 Generalidades de Electroforesis

La reacción de polimerización en los geles de poliacrilamida se genera mediante la polimerización a través de los radicales libre de los monómeros de acrilamida en presencia de pequeñas cantidades de bisacrilamida al formar enlaces cruzados con los polímeros de acrilamida generando geles con un tamaño de poro directamente proporcional a la concentración de acrilamida. La relación de acrilamida y bisacrilamida es generalmente de 37,5 a 1. La reacción de polimerización se inicia por el sistema redox de catálisis ya que el TEMED cataliza la formación de radicales libres que dirige la reacción a partir del persulfato de amonio que actúa como iniciador.

Existen dos sistemas de electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida:

- El sistema continuo que utiliza solo un gel separador que emplea el mismo tampón en los tanques y en el gel.

- El sistema discontinuo que consta de dos geles: un gel concentrador con un tamaño de poro no restrictivo y un gel separador. Se utiliza diferentes tampones con diferente pH y fuerza iónica (Maldonado, et. alt, 2013).

Los geles pueden ser de varios tamaños según la distancia de separación y la cantidad de muestra. Los geles de placa vertical se proyectan entre un par de placas de vidrio separadas por una tira espaciadora formando una caja hermética. Su grosor puede ser desde 0,05 mm a 5 mm de espesor (García; et. alt, 2000).

2.6.2 Cuantificación de Proteína ácida glialfibrilar (GFAP)

Los protocolos para el análisis de las proteínas deben evitar la degradación y desfosforilación de las mismas ya que los resultados saldrían alterados, Otros elementos que deben evitarse en las muestras son los lípidos ya que reducen la solubilidad de las proteínas por la formación de complejos, por esto se utiliza el tween o el dodecil sulfato de sodio (SDS). Las proteínas tienen en su contenido mayormente albúminas, inmunoglobulinas, inhibidores de la proteasa serina, proteínas del citoesqueleto, entre otras. El valor diagnóstico potencial de algunas proteínas se encuentran representado en niveles bajos 10 -1000 fmol/ml (Cultex, 2009).

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDIO

El tipo de estudio de ésta investigación es experimental descriptiva y de ensayo de laboratorio ya que el investigador eligió a los modelos experimentales químicamente modificados, ratones, como factor de estudio. Se le considera inter-sujeto ya que se estudiará a cada modelo experimental químicamente modificado. También se le considera unifactorial ya que se va a estudiar un factor que es el potencial terapéutico del ARN de interferencia de forma indirecta.

3.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO Y MUESTRA

La población aproximada de ratones de laboratorio son diecinueve.

Clase: Mammalia

Familia: Muridae

Género: Mus

Especie: *Mus musculus*.

Los ratones de laboratorio pertenecen a una especie cosmopolita adaptable a cualquier ambiente. Son mamíferos de sangre caliente y de pequeños tamaños aproximadamente de 12 a 15 cm desde la punta de la nariz a la punta de la cola y con un peso aproximado de 30 gramos. Tienen una vida útil de 10 a 12 meses. Son susceptibles a cambios de temperatura entre 2 a 3 °C deben estar libre de toda evidencia de enfermedades infecciosas o que sean transmisibles para el hombre como:

- Infecciones por *Salmonella* y *Shigella*.
- *Mycobacterium tuberculosis*.
- *Yersiniapseudotuberculosis*.
- *Leptospiraspp*.
- Dermatofitos.
- *Sarcoptes scabiei*.
- Virus de la coriomeningitis linfocitaria (Fuentes, et. al, 2008)

3.2.1 Criterios de inclusión

- Modelos experimentales que sean inyectados correctamente con el químico 3 NP (Ácido 3- Nitropropiónico).

- Modelos experimentales que acepten la inyección del químico 3 NP (Ácido 3- Nitropropiónico) y no mueran inmediatamente.

- Modelos experimentales que reproduzcan los síntomas de la enfermedad de Huntington y presenten daño cerebral.

3.2.2 Criterios de exclusión

- Modelos experimentales no inyectados correctamente.

- Modelos experimentales que no presenten cambios en el desarrollo del experimento.

- Modelos experimentales que mueran inmediatamente después de la inyección con 3 NP (Ácido 3- Nitropropiónico).

3.3 METODOLOGÍA DEL ESTUDIO

1. En la primera etapa de la investigación se realizó la adaptación y procedimientos de cuidado de los modelos animales experimentales desde su adquisición hasta su uso.
2. La segunda etapa de investigación se realizó la aplicación y la administración del químico 3-NP (Ácido nitropropiónico) en los modelos animales experimentales en el periodo de un mes de forma sistemática.
3. La tercera etapa consistió en la preparación del ARNi.
4. La cuarta etapa comienza con la inyección de ARNi a los modelos animales experimentales químicamente modificados.
5. La quinta etapa consistió en la perfusión de los modelos animales experimentales y la extracción del cerebro una semana después de terminar las inyecciones de los químicos.
6. La sexta etapa de la investigación se trató del análisis de los cerebros a través de la técnica de electroforesis de proteínas.
7. La séptima etapa fue el análisis de los datos por medio de los análisis estadísticos como: la T de Student para establecer una relación de dependencia

entre los valores de los pesos de los modelos experimentales. El ANOVA para establecer a través de una regresión simple relacionar los valores de los pesos de los modelos animales experimentales en los diferentes días y el Chi cuadrado para demostrar la relación de independencia entre las variables del ácido Nitropropiónico (3-NP) y el ARN de interferencia (ARNi).

3.4 TAMAÑO DE MUESTRA

Se realizó el estudio de todos los modelos experimentales, ratones de especie *Mus musculus* que sean inoculados con Ácido Nitropropiónico (3-NP) obtenidas del proyecto de investigación J13130 " Identificación del potencial terapéutico del ARN de interferencia en la enfermedad de Huntington mediante modelos animales experimentales" de la Escuela de Bioanálisis en el año 2013"

Datos		
N	20	Tamaño conocido de la población
z	1.96	Nivel de confianza (>95%)
e	0.05	Porcentaje de error
p	0.5	Variable positiva
q	0.5	Variable negativa

$$n = \frac{N}{1 + \frac{e^2(N-1)}{z^2pq}}$$

$$n = \frac{20}{1 + \frac{(0.05^2)*(30-1)}{(1.96^2)*(0.5)*(0.5)}} n = n = 18.59n$$

$$= 19 \text{ modelos experimentales}$$

Se utiliza un muestreo no probabilístico ya que se toma las muestras de una investigación, no se realizará una generalización de datos y se elegirá cuidadosamente y en forma controlada los casos según los criterios de inclusión y exclusión La estimación de la confiabilidad de los datos de la investigación se lo realiza a través del método alfa de Cronbach con un coeficiente de 0,7 y se correlaciona los valores estadísticos obtenidos.

3.5 EQUIPOS Y MATERIALES

REACTIVOS	
DETALLE	MARCA
Ácido 3-Nitropropiónico (3 NP)	SIGMA
Silencer® Pre-Designed siRNA	AMBION
Antibody Diluent x 250mL	LIFE TECHNOLOGIES
PBS - Phosphate-Buffered Saline 12 x 1 L	LIFE TEHNOLOGIES
RNA LATER SOLUTION x 100mL	AMBION
Invivofectamine® 2.0, Starter Kit x 1mL	INVITROGEN
Anastesia (Ketamina y Xilocina)	VADEMECUM
Ultra PureTEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)	LIFE TECHNOLOGIES
Ammonium Persulfate Molecular Biology Grade	PROMEGA
Tris Base Molecular Biology Grade	PROMEGA
Acrylamide Molecular Biology Grade	PROMEGA
Bisacrilamida Molecular Biology Grade	PROMEGA
Agarosa	PROMEGA
Etanol Absoluto	-----

EQUIPOS		
DETALLE	MARCA	MODELO
JUEGO DE 4 PIPETAS (0.5-10µL, 2-20µL, 20-200µL, 100-1000µL)	LABNET	BIOPETTE A
Plato Caliente Y Agitación Magnética Digital Rango De Temperatura:5° - 550°C Rango De Velocidad:60 - 1150 Rpm	CORNING	Pc-420d
Vortex Mixer, 3.400 Rpm. Rango De Velocidad : 0 - 3.400 Rpm Modos De Funcionamiento:Continuo O Touch Dimensiones:14 X 16 X 13 Cm	LABNET	-----
Mini centrífuga Con 2 Rotores, 6000 Rpm	LABNET	Spectrafuge Mini

Cabina de bioseguridad Bio2A Cabina clase II tipo A2 Dimensiones:1380x795x1450mm	BIOAIR	Topsafe 1.2
Enduro Electrophoresis System Vertical Gel Electrophoresis	SYSTEM	-----

OTROS MATERIALES	
DETALLE	MARCA
Puntas Amarillas 200 uLPk/1000	CORNING
Puntas Azules 1000 uL RACKS. Cs/1000	AXYGEN
Puntas Amarillas 200 uL. Pk/1000	CORNING
Guardián Rojo, 1.4Litros.	HEATHROW
Jaulas para ratones	-----
Kit de Disección	-----
Jeringuillas de 5 ml y 10 ml	-----

3.6 PROCEDIMIENTOS

3.6.1 Manejo de Modelos Animales Experimentales

El modelo experimental es una especie animal mantenido bajo determinadas condiciones controladas. Es usado como un instrumento de experimentación científica para pruebas de laboratorio con el objetivo de generación de datos. Por esta razón se debe proveer condiciones ambientales y de manejo óptimo para asegurar la salud y la comodidad de los mismos. Las condiciones que se deben cumplir para un adecuado manejo están descritas en el Anexo 4.6.14.

3.6.2 Aplicación y administración del químico 3-NP (Ácido Nitropropiónico)

El químico ácido Nitropropiónico (3-NP) está listo para su uso. La administración del reactivo se realizó en dosis bajas, 12 mg/kg, mediante tres inyecciones que se realizó en el transcurso de quince días para evidenciar un daño selectivo del cerebro y se evita un daño diseminado. El procedimiento esta descrito en el Anexo 4.6.15 (Puneet, et,alt 2010).

Las tres dosis fueron administradas según el peso de cada modelo animal experimental como se demuestra en las siguientes tablas:

Tabla N° 1: 1° Inoculación con Ácido 3 Nitropropiónico

Ratones inoculados con Ácido 3 Nitropropiónico			
Peso Comida: 20.81 gramos			
Fecha 1° Inoculación	N° de Ratón	Peso (kg)	Dosis 3 NP (ul)
09/07/2013	1	0.01944	233.28
09/07/2013	2	0.01906	228.72
09/07/2013	3	0.02351	282.12
09/07/2013	4	0.02392	287.04
09/07/2013	5	0.02170	260.4
09/07/2013	6	0.02527	303.24
09/07/2013	7	0.02695	323.40
09/07/2013	8	0.02807	336.84
09/07/2013	9	0.02378	285.36
09/07/2013	10	0.02585	310.20

Tabla N° 2: 2° Inoculación con Ácido 3 Nitropropiónico

Ratones inoculados con Ácido 3 Nitropropiónico			
Peso Comida: 20.81 gramos			
Fecha 2° Inoculación	N° de Ratón	Peso (kg)	Dosis 3 NP (ul)
12/07/2013	1	0.01855	222.60
12/07/2013	2	0.01843	221.16
12/07/2013	3	0.02331	279.72
12/07/2013	4	0.02146	257.52
12/07/2013	5	0.01983	237.96
12/07/2013	6	0.02340	280.80
12/07/2013	7	0.02756	330.72
12/07/2013	8	0.02720	326.40
12/07/2013	9	0.02305	276.60
12/07/2013	10	0.02569	308.28

Tabla N° 3: 3° Inoculación con Ácido 3 Nitropropiónico

Ratones inoculados con Ácido 3 Nitropropiónico			
Peso Comida: 20.81 gramos			
Fecha 3° Inoculación	N° de Ratón	Peso (kg)	Dosis 3 NP (ul)
16/07/2013	1	0.01791	214
16/07/2013	2	0.01867	228
16/07/2013	3	0.02148	252
15/07/2013	4	-----	-----
16/07/2013	5	0.02156	264
15/07/2013	6	-----	-----
16/07/2013	7	0.02270	276
15/07/2013	8	-----	-----
15/07/2013	9	-----	-----
15/07/2013	10	-----	-----
---- : Ratones que murieron en antes de la tercera dosis			

3.6.3 Perfusión de modelos animales experimentales y extracción de cerebro

Los modelos animales experimentales son anestesiados con una combinación de xilocina y ketamina según el peso de cada ratón. La combinación de anestésicos de ketamina y xilocina induce a los modelos animales experimentales a un efecto sedante y relajante, se aplica a través de la vía intraperitoneal. El procedimiento está descrito en el Anexo 4.6.16 (Lan, et, alt 2005).

3.6.4 Preparación del ARN de interferencia (ARNi) en Invivofectamina

La combinación del Factor VII siRNA resuspendido en Invivofectamina permite obtener la solución madre de siRNA (ARN de interferencia). (Technology, 2011)

La cantidad de sustancia madre de siRNA (ARN de interferencia) fue de 2000 ul. Los cálculos se indican en el Anexo 4.6.17. Los volúmenes de las soluciones para la inyección de ARN de interferencia son las siguientes:

Tabla N° 4: Volumen de soluciones de ARNi

N° Ratones	Concentración ARNi	Volumen Ambion® siRNA FVII ul	Volumen Buffer compleción ul	Volumen Final ul	Volumen Invivofectamina ul
1	1.5	50.67	200	250	250
2	1.5	50.67	200	250	250
3	7.4	25.33	224.665	250	250
4	7.4	25.33	224.665	250	250
5	14.8	12.66	237.33	250	250
6	14.8	12.66	237.33	250	250
7	74.0	2.53	247.47	250	250
8	74.0	2.53	247.7	250	250

3.6.5 Inyección con ARN de interferencia a los modelos animales químicamente modificados

Para la aplicación en los modelos animales experimentales se realizó una inyección peritoneal, es decir que se inserto en el cuadrante izquierdo inferior del abdomen y se introdujo en la cavidad peritoneal. La dosis corresponde a 7 mg/ kg de peso para comenzar el ensayo. Esta dosis corresponde a 10 ul por gramo de peso del modelo animal experimental. Los ratones que se inocularon fueron ocho.

Se realizó una dosis y después de un mes se realizó la perfusión del modelo animal experimental.

Tabla N° 5: Inoculación con Ácido 3- Nitropropiónico y ARN de interferencia

Fecha	N° Ratones	Inoculado	Concentración ARNi	Pesos (Kg)	Dosis (10 ul/g)
04/10/2013	1	3NP	1.5	0.02797	279.10
04/10/2013	2	3NP	1.5	0.02700	270.0
04/10/2013	3	3NP	1.5	0.02913	291.3
04/10/2013	4	3NP	1.5	0.02746	274.6
04/10/2013	5	3NP	7.4	0.03033	303.3
04/10/2013	6	3NP	7.4	0.02998	299.8
04/10/2013	7	3NP	7.4	0.03158	315.8
04/10/2013	8	3NP	7.4	0.02913	291.3
04/10/2013	9	Control		0.03508	350.8
04/10/2013	10	Muerto	Utilizado	para	control

3.6.6 Electroforesis con gel denaturalizante (SDSPAGE)

Esta técnica comprende varias fases: preparación del sistema de electroblotting, ensamble del sistema de electroblotting, selección del Gel, preparación del gel, preparación de la proteína para la carga del gel, carga de las proteínas y funcionamiento del gel, descritas en el Anexo 4.6.18

3.7 ASPECTOS ÉTICOS

Los Principios Éticos Internacionales para la Investigación Biomédica con Animales establecidos por la CIOMS (*Council for International Organizations of Medical Sciences*) establece varios principios éticos entre ellos están:

- Realizar los experimentos con animales después de estudiar su importancia para la salud humana y animal y que implique un avance del conocimiento biológico
- Usar el mínimo número requerido para obtener resultados que tengan una significancia científica válida
- Minimizar las molestias, dolor o angustia de los animales y tratarlos como seres sensibles y darles un cuidado adecuado.
- No realizar procedimientos quirúrgicos en animales no anestesiados o paralizados con agentes químicos
- Realizar eutanasia a animales que puedan sufrir dolor crónico o severo, angustia, molestia o invalidez.
- Los investigadores deben tener un entrenamiento adecuado para el manejo correcto de los animales.

Uno de los principios éticos más importantes son el uso de métodos alternativos (3R's), es decir reemplazo, reducción y refinamiento. Este principio se basa en buscar técnicas que sean alternativas de experimentación con animales vivos.

Los métodos de reducción son los que obtienen niveles comparables de información con el uso de pocos animales en las investigaciones científicas. Los métodos de reemplazo se centran en la sustitución de especies por otras en menor estado de desarrollo según una escala filogenética por ejemplo usar invertebrados en vez de mamíferos. Los métodos de refinamiento son los que minimizan el dolor potencial para mantener el bienestar del animal (Osorio, 2006).

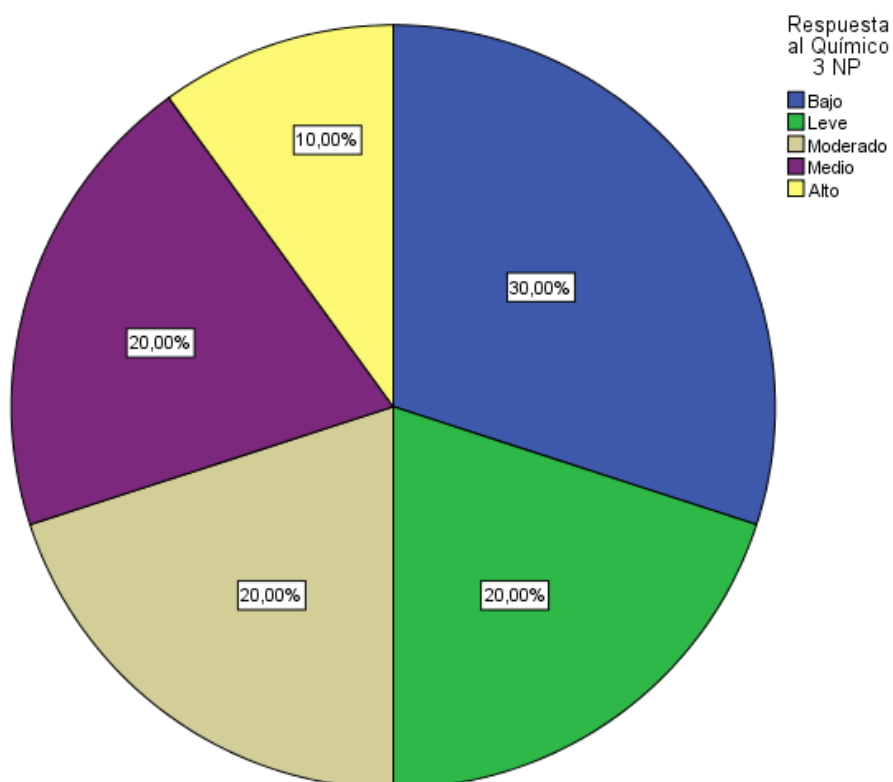
CAPITULO IV

4.1 RESULTADOS

La investigación se dividió en dos grupos de modelos animales experimentales: el primer grupo fue inoculado con ácido 3- Nitropropiónico (3-NP). El segundo grupo fue inoculado con ácido 3- Nitropropiónico y tratado con ARN de interferencia (ARNi).

El registro de todos los datos generados por los modelos animales experimentales y de los resultados se describen en el anexo N° 19, que incluye identificación del modelo experimental, número de dosis, descripción de los movimientos y características de cada uno y sus respectivas observaciones.

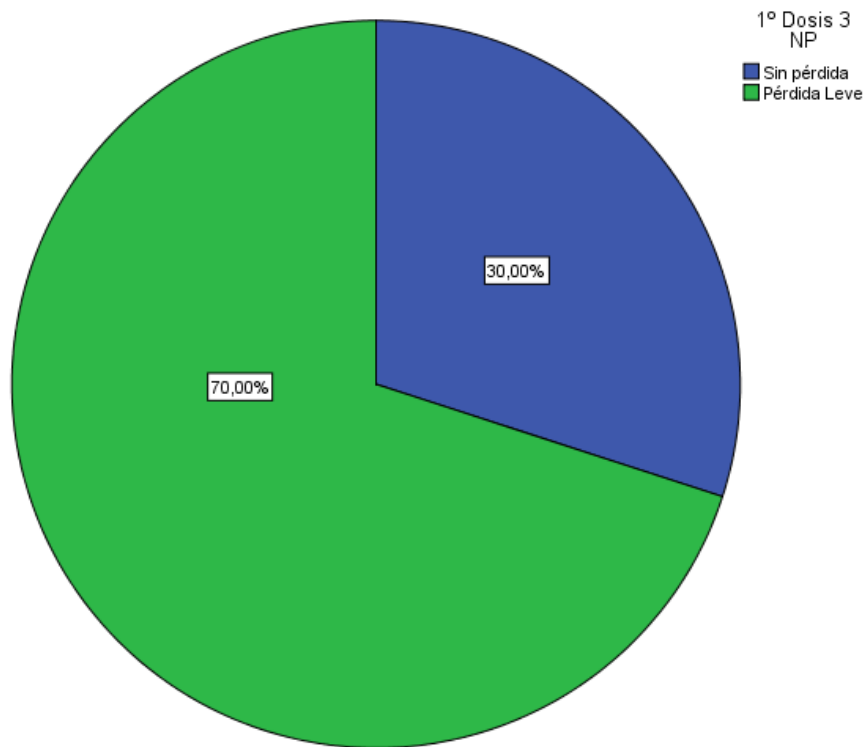
El primer grupo de modelos animales experimentales presentaron una respuesta al químico ácido 3 Nitropropiónico con un 10% alto, 20% medio, moderado y alto y un 30% bajo.



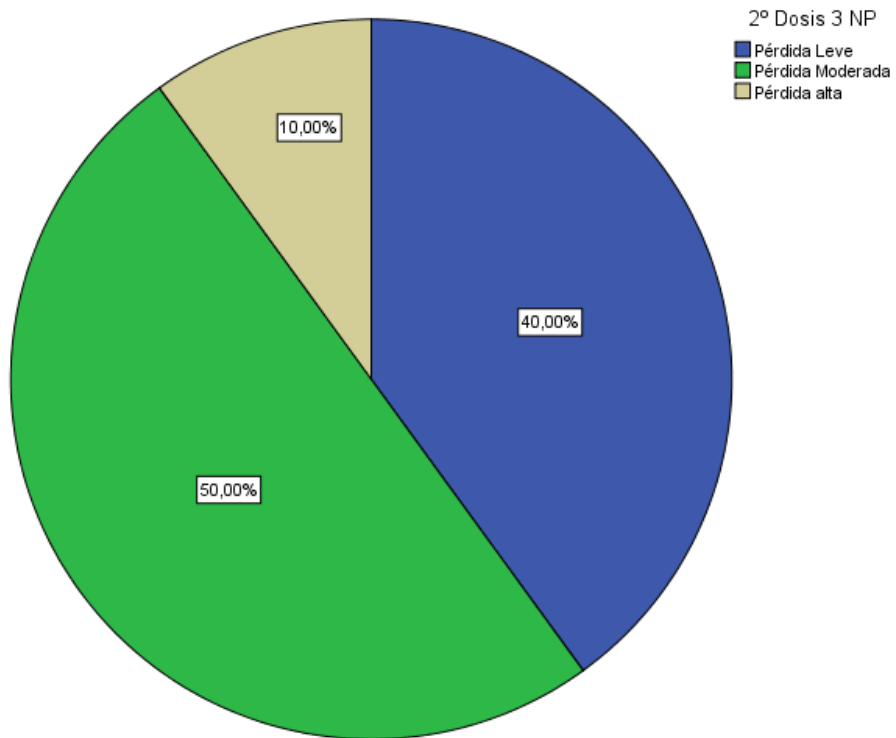
GráficoN°1: Respuesta de modelos experimentales al 3-NP

La característica de pérdida de movilidad en los modelos animales experimentales con 3 -NP indican que en la 1° dosis existe una pérdida leve del 70%, en la segunda

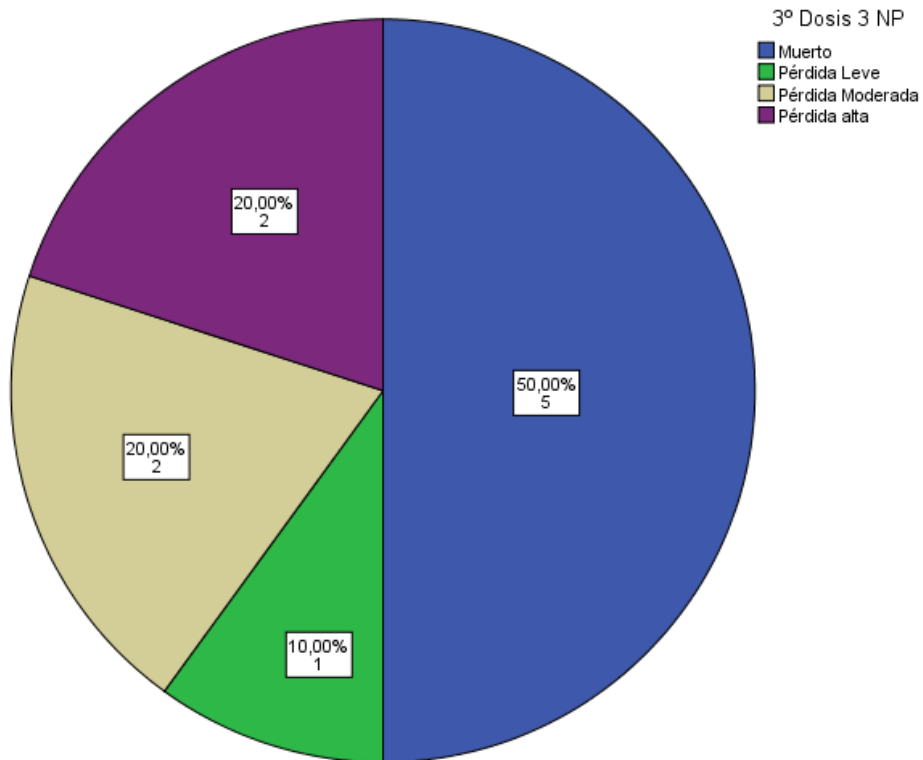
dosis una pérdida moderada del 50% y en la 3° dosis indica que el 50% de los modelos experimentales no resistieron la tercera dosis de este químico y que el 20% restante tuvo una pérdida alta de movilidad.



GráficoN°2: Pérdida de movilidad de modelos experimentales con 3-NP en 1° dosis

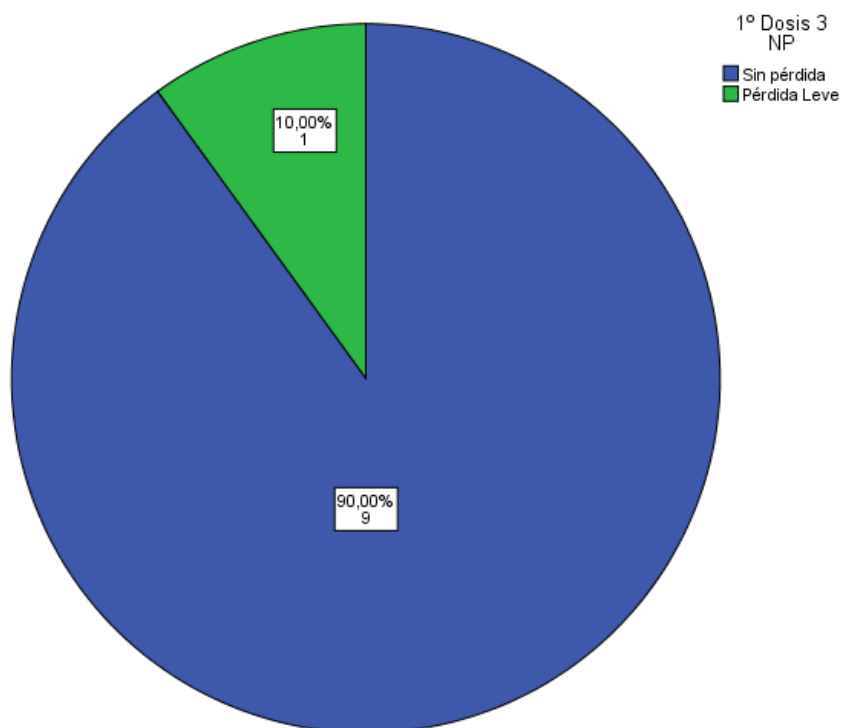


GráficoN°3: Pérdida de movilidad de modelos experimentales con 3-NP en 2° dosis

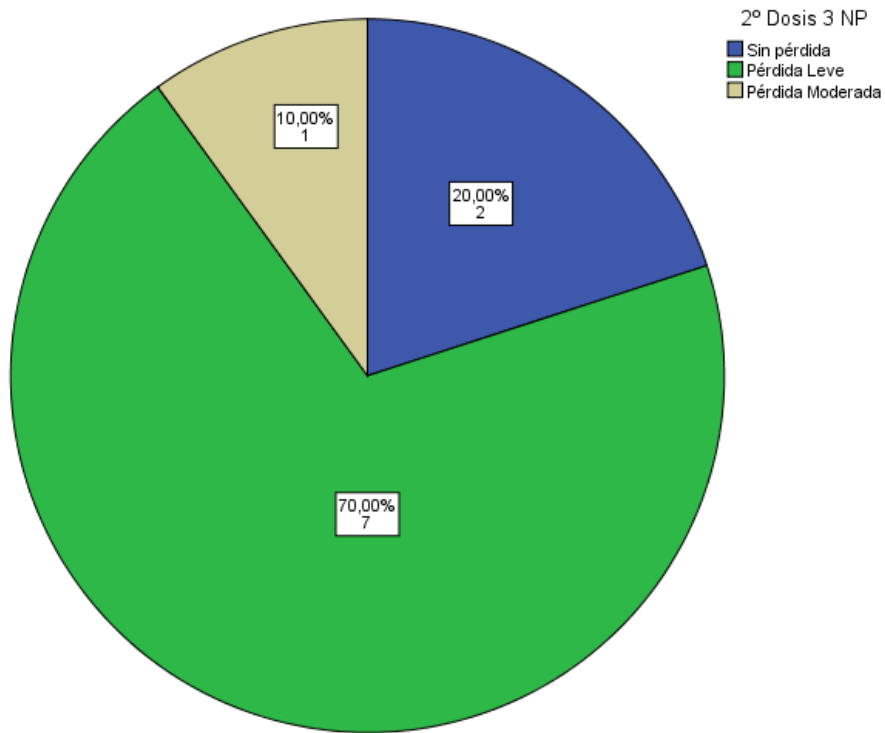


GráficoN°4: Pérdida de movilidad de modelos experimentales con 3-NP en 3° dosis

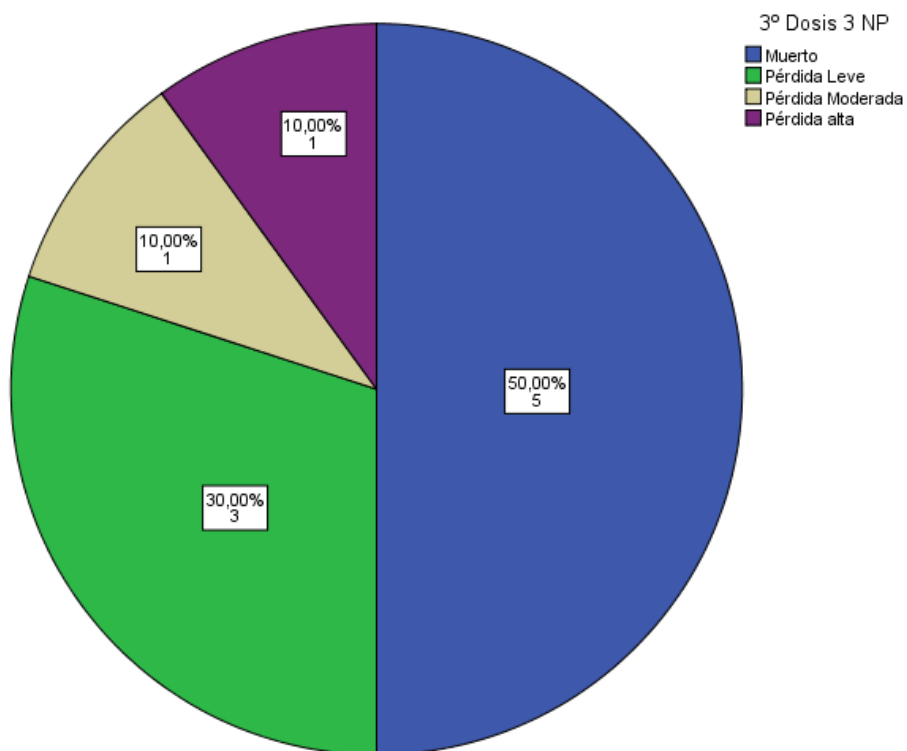
La característica de rigidez muscular en la cola en los modelos animales experimentales con 3 -NP indican que en la 1º dosis existe una pérdida leve del 90%, en la segunda dosis una pérdida leve del 70% y en la 3º dosis indica que el 50% de los modelos experimentales no resistieron la tercera dosis de este químico y que el 30% restante tuvo una pérdida leve.



GráficoN°5: Rigidez muscular en la cola en modelos experimentales con 3-NP en 1º dosis

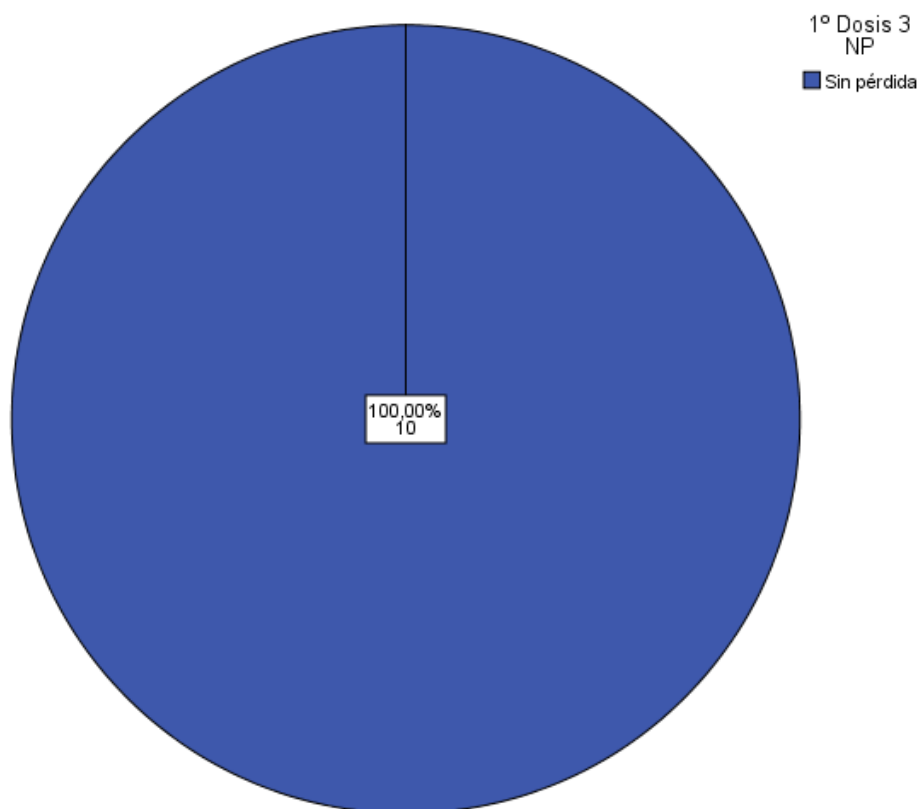


GráficoN°6: Rigidez muscular en la cola en modelos experimentales con 3-NP en 2° dosis

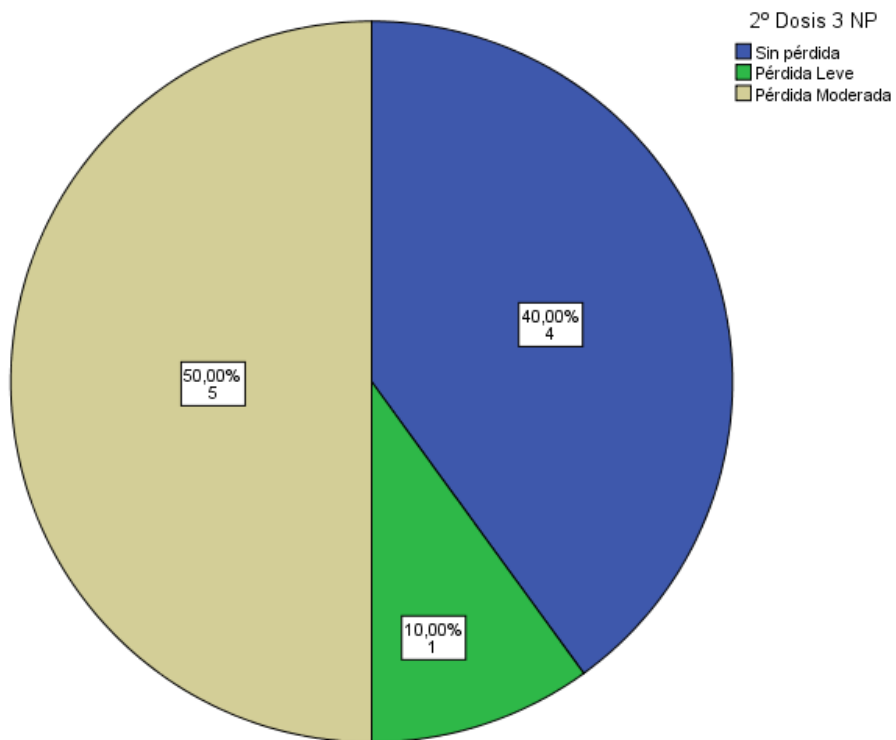


GráficoN°7: Rigidez muscular en la cola en modelos experimentales con 3-NP en 3° dosis

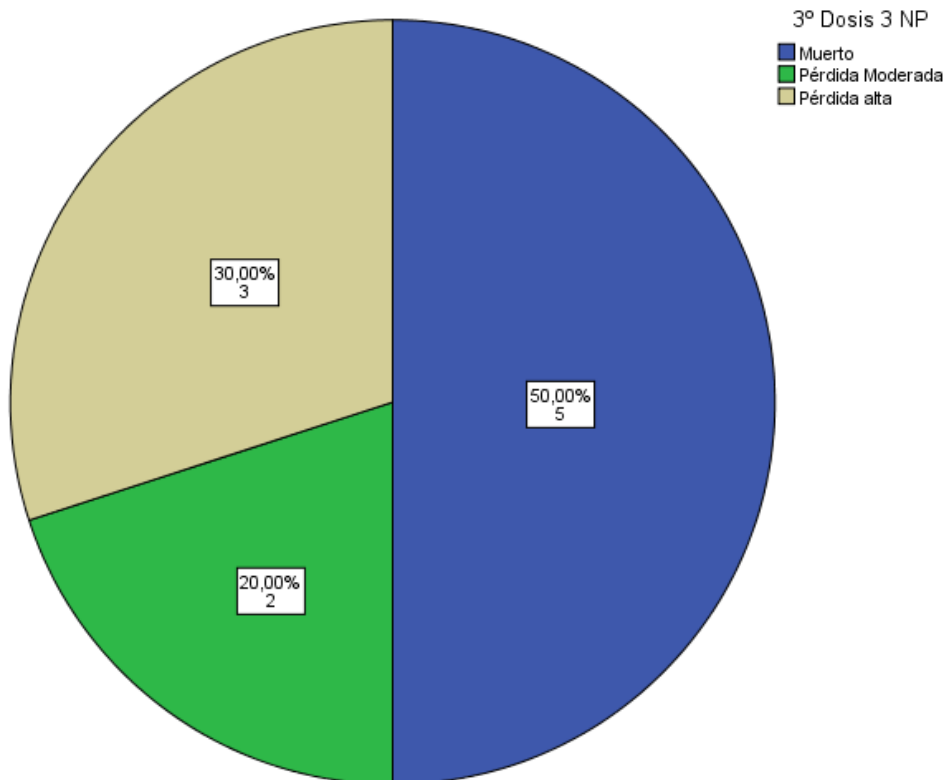
La característica de temblores y espasmos en los modelos animales experimentales con 3-NP indican que en la 1° dosis no existe temblores con un 100%, en la segunda dosis una presencia moderada del 50% y en la 3° dosis indica que el 50% de los modelos experimentales no resistieron la tercera dosis de este químico y que el 30% restante tuvo una presencia alta.



GráficoN°8: Temblores- Espasmos en modelos experimentales con 3-NP en 1° dosis

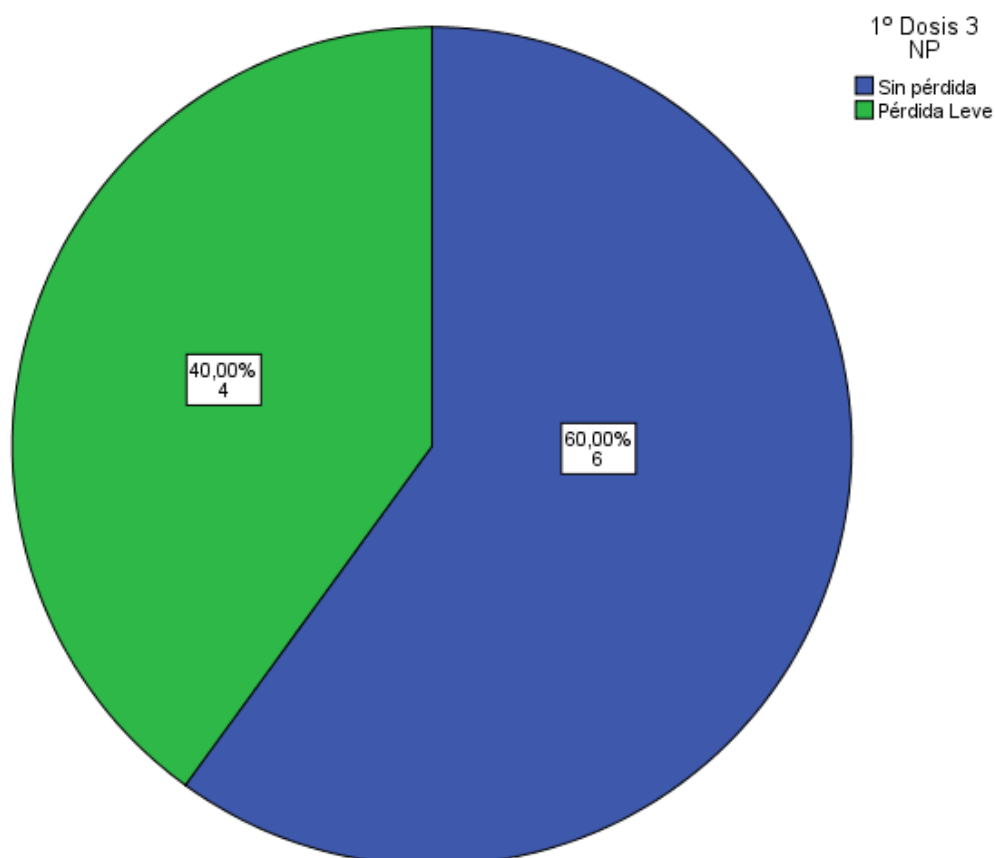


GráficoN°9: Temblores- Espasmos en modelos experimentales con 3-NP en 2° dosis

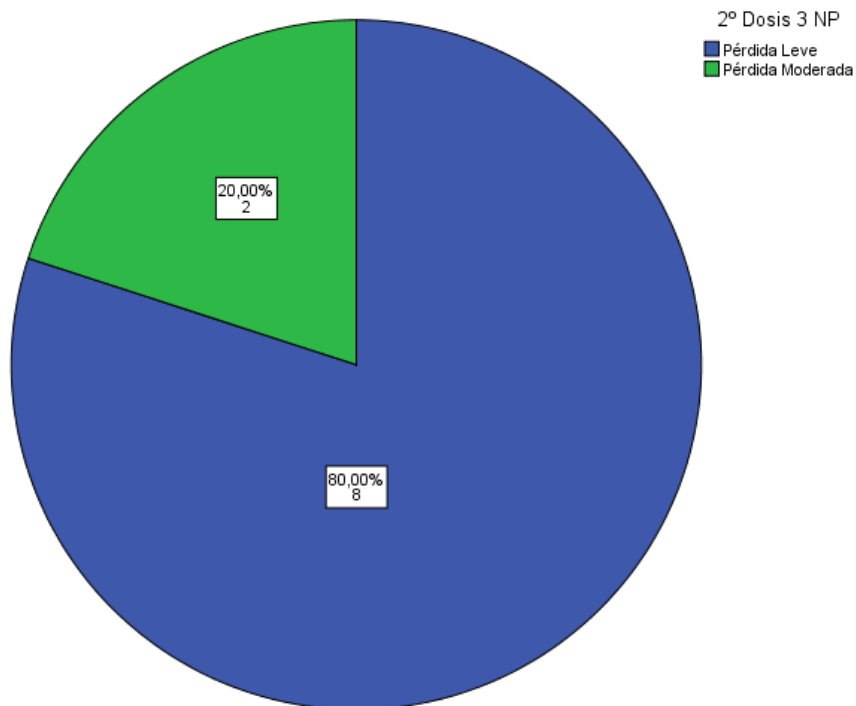


GráficoN°10: Temblores- Espasmos en modelos experimentales con 3-NP en 3° dosis

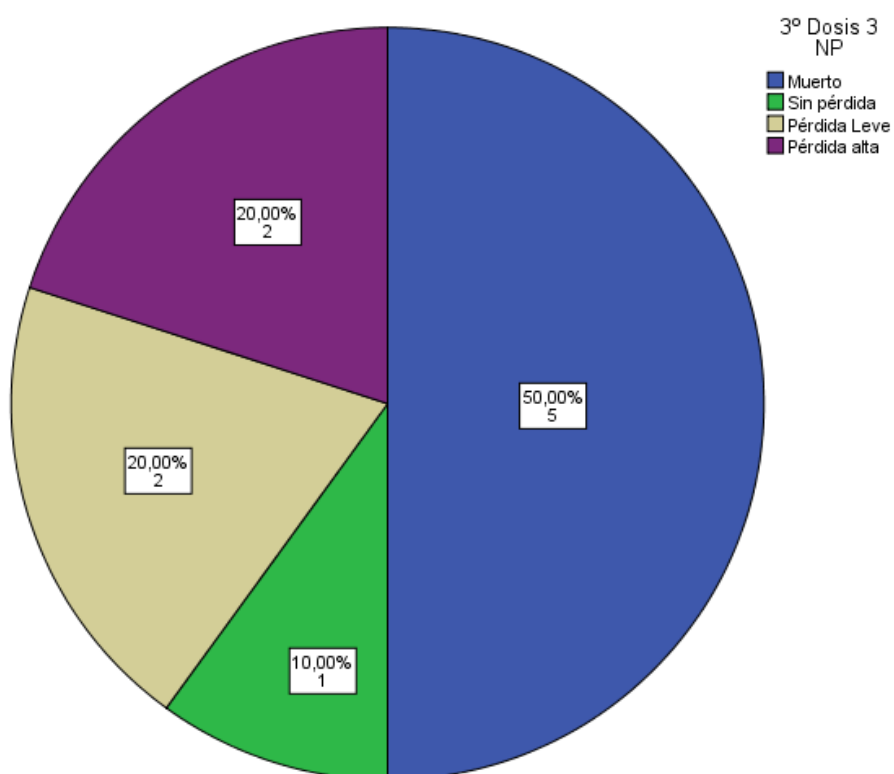
La característica de reducción de ingesta de agua y alimento en los modelos animales experimentales con 3-NP indican que en la 1° dosis no existe pérdida con un 60%, en la segunda dosis una pérdida leve del 80% y en la 3° dosis indica que el 50% de los modelos experimentales no resistieron la tercera dosis de este químico y que el 20% restante tuvo una pérdida alta.



GráficoN°11: Reducción de Ingesta de agua y alimentos en modelos experimentales con 3-NP en 1° dosis



GráficoN°12: Reducción de Ingesta de agua y alimentos en modelos experimentales con 3-NP en 2° dosis



GráficoN°13: Reducción de Ingesta de agua y alimentos en modelos experimentales con 3-NP en 3° dosis

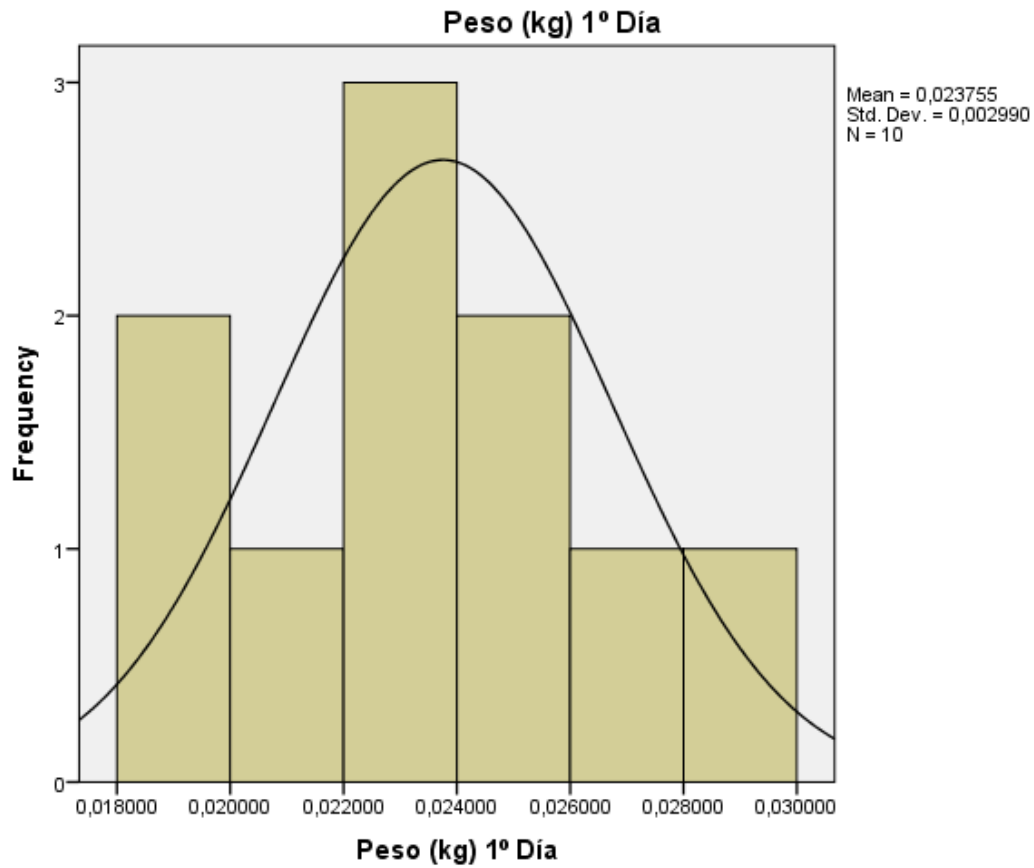
La medición del peso corporal de los modelos animales experimentales se registró en el primer y último día de la inoculación con ácido 3- Nitropropiónico. (3-NP) (Meenakshi, et, alt, 2011).

Se evidenció un cambio porcentual de pérdida de peso corporal de los modelos animales experimentales como se indica en la siguiente tabla:

Tabla N° 6: Cambio porcentual de pesos corporales de ratones inoculados con 3NP

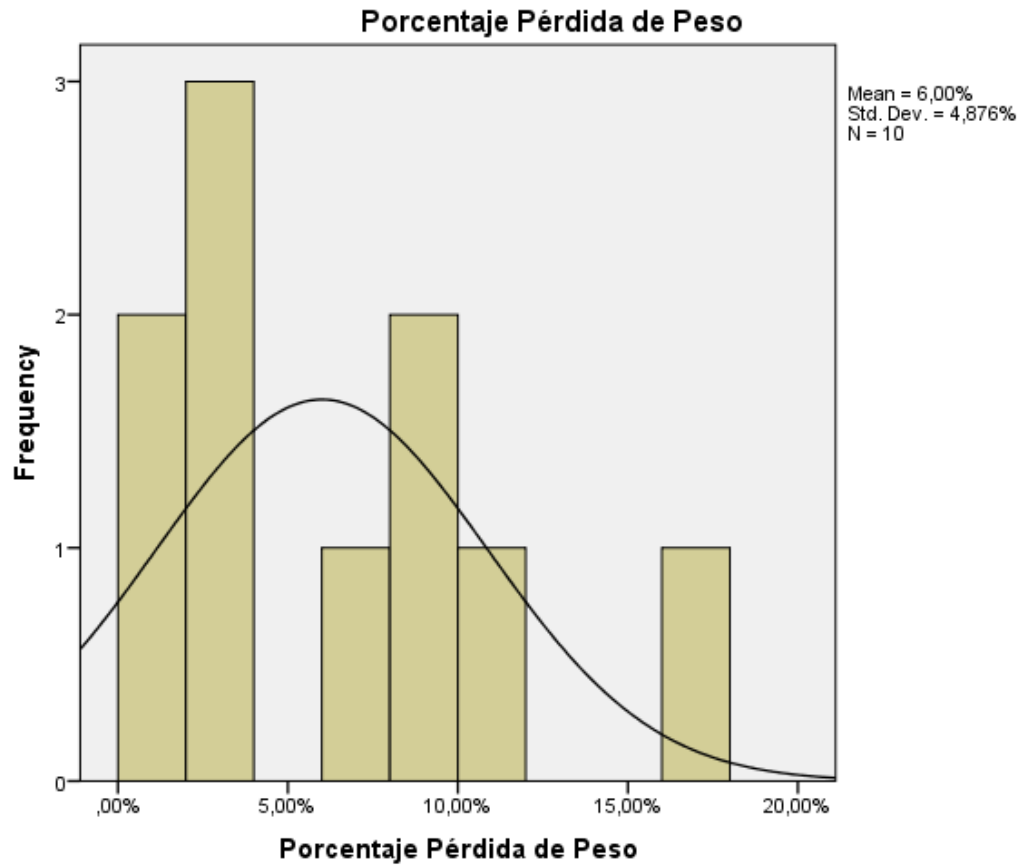
Ratones inoculados con Ácido 3 Nitropropiónico				
Fórmula: $Peso\ corporal: \frac{1^{\circ}\ día - 15^{\circ}\ día}{1^{\circ}\ día} \times 100$				
	N° de Ratón	Peso (kg) 1° Día	Peso (kg) 15° Día	Porcentaje Pérdida de peso
	1	0.01944	0.01791	8%
	2	0.01906	0.01867	2%
	3	0.02351	0.02148	9%
	4	0.02392	0.02146	10%
	5	0.02170	0.02156	1%
	6	0.02527	0.02340	7%
	7	0.02695	0.02270	16%
	8	0.02807	0.02720	3%
	9	0.02378	0.02305	3%
	10	0.02585	0.02569	1%
	Promedio de Pérdida de peso			6%

Los resultados de los pesos obtenidos de los modelos animales experimentales químicamente inducidos con ácido 3- Nitropropiónico en el primer día de la investigación indican una distribución normal.



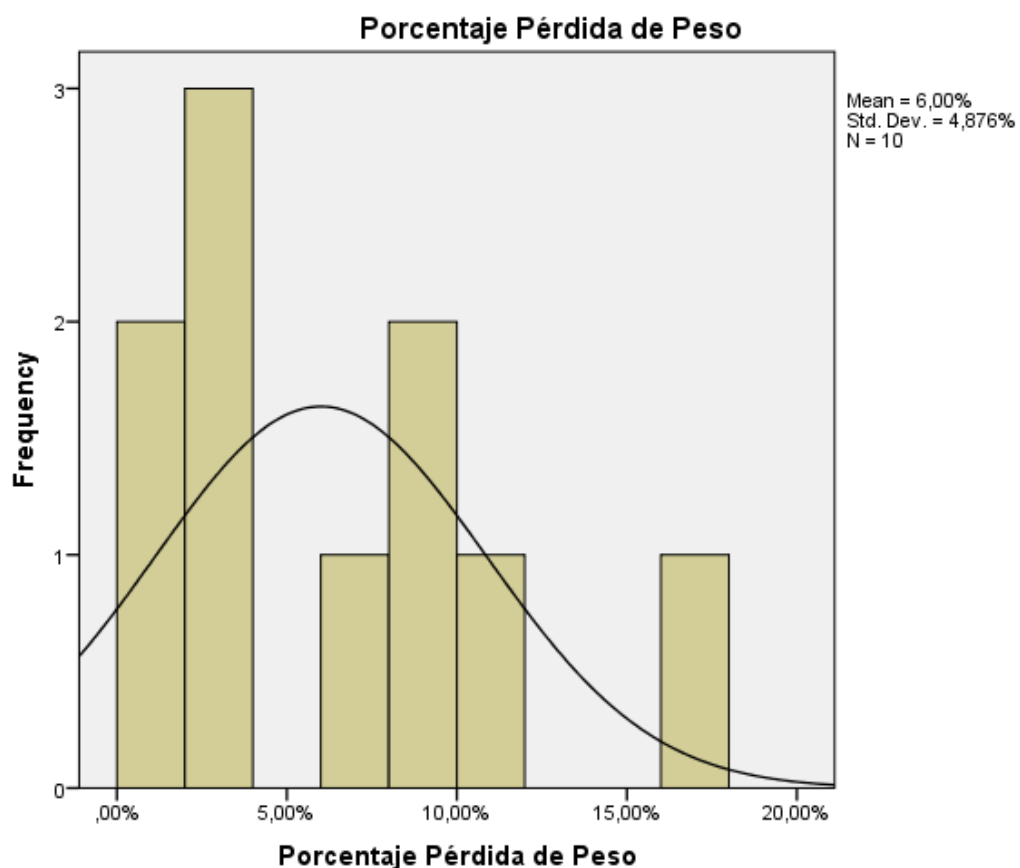
GráficoN°14: Peso (Kg) de modelos experimentales con 3-NP en el 1º día

Los resultados de los pesos obtenidos de los modelos animales experimentales químicamente inducidos con ácido 3- Nitropropiónico en el 15º día de la investigación indican una distribución normal.



GráficoN°15: Peso (Kg) de modelos experimentales con 3-NP en el 15° día

La variable del porcentaje de pérdida de peso de los modelos experimentales con ácido 3- Nitropropiónico (3-NP) sigue una distribución asimétrica, existe una variación de los datos hacia la izquierda.



GráficoN°16: Porcentaje de pérdida de peso de modelos experimentales con 3-NP

De acuerdo a los resultados obtenidos en el programa SPSS con el test de T de *Student*, el valor de correlación es de 0.995 lo que nos indican que existe dependencia de variables entre el peso del 1° día y del 15° día en los modelos animales experimentalmente químicamente modificados con ácido 3- Nitropropiónico, es decir que existe relación entre los dos pesos.

Tabla N°7: T de *Student*

Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Peso (kg) 1° Día & Pair 1 Peso (kg) 15° Día	10	,995	,000

En el análisis de regresión simple para determinar si se relaciona la pérdida de peso entre el 1° día y el 15° día se obtuvo una significancia de $p= 0,000$ indicando que si existe relación entre estos dos pesos

Tabla N°8: ANOVA

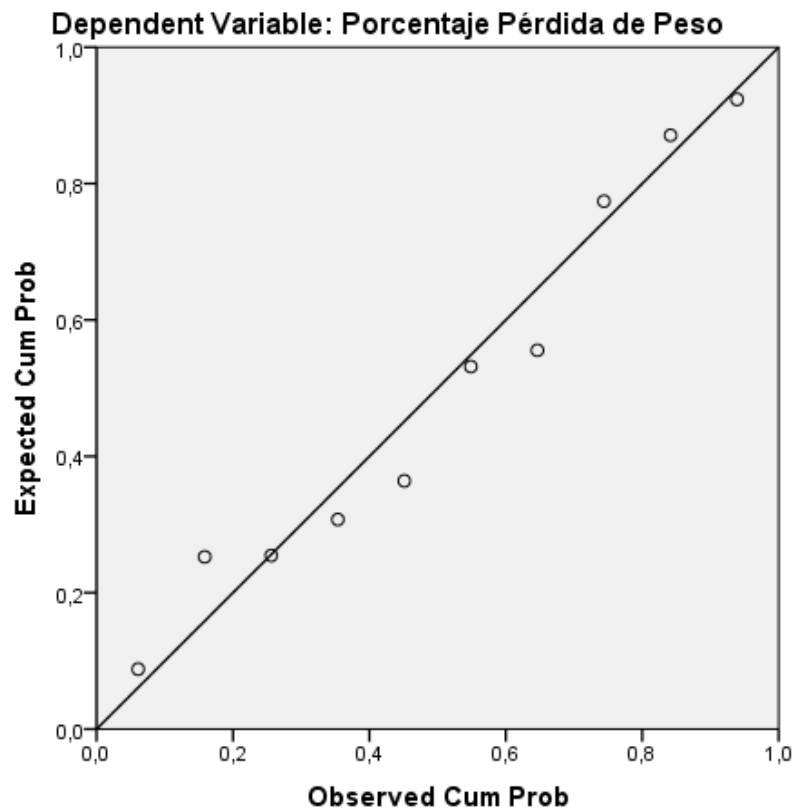
ANOVA^a

Model	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	211,672	2	105,836	18,223	,000 ^b
Residual	2,328	7	,333		
Total	214,000	9			

a. Dependent Variable: Porcentaje Pérdida de Peso

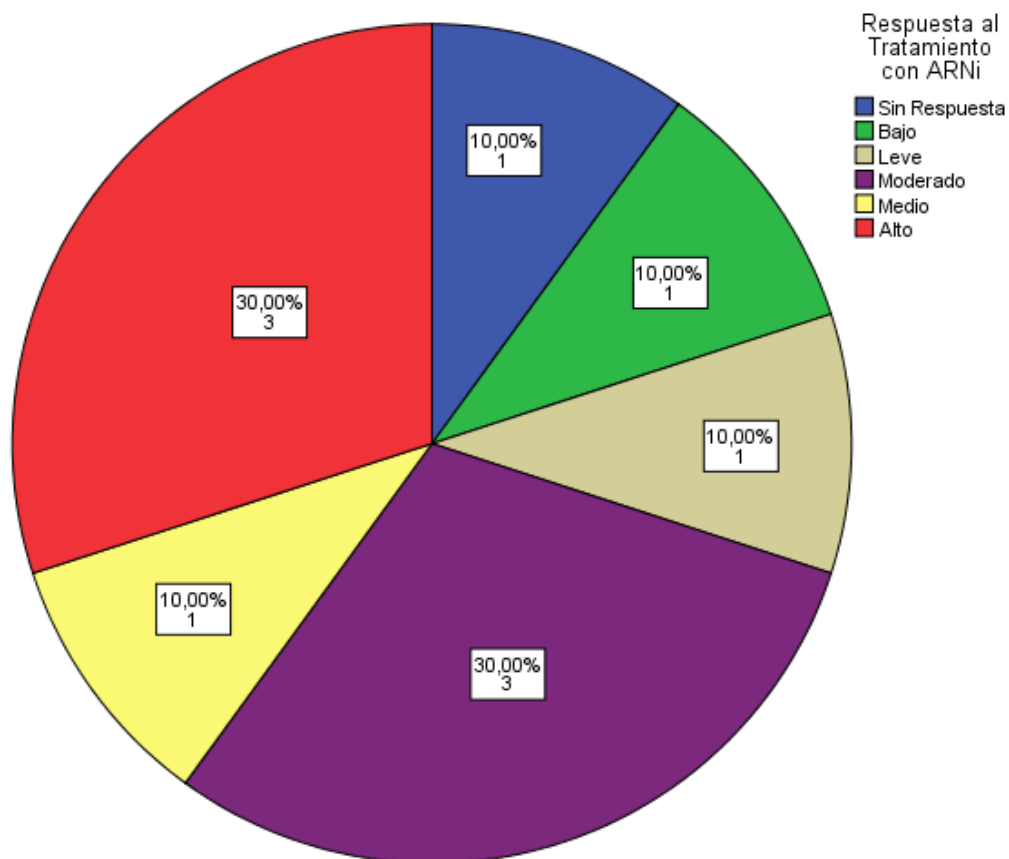
b. Predictors: (Constant), Peso (kg) 15avo Día, Peso (kg) 1primer Día

Normal P-P Plot of Regression Standardized Residual



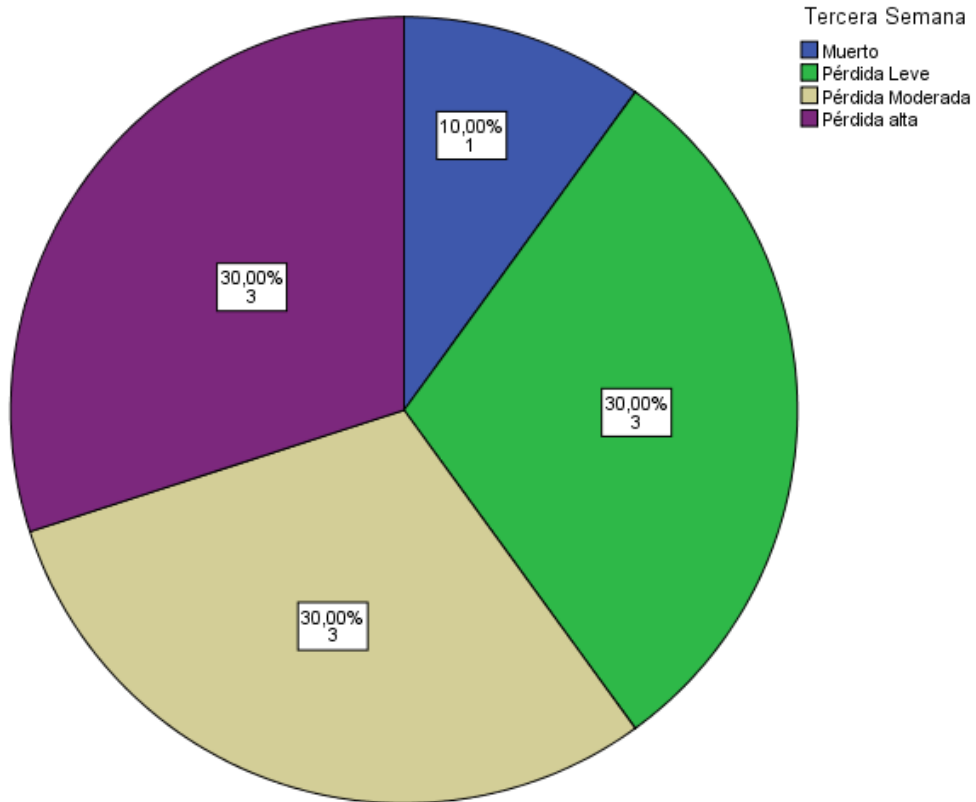
GráficoN°17: Análisis Regresión Lineal: Pérdida de Pesos

El segundo grupo de modelos animales experimentales modificados químicamente con ácido 3- Nitropropiónico y tratados con ARNi presentaron una respuesta al tratamiento con un 30% alto, 10% medio y bajo y un 30% moderado.



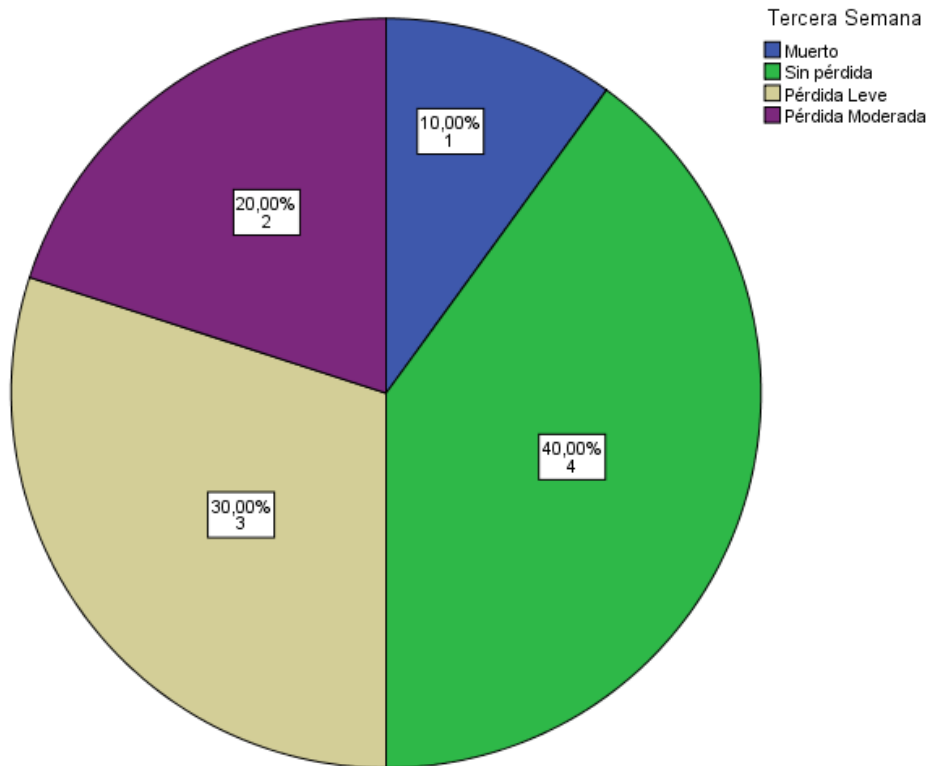
GráficoN°18: Respuesta al tratamiento con ARNi en modelos animales experimentales químicamente modificados.

La característica de aumento de movilidad en los modelos animales experimentales químicamente modificados tratados con ARNi indica que existe una recuperación leve, moderada y alta del 30% y un 10% de modelo experimental muerto ya que no resistió la dosis del químico.



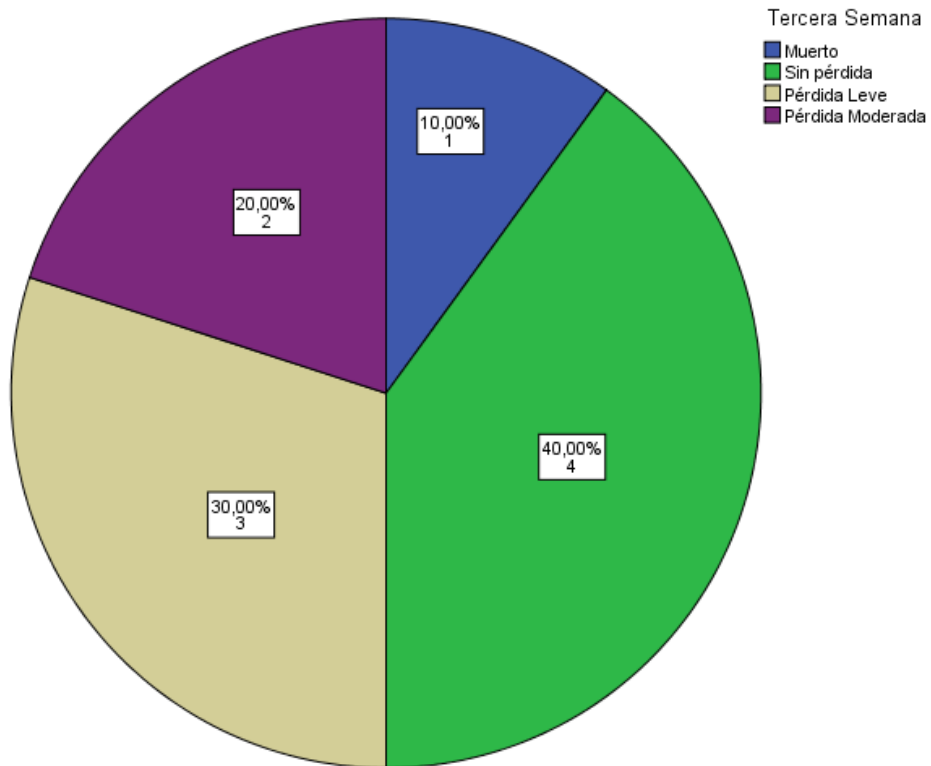
GráficoN°19: Aumento de movilidad en modelos animales experimentales químicamente modificados tratados con ARNi.

Las características de disminución de rigidez en la cola y disminución de temblores en los modelos animales experimentales químicamente modificados tratados con ARNi indican que existe una recuperación leve del 30%, y un 20% de recuperación moderada.



GráficoN°20: Disminución de Temblores – Rigidez en la cola en modelos animales experimentales químicamente modificados tratados con ARNi.

Las características de aumento de ingesta de alimento y agua en los modelos animales experimentales químicamente modificados tratados con ARNi indican que existe una recuperación leve del 30%, y un 20% de recuperación moderada.



GráficoNº21: Aumento de ingesta de agua - alimentos en modelos animales experimentales químicamente modificados tratados con ARNi.

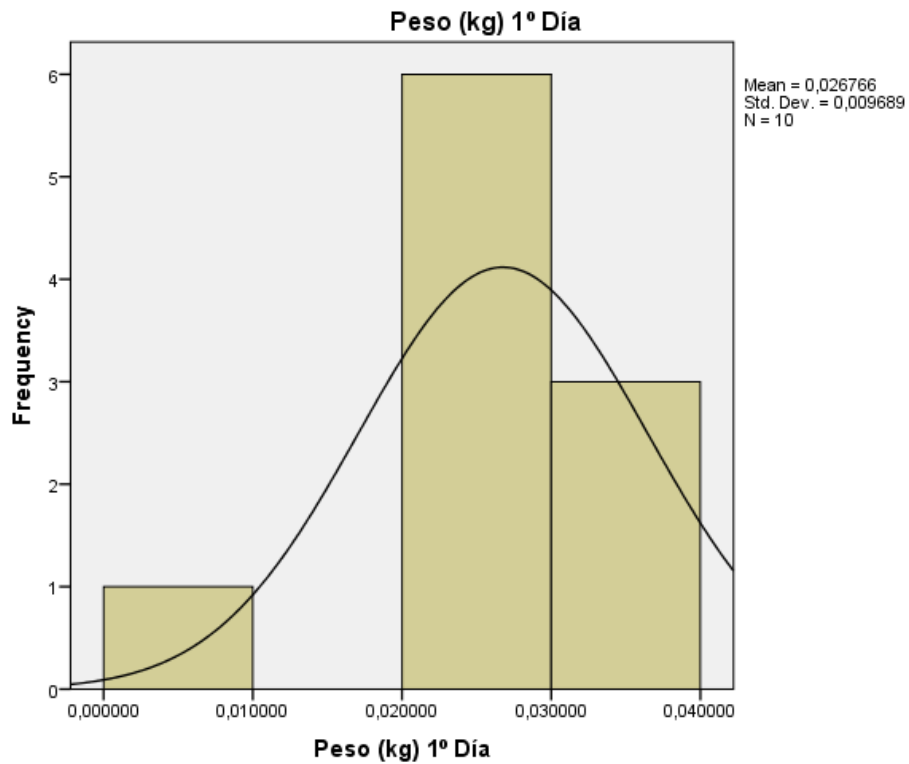
En la segunda fase de la investigación se realizó la inoculación de los modelos animales experimentales con 3-NP y con ARNi, de igual forma se realizó el registro de las características de los modelos experimentales inoculados con 3-NP y ARNi que se describe en el anexo 4.6.20. También se realizó la medición del peso corporal de los modelos animales experimentales en el primer y último día de la inoculación.

Se evidenció un cambio porcentual de ganancia de peso corporal de los modelos animales experimentales como se indica en la siguiente tabla:

Tabla N° 9: Cambio porcentual de pesos corporales de ratones inoculados con 3NP + ARNi

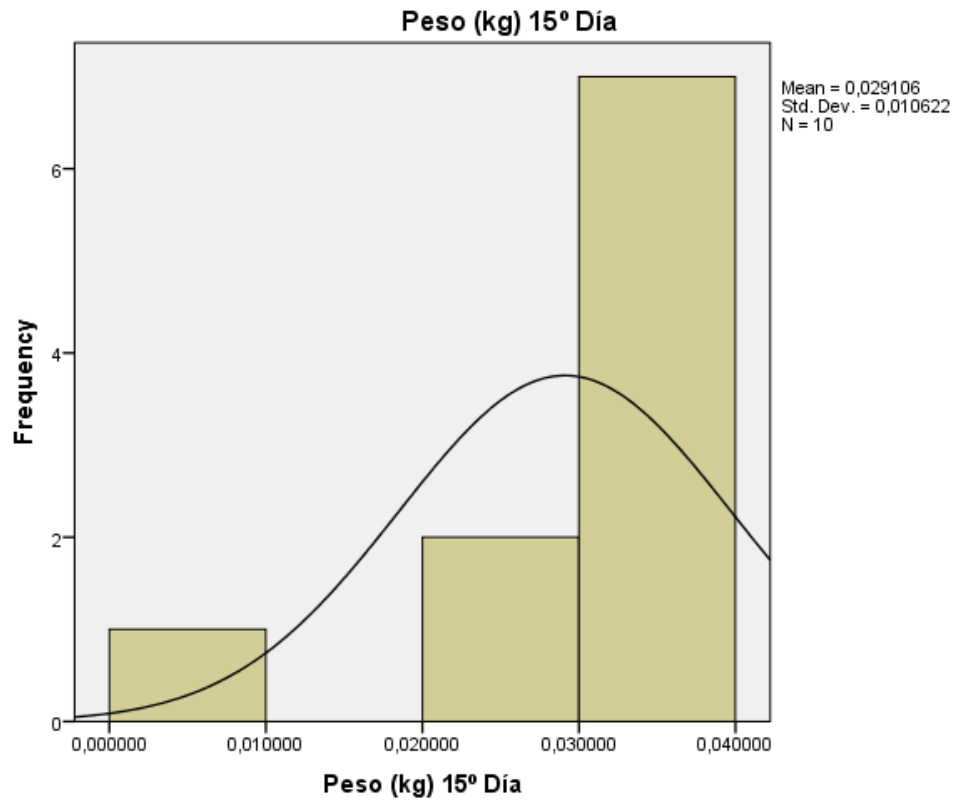
Ratones inoculados con 3-NP + ARNi				
Fórmula: $Pesocorporal: \frac{1^{o}día-15^{o}día}{1^{o}día} \times 100$				
	N° de Ratón	Peso (kg) 1° Día	Peso (kg) 15° Día	Porcentaje Ganancia de peso
	1	0.02797	0.02913	4 %
	2	0.02700	0.02746	1%
	3	0.02913	0.03158	8%
	4	0.02746	0.03077	12%
	5	0.03033	0.03305	8%
	6	0.02998	0.03436	14%
	7	0.03158	0.03560	12%
	8	0.02913	0.03211	10%
	9	0.03508	0.03700	5%
	10	Muerto	Utilizado	para control
	Promedio de Ganancia de peso			8%

Los resultados de los pesos obtenidos de los modelos animales experimentales químicamente inducidos con ácido 3- Nitropropiónico y tratados con ARNi en el primer día de la investigación indican una distribución normal.



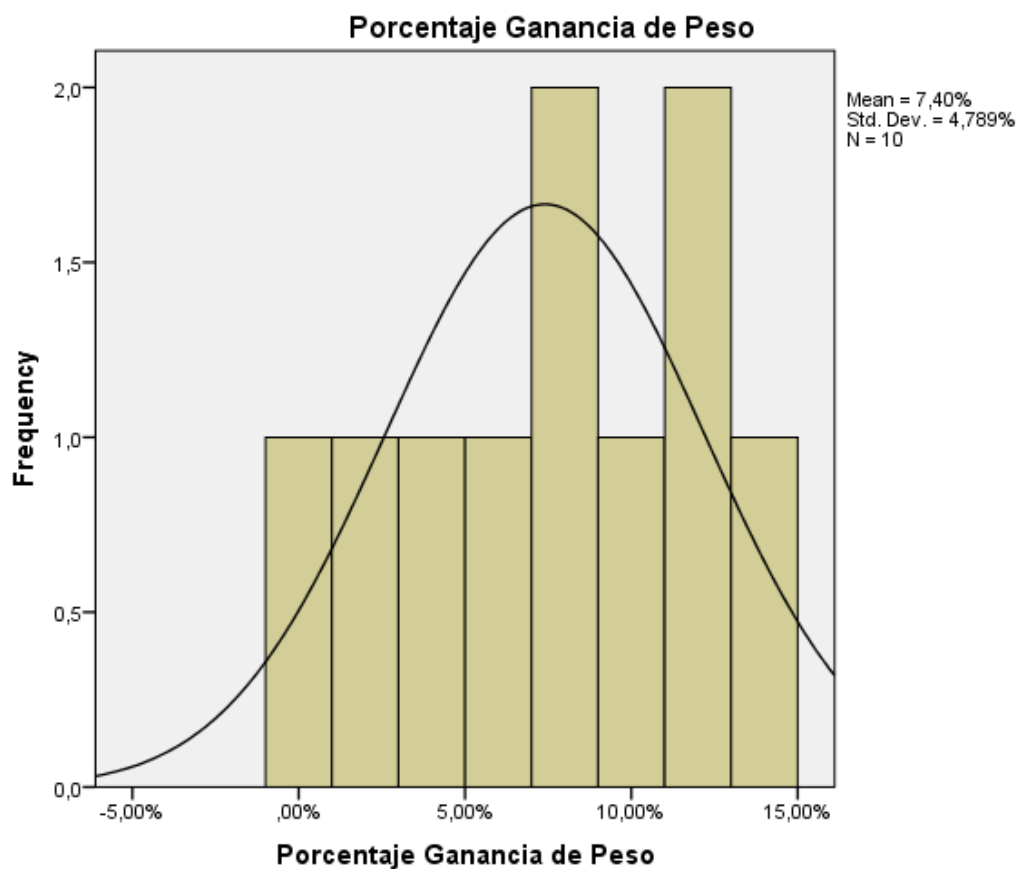
GráficoNº22: Pesos (Kg) 1º día de modelos animales experimentales químicamente modificados tratados con ARNi.

Los resultados de los pesos obtenidos de los modelos animales experimentales químicamente inducidos con ácido 3- Nitropropiónico tratados con ARNi en el 15° día de la investigación indican una distribución normal.



GráficoN°23: Pesos (Kg) 15° día de modelos animales experimentales químicamente modificados tratados con ARNi.

La variable del porcentaje de ganancia de peso de los modelos experimentales con 3-NP y tratados con ARNi sigue una distribución asimétrica, existe una variación de los datos hacia la izquierda.



GráficoN°24: Ganancia de peso en modelos animales experimentales químicamente modificados tratados con ARNi.

El análisis con la R de *Cronbach* en el primer grupo de modelos animales experimentales modificados químicamente con ácido 3- Nitropropiónico nos da un resultado de 0,841

Tabla N°10: R de *Cronbach*

Cronbach's Alpha	Cronbach's Alpha Based on Standardized Items	N of Items
,841	,843	12

El análisis con la R de *Cronbach* en el segundo grupo de modelos animales experimentales modificados químicamente con ácido 3- Nitropropiónico y tratados con ARNi nos da un resultado de 0,687, es decir que el experimento es confiable.

Tabla N°11: R de *Cronbach*

Cronbach's Alpha	Cronbach's Alpha Based on Standardized Items	N of Items
,841	,843	12

De acuerdo a los resultados obtenidos en el programa SPSS con el test de Chi cuadrado, el valor de la significancia de $p=0.602$ lo que nos indican que cae en la región de aceptación de la hipótesis nula, esto nos indican que existe independencia de variables, es decir que no existe relación entre respuesta a Químico 3NP-ARNi.

Tabla N° 12: Chi cuadrado

Chi-Square Tests

	V alue	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	1 7,778 ^a	2 0	,602
Likelihood Ratio	1 7,959	2 0	,590
Linear-by-Linear Association	4 ,312	1	,038
N of Valid Cases	1 0		

a. 30 cells (100, 0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is, 10.

En el análisis de regresión simple para determinar si se relaciona la ganancia de peso entre el 1° día y el 15° día se obtuvo una significancia de $p=0,000$ indicando que si existe relación entre estos dos pesos.

Tabla N° 13: ANOVA

ANOVA^a

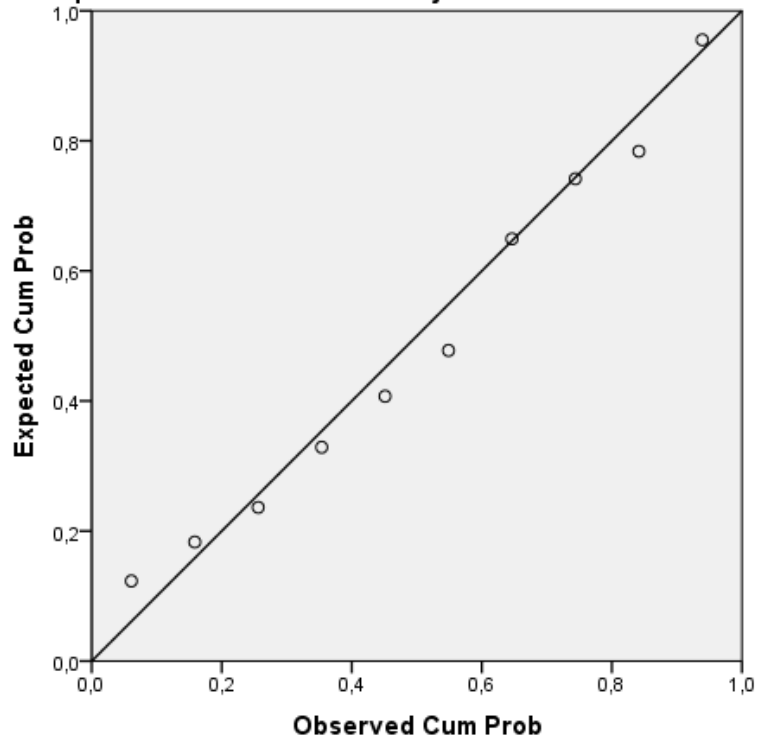
Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regr ession		201,998	2	100,999	60,600	,000 ^b
	Resi dual	4,402	7	,629		
Total		206,400	9			

a. Dependent Variable: Porcentaje Ganancia de Peso

b. Predictors: (Constant), Peso (kg) 15° Día, Peso (kg) 1° Día

Normal P-P Plot of Regression Standardized Residual

Dependent Variable: Porcentaje Ganancia de Peso



GráficoN°25: Análisis Regresión Lineal: Ganancia de Pesos

Las muestras de tejido de cerebro analizadas en el gel de poliacrilamida al 12% no se pudieron visualizar con la coloración de Nitrato de Plata (AgNO_3) ya que no se obtuvo bandas. La ausencia de bandas se visualiza en la Fotografía N° 39.

La proteína ácida glial fibrilar (GFAP) no se pudo visualizar en el gel de poliacrilamida ya que las muestras estaban degradadas por su mal preservación ya que en el proceso de fijación en parafina el tiempo de fijación pudo influir para que haya un entrecruzamiento de las proteínas y no haya bandas en el gel de poliacrilamida. Otra razón podría ser que el formaldehído usado en este proceso se oxidó a ácido fórmico generando un medio ácido, provocando la degradación de las muestras.

4.2 DISCUSIÓN

La enfermedad de Huntington es una patología neurodegenerativa que no tiene un tratamiento efectivo en la actualidad. Por esta razón, varias investigaciones se centran en encontrar tratamientos experimentales efectivos para esta enfermedad. La terapia que se investigó en este trabajo fue el ARN de interferencia (ARNi) ya que se ha afirmado en varios estudios que inhibe la expresión de la proteína huntingtina y evita la degeneración de las neuronas como por ejemplo el realizado en Iowa, Estados Unidos en el año 2008.

Los estudios realizados en años recientes sobre este tratamiento experimental han tenido varios enfoques como el estado fisiológico de los astrocitos en modelos experimentales en la enfermedad de Huntington, la eficacia del tratamiento en modelos animales experimentales y la cuantificación de genes involucrados en la enfermedad de Huntington, entre otros enfoques. Todos los estudios realizados muestran que aún faltan más investigaciones sobre las terapias experimentales para el tratamiento de la enfermedad de Huntington.

Esta investigación se realizó en modelos animales experimentales, específicamente en ratones *Mus musculus* modificados químicamente por la administración de tres dosis de ácido 3 Nitropropiónico (3-NP) de forma crónica en un periodo de quince días aproximadamente en dosis bajas de 10 – 12 mg/kg de interferencia (ARNi). Los modelos animales experimentales reprodujeron los signos y síntomas de esta patología a nivel de capacidades motrices, tal y como se realizó en la investigación realizada en India (2010). Para probar el tratamiento con ARN de interferencia se inyectó a los modelos animales químicamente modificado con una dosis del mismo. La medición del daño por la administración del ácido 3 Nitropropiónico y la efectividad del tratamiento del ARNi se realizó a través de la observación de los cambios de peso que presentaron los modelos animales experimentales.

Un dato importante sobre los modelos animales experimentales fue que la mitad de los ratones utilizados para esta investigación no resistieron las tres dosis de ácido 3 Nitropropiónico (3-NP); que todos perdieron un porcentaje promedio de 6% de peso demostrando que este químico al reducir los niveles de ATP por la inhibición de los complejos mitocondriales y que al aumentar los niveles de lactato por un metabolismo energético alterado provocó un efecto cardiotóxico ya que el corazón al ser dependiente

de la función mitocondrial sufrió una alteración en su funcionamiento normal y desencadenó en la pérdida de peso y en la muerte de la mitad de los modelos animales experimentales como se demostró en las investigaciones similares realizadas en Punjab, India en el año 2011 y en Japón en el año 2001.

Los resultados conductuales que se observaron al administrar ácido 3 Nitropropiónico fueron la disminución de la actividad motora seguida por momentos de hiperactividad y movimientos anormales como temblores, movimientos anormales de la cabeza, rigidez, elevación de la cola y reducción de peso de los modelos animales experimentales. Todos estos resultados demostraron que se pudo reproducir las características de esta patología en la etapa juvenil, igualando los resultados que obtuvo una investigación en Corea en el año 2012.

La investigación realizada se correlacionó con otros estudios realizados en varios países como los realizados en México en el 2009, Iowa en el 2008, entre otros, y se proporcionó nueva información sobre la efectividad del tratamiento experimental ARNi en la enfermedad de Huntington.

4.3 CONCLUSIONES

- La administración de la dosis de ácido 3-nitropropiónico (3-NP) en los modelos experimentales se realizó de forma óptima según el peso de cada uno y se realizó tres dosis en el periodo de 15 días.

- Los modelos experimentales que no cumplieron con las tres dosis del ácido 3-nitropropiónico (3-NP) no se tomaron en cuenta en el análisis de las muestras ya que interferían en la evaluación de nuestro modelo experimental.

- La reducción de peso de los modelos animales químicamente modificados con ácido 3 Nitropropiónico (3-NP) represento en promedio el 6% demostrando la disminución del metabolismo de ATP en los ratones por la neurotoxicidad inducida por la inyección de este químico.

- Los modelos animales experimentales químicamente inducidos tratados con ARN de interferencia mostraron una mejoría en sus funciones motoras y también se demostró la ganancia de peso en un 8%.

- El uso de el ácido 3- Nitropropiónico (3-NP) reprodujo las características de la enfermedad de Huntington en los modelos animales experimentales.

- La selección del gel de poliacrilamida de 12% se hizo según el tamaño de la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) ya que los poros del gel determinan la capacidad de diferenciación de las proteínas y este tamaño era el más adecuado.

- El análisis de las proteínas en un tejido preservado en parafina tiene una variable vulnerabilidad ya que en tejidos post mortem la señal de las proteínas disminuye por sus cambios post transcripcionales.

- Los resultados del test Chi cuadrado se basan en la significancia de $p < 0.05$, aceptando la hipótesis alternativa, es decir que existe independencia ente las variables de la modificación química con ácido 3 – Nitropropiónico y el tratamiento con ARN de interferencia (3-NP).

- La mayor cantidad de variables son cualitativas como la movilidad de los modelos animales experimentales, la rigidez en la cola, los temblores y la ingesta de alimento y agua, seguidas de las variables cuantitativas como el peso en kilogramos de los modelos animales experimentales realizados el 1º día y el 15º día

- Las variables cualitativas son respuesta a la administración en el primer grupo de ácido 3- Nitropropiónico y en el segundo grupo de ácido 3- Nitropropiónico y tratados con ARNi.

- La correlación entre las dos variables de peso del 1º y 15º día en la administración del ácido Nitropropiónico (3-NP) si es significativa estadísticamente ya que existe una alta correlación dado que el valor es cercano a uno, es decir son directamente proporcionales.

- La prueba R como la prueba t nos indica que las variables de ácido 3- Nitropropiónico y ARN de interferencia son independientes entre sí.

4.4 RECOMENDACIONES

- El uso de animales de laboratorio y sus actividades debe incluir: una razón para involucrar a los animales, la idoneidad de las especies, el número de los animales, una descripción de los procedimientos para asegurar el mínimo dolor o disconformidad de los animales en el desarrollo de la investigación y sedación, analgesia y anestesia adecuada.

- Los investigadores deben evaluar el bienestar de los animales, independientemente de su uso experimental.

- La evaluación del dolor de los animales de laboratorio después del procedimiento, la angustia y la salud en general es una cuestión de juicio clínico subjetivo que depende de la evaluación de una serie de medidas, incluyendo los factores de comportamiento. Los métodos de eutanasia deben ser justificados por razones científicas del investigador.

- La vigilancia y mantenimiento de animales se llevan a cabo y deben ser documentados por los investigadores como una parte rutinaria de sus experimentos.

- Se requieren la regulación de los alimentos de los animales o de la ingesta de líquidos para lograr un objetivo experimental específico. El proceso del acceso a las fuentes de alimentos o líquido para un animal debe programarse a intervalos regulares, o de restricción, en el que el volumen total de alimentos o líquidos consumidos se controlan y regulan estrictamente.

- Se debe prestar especial atención a garantizar que la dieta cumple con las necesidades nutricionales de los animales, a menos que las necesidades científicas del protocolo de investigación exigen lo contrario.

- Las condiciones de vida de los animales debe ser apropiado para cada especie y debe contribuir a su salud y confort.

- Para la cuantificación de proteínas en tejidos y evitar la degradación se podría optar por trabajar con tejidos frescos o conservados en nitrógeno líquido ya que se evitaría el uso formol u otros fijadores.

4.5 BIBLIOGRAFÍA

Abdulrahman, G. O. (2011). Therapeutic Advances in the Management of Huntington's disease. *Yale Journal of Biology and Medicine* , 84(3), 311-319. Recuperado de: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3178862/pdf/yjbm_84_3_311.pdf

Akashiba, H., Ikegaya, Y., Nishiyama, N., & Matsuki, N. (2008). Differential Involvement of Cell Cycle Reactivation between Striatal and Cortical Neurons in Cell Death Induced by 3-Nitropropionic Acid. *The Journal of Biological Chemistry* , 283(10), 6594–6606. doi: 10.1074/jbc.M707730200

Boudreau, R. L., McBride, J. L., Martins, I., Shen, S., i Xing, Y., Carter, B. J., et al. (2009). Nonallele-specific Silencing of Mutant and Wild-type Huntingtin Demonstrates Therapeutic Efficacy in Huntington's Disease Mice. *The American Society of Gene Therapy* , 17, (6), 1053–1063. doi:10.1038/mt.2009.17

Boudreau, R. L., Spengler, R. M., & Davidson, B. L. (2011). Rational Design of Therapeutic siRNAs: Minimizing Off-targeting Potential to Improve the Safety of RNAi Therapy for Huntington's Disease. *The American Society of Gene & Cell Therapy* ,19(12), 1-9. doi: 10.1038/mt.2011.185.

Cong, W.-n., Cai, H., Wang, R., Daimon, C. M., Maudsley, S., Raber, K., et al. (2012). Altered Hypothalamic Protein Expression in a Rat Model of Huntington's Disease. *Plos One* ,7(10), 1-14. doi:10.1371/journal.pone.0047240

Cultex. (2009). Técnica Western Blot. *Soluciones Western Blot* , 1-9. Recuperado de: <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-Electroforesis-protocolos.pdf>

Delorme, T., Najafi, M., & Nasr, P. (2012). The spatial and temporal relationship between oxidative stress and neuronal degeneration in 3-nitropropionic acid model. *Journal of Neuroscience* ,2(4), 234-247. doi:10.4236/wjns.2012.24036

Fang, Q., Strand, A., Law, W., Faca, V. M., & Fitzgibbon, M. P. (2009). Brain-specific Proteins Decline in the Cerebrospinal Fluid of Humans with Huntington Disease. *Molecular & Cellular Proteomics* ,8(3), 455-461. doi: 10.1074/mcp.M800231-MCP200

Fuentes Bello, A. C., Pérez Carrera, D., Pérez-de la Cruz, V., Santamaría del Ángel, A., & Carrillo Mora, P. (2013). Efectos a largo plazo de la coadministración subtóxica de ácido 3-nitropropiónico y ácido quinolínico en el estriado de rata. *Investigación en Discapacidad* , 2(1), 2-12. Recuperado de: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir131a.pdf>

Fuentes Paredes, F. d., Mendoza Yanavilca, R. A., Rosales Fernández, A. L., & Cisneros Tarmeño, R. A. (2008). *Guía de Manejo y Cuidado de Animales de Laboratorio: Ratón*. Lima: Instituto Nacional de Perú. Recuperado de: http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/GUIA_ANIMALES_RATON.pdf

García De Yérbes, J., Hernández, J., & Cantarero, S. (2003). Progresos en la Enfermedad de Huntington. *Enfermedades Neurodegenerativas*, 85-101. Recuperado de: http://www.farmaindustria.es/idc/groups/public/documents/publicaciones/farma_1041.pdf

Harper, S. Q. (2011). Progress and Challenges in RNA Interference Therapy for Huntington Disease. *Neurological Review* ,17(2), 933-938. doi:10.1177/1073858410386236

Harper, S. Q., Staber, P. D., Eliason, S. L., Mao, Q., & Davidson, B. L. (2005). RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *PNAS* ,102(16), 1-6. doi: 10.1073/pnas.0501507102

Hernandez-Echeagaray, E., Gonzalez, N., Ruelas, A., Mendoza, E., Rodriguez-Martinez, E., & Antuna-Bizarro, R. (2010). Low doses of 3-nitropropionic acid in vivo induce damage in mouse skeletal muscle. *Springer* , Recuperado de: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/28339.pdf>

Hipp, M. S., Patel, C. N., Bersuker, K., Riley, B. E., Kaiser, S. E., Shaler, T. A., et al. (2012). Indirect inhibition of 26S proteasome activity in a cellular model of Huntington's disease. *The Journal of Cell Biology* ,196(5), 573 -587. doi: 10.1083/jcb.201110093

Huang, Y.-C., Wu, Y.-R., Tseng, M.-Y., Chen, Y.-C., Hsieh, S.-Y., & Chen, C.-M. (2011). Increased Prothrombin, Apolipoprotein A-IV, and Haptoglobin in the

Cerebrospinal Fluid of Patients with Huntington's Disease. *Plos One* ,6(1), 1-9. doi:10.1371/journal.pone.0015809

J. Middeldorp, E. H. (2011). GFAP in health and disease. *ELSEVIER* ,93(3) 421–443. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.01.005.

Kumar, P., Kalonia, H., & Kumar, A. (2010). Nitric oxide mechanism in the protective effect of antidepressants against 3-nitropropionic acid-induced cognitive deficit, glutathione and mitochondrial alterations in animal model of Huntington's disease. *Wolters Kluwer Health* , 21(3), 217-229. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20480544>

Kumar, P., Kalonia, H., Kumar, A., & Goyal, A. (2010). 3-Nitropropionic acid-induced neurotoxicity as an experimental model of Huntington's disease: Possible behavioral, biochemical and cellular alterations. *Pharmacology Division, University Institute of Pharmaceutical Sciences, UGC Centre of Advanced Study* ,1(1), 26-38. Recuperado de: http://www.researchgate.net/publication/46217253_3-Nitropropionic_acid-induced_neurotoxicity_as_an_experimental_model_of_Huntingtons_disease_Possible_behavioral_biochemical_and_cellular_alterations

Lee, J., Kosaras, B., Del Signore, M. S., Cormier, K., & McKee, A. (2011). Modulation of lipid peroxidation and mitochondrial function by nordihydroguaiaretic acid (NDGA) improves neuropathology in Huntington's disease mice. *NIH* ,121(4), 487–498. doi: 10.1007/s00401-010-0788-5

Lim, S., Chesser, A. S., Grima, J. C., Rappold, P. M., Blum, D., Przedborski, S., et al. (2010). D-b-Hydroxybutyrate Is Protective in Mouse Models of Huntington's Disease. *Plos One* ,6(9), 1-10. doi: 10.1371/journal.pone.0024620

Maldonado, A, Jorrín, J. (2013) Electroforesis desnaturalizante en geles depoliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana*, 1(1),1-16, Recuperado de:<http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/16%20ELECTROFORESIS%20GELES%20PAA.pdf>

Mamber, C., Kamphuis, W., Haring, N. L., Peprah, N., & Middeldorp, J. (2012). GFAPd Expression in Glia of the Developmental and Adolescent Mouse Brain. *Plos*

One ,7(12), 1-16. Recuperado de:http://www.researchgate.net/publication/234040968_GFAP_Expression_in_Glia_of_the_Developmental_and_Adolescent_Mouse_Brain

McBride, J. L., . Boudreau, R. L., Harper, S. Q., Staber, P. D., Monteys, A. M., Martins, I., et al. (2008). Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: Implications for the therapeutic development of RNAi, 105(15), 5868–5873. doi: 10.1073/pnas.0801775105.

Middeldorp, J., & Hol, E. (2011). GFAP in health and disease. *ELSEVIER* , 93(3), 421–443. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.01.005

Miller, J. P., Holcomb, J., Al-Ramahi², I., de Haro, M., Gafni, J., Zhang, N., et al. (2010). Matrix Metalloproteinases are Modifiers of Huntingtin Proteolysis and Toxicity in Huntington’s Disease. *National of Health Institute* , 67(2), 199–212. doi: 10.1016/j.neuron.2010.06.021

Misiak, M., Singh, S., Drewlo, S., Beyer, C., & Arnold, S. (2010). Brain region-specific vulnerability of astrocytes in response to 3-nitropropionic acid is mediated by cytochrome c oxidase isoform expression. *Springer* , 341(1), 83–93. doi: 10.1007/s00441-010-0995-3

Mochel, F., Durant, B., Meng, X., O’Callaghan, J., Yu, H., Brouillet, E., et al. (2012). Early Alterations of Brain Cellular Energy Homeostasis in Huntington Disease Models. *The Journal of Biological Chemistry* , 32(11), 1361–1370. doi: 10.1038/jcbfm.2012.104

Nakamura López, Y., Esparza Aguilar, M. d., & Lorena Garrido Olvera. (2009). Aplicaciones terapéuticas del ARN de interferencia. *Bioquimia* , 34(1), 26-37. Recuperado de: <http://www.medigraphic.com/pdfs/bioquimia/bq-2009/bq091e.pdf>

Osorio, A. f. (2006). Ética en la investigación con modelos animales experimentales. Alternativas y las 3 RS de Russel. Una responsabilidad y un compromiso ético que nos compete a todos. *Revista Colombiana de Bioética* , 1(1), 163-183. Recuperado de: http://www.fveter.unr.edu.ar/upload/Colombia_Inv_en_Animal189217283010.pdf

Perez De la Cruz, V., & Santamaría. (2007). Integrative Hypothesis for Huntington's Disease: A Brief Review of Experimental Evidence. *Physiological Research* ,56(1), 513-526. Recuperado de: http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/56/56_513.pdf

Puneet, K., Harikesh, K., Anil, & Kumar. (2010). Possible nitric oxide modulation in protective effect of FK-506 against 3-nitropropionic acid- behavioral, mitochondrial. *Drug and Chemical Toxicology* , 33(4), 377–392. doi: 10.3109/01480541003642050

Rodríguez, E., Rivera, I., Astorga, Mendoza, & Echeagaray, H. (2010). Uncoupling oxidative/energy metabolism with low sub chronic doses of 3-nitropropionic acid or iodoacetate in vivo produces striatal cell damage. *International Journal of Biological Sciences* , 6(3), 199-212. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2862394/pdf/ijbsv06p0199.pdf>

Sandhir, R., Sood, A., Mehrotra, A., & Kamboj, S. S. (2012). N -Acetylcysteine Reverses Mitochondrial Dysfunctions and Behavioral Abnormalities in 3-Nitropropionic Acid-Induced Huntington's Disease. *Neurodegenerative Diseases* , 8(25), 145–157. Recoperado de: http://www.academicjournals.org/article/article1405596519_Oliveira%20et%20al.pdf

Schulte, J., Sepp, K. J., Wu, C., Hong, P., & Littleton, J. T. (2011). High-Content Chemical and RNAi Screens for Suppressors of Neurotoxicity in a Huntington's Disease Model. *Plos One* , 6(8), 1-13. doi: 10.1371/journal.pone.0023841

Technology, L. (2011). Silencer® Select Pre-designed and Validated siRNA, In Vivo Ready. *Life Technology Corporation* , Recuperado de: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_055803.pdf

Tkac, I., Henry, P.-G., Zacharoff, L., Wedel, M., Gong, W., Deelchand, D. K., et al. (2012). Homeostatic adaptations in brain energy metabolism in mouse models of Huntington disease. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* , 32(11), 1977–1988. doi 10.1038/jcbfm.2012.104.

Túnez, I., Tasset, I., Pérez De La Cruz, V., & Santamaría, A. (2010). 3-Nitropropionic Acid as a Tool to Study the Mechanisms Involved in Huntington's Disease: Past, Present and Future. *Molecules* , 15(2), 878-916. doi: 10.3390/molecules15020878

Ventura, I., Russo, M. T., De Nuccio, M. T., De Luca, G., Degan, P., Bernardo, A., et al. (2013). hMTH1 expression protects mitochondria from Huntington's disease-like impairment. *Elsevier* ,49(1), 148–158. doi: 10.1016/j.nbd.2012.09.002

Zheng, S., Clabough, E. B., Sarkar, S., Futter, M., Rubinsztein, D. C., & Zeitlin, S. O. (2010). Deletion of the Huntingtin Polyglutamine Stretch Enhances Neuronal Autophagy and Longevity in Mice. *Plos Genetics* , 6(2), 1-15. doi: 10.1371/journal.pgen.1000838

4.6 ANEXOS

4.6.1 Anexo N°1: Ficha de Datos de Seguridad de Ácido 3-Nitropropiónico

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD

de acuerdo el Reglamento (CE) No. 1907/2006
Versión 5.0 Fecha de revisión 11.10.2012
Fecha de impresión 24.06.2013

GENERIC EU MSDS - NO COUNTRY SPECIFIC DATA - NO OEL DATA

1. IDENTIFICACIÓN DE LA SUSTANCIA O LA MEZCLA Y DE LA SOCIEDAD O LA EMPRESA

1.1 Identificadores del producto

Nombre del producto : ácido 3-Nitropropionico

Referencia : N5636
Marca : Sigma
No. CAS : 504-88-1

1.2 Usos pertinentes identificados de la sustancia o de la mezcla y usos desaconsejados

Usos identificados : Reactivos para laboratorio, Fabricación de sustancias

1.3 Datos del proveedor de la ficha de datos de seguridad

Compañía : Sigma-Aldrich
3050 Spruce Street
SAINT LOUIS MO 63103
USA

Teléfono : +1 800-325-5832
Fax : +1 800-325-5052

1.4 Teléfono de emergencia

Teléfono de Urgencia : (314) 776-6555

2. IDENTIFICACIÓN DE LOS PELIGROS

2.1 Clasificación de la sustancia o de la mezcla

Clasificación de acuerdo con el Reglamento (CE) 1272/2008 [UE-GHS/CLP]

Toxicidad aguda, Oral (Categoría 3)

Irritación cutánea (Categoría 2)

Irritación ocular (Categoría 2)

Toxicidad específica en determinados órganos - exposición única (Categoría 3)

Clasificación de acuerdo con las Directivas de la UE 67/548/CEE ó 1999/45/CE
Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias. Tóxico por ingestión.

2.2 Elementos de la etiqueta

Etiquetado de acuerdo con el Reglamento (CE) 1272/2008 [UE-GHS/CLP]

Pictograma



Palabra de advertencia : Peligro

Indicación(es) de peligro

H301 : Tóxico en caso de ingestión.
H315 : Provoca irritación cutánea.
H319 : Provoca irritación ocular grave.
H335 : Puede irritar las vías respiratorias.

Declaración(es) de prudencia

P261 : Evitar respirar el polvo/ el humo/ el gas/ la niebla/ los vapores/ el aerosol.
P301 + P310 : EN CASO DE INGESTIÓN; Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico.
P305 + P351 + P338 : EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto

cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.

Declaración Suplementaria del Peligro : ninguno(a)

De acuerdo con la Directiva Europea 67/548/CEE, y sus enmiendas.

Símbolo(s) de peligrosidad



Frase(s) - R

R36/37/38

R25

Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias.

Tóxico por ingestión.

Frase(s) - S

S26

En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.

En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta).

S45

2.3 Otros Peligros - ninguno(a)

3. COMPOSICIÓN/INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES

3.1 Sustancias

Formula : C₃H₅NO₄

Peso molecular : 119,08 g/mol

Componente	Concentración
3-Nitropropionic acid	
No. CAS	504-88-1
No. CE	208-003-0

4. PRIMEROS AUXILIOS

4.1 Descripción de los primeros auxilios

Recomendaciones generales

Consultar a un médico. Mostrar esta ficha de seguridad al doctor que esté de servicio.

Si es inhalado

Si aspiró, mueva la persona al aire fresco. Si ha parado de respirar, hacer la respiración artificial.

Consultar a un médico.

En caso de contacto con la piel

Eliminar lavando con jabón y mucha agua. Llevar al afectado en seguida a un hospital. Consultar a un médico.

En caso de contacto con los ojos

Lávese a fondo con agua abundante durante 15 minutos por lo menos y consulte al médico.

Si es tragado

Nunca debe administrarse nada por la boca a una persona inconsciente. Enjuague la boca con agua. Consultar a un médico.

4.2 Principales síntomas y efectos, agudos y retardados

4.3 Indicación de toda atención médica y de los tratamientos especiales que deban dispensarse inmediatamente

sin datos disponibles

MEDIDAS DE LUCHA CONTRA INCENDIOS	
t) Propiedades comburentes	sin datos disponibles
9.2 Otra información de seguridad sin datos disponibles	
10. ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD	
10.1 Reactividad	sin datos disponibles
10.2 Estabilidad química	sin datos disponibles
10.3 Posibilidad de reacciones peligrosas	sin datos disponibles
10.4 Condiciones que deben evitarse	sin datos disponibles
10.5 Materiales incompatibles	Bases, Oxidantes, Agentes reductores
10.6 Productos de descomposición peligrosos	Otros productos de descomposición peligrosos - sin datos disponibles
11. INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA	
11.1 Información sobre los efectos toxicológicos	
Toxicidad aguda DL50 Oral - ratón - 68,1 mg/kg Observaciones: Conducta: Ataxia	
Corrosión o irritación cutáneas sin datos disponibles	
Lesiones o irritación ocular graves sin datos disponibles	
Sensibilización respiratoria o cutánea sin datos disponibles	
Mutagenicidad en células germinales Se han observado efectos mutagénicos en experimentos de laboratorio.	
Carcinogenicidad IARC: No se identifica ningún componente de este producto, que presente niveles mayores que o igual a 0,1% como agente carcinógeno humano probable, posible o confirmado por la (IARC) Agencia Internacional de Investigaciones sobre Carcinógenos.	
Toxicidad para la reproducción sin datos disponibles	
Toxicidad específica en determinados órganos - exposición única Inhalación - Puede irritar las vías respiratorias.	
Toxicidad específica en determinados órganos - exposiciones repetidas sin datos disponibles	
Peligro de aspiración sin datos disponibles	
Efectos potenciales sobre la salud	
Inhalación	Puede ser nocivo si se inhala. Provoca una irritación del tracto respiratorio.
Ingestión	Tóxico si se ingiere.
Piel	Puede ser nocivo si es absorbido por la piel. Provoca irritaciones de la piel.
Ojos	Provoca irritación ocular grave.

Información Adicional
RTECS: UF6220000

12. INFORMACIÓN ECOLÓGICA		
12.1 Toxicidad	sin datos disponibles	
12.2 Persistencia y degradabilidad	sin datos disponibles	
12.3 Potencial de bioacumulación	sin datos disponibles	
12.4 Movilidad en el suelo	sin datos disponibles	
12.5 Resultados de la valoración PBT y mPmB	sin datos disponibles	
12.6 Otros efectos adversos	sin datos disponibles	
13. CONSIDERACIONES RELATIVAS A LA ELIMINACIÓN		
13.1 Métodos para el tratamiento de residuos	Producto Ofertar el sobrante y las soluciones no-aprovechables a una compañía de vertidos acreditada. Para la eliminación de este producto, dirigirse a un servicio profesional autorizado. Disolver o mezclar el producto con un solvente combustible y quemarlo en un incinerador apto para productos químicos provisto de postquemador y lavador. Envases contaminados Eliminar como producto no usado.	
14. INFORMACIÓN RELATIVA AL TRANSPORTE		
14.1 Número ONU	ADR/RID: 2811	IMDG: 2811 IATA: 2811
14.2 Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas	ADR/RID: SÓLIDO ORGÁNICO TÓXICO, N.E.P. (3-Nitropropionic acid) IMDG: TOXIC SOLID, ORGANIC, N.O.S. (3-Nitropropionic acid) IATA: Sólido tóxico, orgánico, n.e.p. (3-Nitropropionic acid)	
14.3 Clase(s) de peligro para el transporte	ADR/RID: 6.1	IMDG: 6.1 IATA: 6.1
14.4 Grupo embalaje	ADR/RID: III	IMDG: III IATA: III
14.5 Peligros para el medio ambiente	ADR/RID: no	IMDG Contaminante marino: no IATA: no
14.6 Precauciones particulares para los usuarios	sin datos disponibles	
15. INFORMACIÓN REGLAMENTARIA		
La hoja técnica de seguridad cumple con los requisitos de la Reglamento (CE) No. 1907/2006.		
15.1 Reglamentación y legislación en materia de seguridad, salud y medio ambiente específicas para la sustancia o la mezcla	sin datos disponibles	
15.2 Evaluación de la seguridad química	sin datos disponibles	

4.6.2 Anexo N°2: Ficha de Datos de Seguridad de GFAP



FLEX
Polyclonal Rabbit
Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein
Ready-to-Use
(Link)

Code IR524

ENGLISH	
Intended use	For in vitro diagnostic use. FLEX Polyclonal Rabbit Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein, Ready-to-Use (Link), is intended for use in immunohistochemistry together with Autostainer Link Instruments. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is the principal intermediate filament of mature astrocytes (1), and this antibody is useful for the identification of astrocytes in the central nervous system (CNS) under normal and pathological conditions (2-4). The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.
Summary and explanation	GFAP is a 50 kDa intracytoplasmic filamentous protein that constitutes a portion of the cytoskeleton in astrocytes, and it has proved to be the most specific marker for cells of astrocytic origin. In the central rod domain of the molecule, GFAP shares considerable structural homology with the other intermediate filaments (5). Functionally, GFAP is thought to be important in astrocyte motility and shape by providing structural stability to astrocyte processes (1). Following injury to the human CNS caused by trauma, genetic disorders, or chemicals, astrocytes proliferate and show extensive hypertrophy of the cell body and processes, and GFAP is markedly upregulated. In contrast, with increasing astrocyte malignancy, there is a progressive loss of GFAP production. Thus, malignant astrocytomas have fewer tumour cells that stain positively and intensely for GFAP than do less malignant astrocytomas and normal brain specimens (5). Outside the CNS, sensitive detection methods may demonstrate GFAP in Schwann cells, enteric glia cells, salivary gland neoplasms, and metastasizing renal carcinomas. Additionally, GFAP immunoreactivity has been demonstrated in epiglottic cartilage, pituitaries, immature oligodendrocytes, papillary meningiomas (1), and myoepithelial cells of the breast (6). Refer to Dako's <i>General instructions for immunohistochemical staining</i> or the detection system instructions of IHC procedures for: 1) Principle of Procedure, 2) Materials Required, Not Supplied, 3) Storage, 4) Specimen Preparation, 5) Staining Procedure, 6) Quality Control, 7) Troubleshooting, 8) Interpretation of Staining, 9) General Limitations.
Reagent provided	Ready-to-use polyclonal rabbit antibody provided in liquid form in a buffer containing stabilizing protein and 0.015 mol/L sodium azide.
Immunogen	GFAP isolated from cow spinal cord.
Specificity	The antibody has been solid-phase absorbed with human and cow serum proteins. In crossed immunoelectrophoresis using 50 µL concentrated antibody per cm ² gel area, no reaction with 2 µL human plasma and 2 µL cow serum is observed. The antibody shows one distinct precipitate (GFAP) with cow brain extract. Staining: Coomassie Brilliant Blue. In indirect ELISA, the antibody shows no reaction with human plasma and cow serum.
Precautions	1. For professional users. 2. This product contains sodium azide (NaN ₃), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing. 3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used. 4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin. 5. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.
Storage	Store at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.
Specimen preparation including materials required but not supplied	The antibody can be used for labeling formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Tissue specimens should be cut into sections of approximately 4 µm. Pre-treatment with heat-induced epitope retrieval (HIER) is required using Dako PT Link (Code PT100/PT101). For details, please refer to the PT Link User Guide. Optimal results are obtained by pre-treating tissues using EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8000/K8004). Paraffin-embedded sections: Pre-treatment of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using the 3-in-1 specimen preparation procedure for Dako PT Link. Follow the pre-treatment procedure outlined in the package insert for EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8000/K8004). Note: After staining the sections must be dehydrated, cleared and mounted using permanent mounting medium. De-paraffinized sections: Pre-treatment of de-paraffinized formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using Dako PT Link and following the same procedure as described for paraffin-embedded sections. After staining the slides should be mounted using aqueous or permanent mounting medium. The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of FLEX IHC Microscope Slides (Code K802D) is recommended.
Staining procedure including materials required but not supplied	The recommended visualization system is EnVision™ FLEX, High pH, (Link) (Code K8000). The staining steps and incubation times are pre-programmed into the Autostainer Link software. The recommended reagent application volume is 1 x 200 µL, or 2 x 150 µL per slide. Please refer to the proper Autostainer Link User Guide for detailed instructions on loading slides and reagents. If the protocols are not available

Staining interpretation	Cells labeled by the antibody display cytoplasmic staining.
Performance characteristics	Normal tissues: The antibody labels astrocytes in the brain (3), follicular-stellate cells of the pituitary gland (7), Schwann cells, and enteric glia cells. Additionally, myoepithelial cells of the breast (6) are labeled. In brain, the astrocytes show a moderate to strong staining reaction. In colon, the ganglion cells in the Auerbach and Meissner's plexus show weak to moderate staining reaction. No staining is observed in bladder, connective tissue, liver, lymphatic tissue, muscle, pancreas, skin and ureter. Abnormal tissues: All of 23 glioblastoma multiforme (GBM) were labeled by the antibody. In 20 of the 23 GBMs, at least 50% of malignant cells were positive for GFAP. Only 3 of 22 cases of carcinoma metastatic to the brain were labeled. This labeling was focal and limited to less than 10% of malignant cells (3). 5/5 hemispheric astrocytomas of the rare granular type showed focal GFAP positivity with the antibody (4), which also labeled 7/7 pleomorphic xanthoastrocytomas (8), and anterior lobe folliculo-stellate cells in 20/20 pituitary neoplasms (7). In medulloblastoma (MB) of the "desmoplastic variant", the antibody labeled 8/11 cases. The labeling appeared as focal areas of GFAP-positive cells with neoplastic morphology. Only 4/31 MBs of the "classic variant" showed this type of neoplastic cells. In classic MB GFAP-positive cells with the morphology of reactive astrocytes were observed in 27/31 cases (9). The antibody has also been shown to label 15/38 schwannomas (38%), and 2 cases of plexiform neurofibroma, while 16 cases of dermal neurofibroma were negative (10). In various neoplastic and non-neoplastic diseases of the breast, the percentage of myoepithelial cells reactive with the antibody was greatly increased as compared to the normal breast, while positivity was not encountered in the malignant cells of 183 breast carcinomas of different types (6). The antibody did not label meningiomas in a study including 36 patients (11).

FRANÇAIS	
Utilisation prévu	Pour utilisation lors d'un diagnostic in vitro. FLEX Polyclonal Rabbit Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein, Ready-to-Use, (Link), est destiné à une utilisation en immunohistochimie avec les Instruments Autostainer Link. La protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) est le principal filament intermédiaire des astrocytes matures (1) et cet anticorps est utile pour l'identification des astrocytes dans le système nerveux central (SNC) dans des conditions normales et pathologiques (2-4). L'interprétation clinique de toute coloration ou son absence doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée en fonction des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié.
Résumé et explication	La GFAP est une protéine filamenteuse intracytoplasmique de 50 kDa constituant une partie du cytosquelette des astrocytes. Il a été prouvé que cette protéine est le marqueur le plus spécifique des cellules d'origine astrocytaire. Dans le domaine central en forme de bâtonnet de la molécule, la GFAP partage une homologie de structure considérable avec les autres filaments intermédiaires (5). D'un point de vue fonctionnel, on pense que la GFAP est importante dans la motilité et la forme des astrocytes en fournissant une stabilité structurelle aux prolongements astrocytaires (1). À la suite d'une lésion du SNC humain provoquée par un traumatisme, des troubles génétiques ou des produits chimiques, les astrocytes prolifèrent et présentent une hypertrophie extensive du corps cellulaire et des prolongements. De plus, la GFAP fait l'objet d'une régulation positive conséquente. À l'opposé, lors d'une malignité croissante des astrocytes, il y a une perte progressive de la production de GFAP. Par conséquent, les astrocytomes malins présentent moins de cellules tumorales colorées positivement et intensément à la GFAP que les astrocytomes moins malins et les échantillons de cerveau sain (5). En dehors du SNC, des méthodes de détection sensibles peuvent montrer la présence de GFAP dans les cellules de Schwann, dans les cellules gliales entériques, dans les néoplasmes des glandes salivaires et dans les carcinomes rénaux métastatiques. De plus, la réactivité immunologique de la GFAP a été démontrée dans le cartilage épiglottique, les pituitaires, les oligodendrocytes immatures, les méningiomes papillaires (1) et les cellules myoépithéliales du sein (6). Se référer aux instructions générales de coloration immunohistochimique de Dako ou aux instructions du système de détection relatives aux procédures IHC pour plus d'informations concernant les points suivants : 1) Principe de procédure, 2) Matériaux requis mais non fournis, 3) Conservation, 4) Préparation des échantillons, 5) Procédure de coloration, 6) Contrôle qualité, 7) Dépannage, 8) Interprétation de la coloration, 9) Limites générales.
Réactifs fournis	Anticorps polyclonal de lapin prêt à l'emploi fourni sous forme liquide dans un tampon contenant une protéine stabilisante et 0,015 mol/L d'azide de sodium.
Immunogène	GFAP isolée à partir de moelle épinière bovine.
Spécificité	L'anticorps a été absorbé en phase solide en utilisant des protéines de sérums humain et bovin. Dans l'immunoelectrophorèse croisée avec 50 µL d'anticorps concentré par cm ² de gel, aucune réaction avec 2 µL de plasma humain et 2 µL de sérum bovin n'est observée. L'anticorps révèle un précipité net (GFAP) avec un extrait de cerveau bovin. Coloration : bleu de Coomassie. Lors d'un test ELISA indirect, l'anticorps ne présente aucune réaction avec le plasma humain et le sérum bovin.
Précautions	1. Pour utilisateurs professionnels. 2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN ₃), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques extrêmement explosives. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations. 3. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées. 4. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau. 5. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.
Conservation	Conservé entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'y a aucun signe évident indiquant l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être réalisés en même temps que les échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qu'il ne peut être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, et en cas de suspicion d'un problème lié à l'anticorps, contacter l'assistance technique de Dako.
Préparation des échantillons y compris le matériel requis mais non fourni	L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissu inclus en paraffine et fixés au formol. L'épaisseur des coupes d'échantillons de tissu doit être d'environ 4 µm. Un prétraitement avec démasquage d'épitope induit par la chaleur (HIER) est nécessaire avec le Dako PT Link (Ref. PT100/PT101). Pour plus de détails, se référer au Guide d'utilisation du PT Link. Des résultats optimaux sont obtenus en prétraitant les tissus à l'aide de la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Ref. K8000/K8004). Coupes incluses en paraffine : le prétraitement des coupes tissulaires fixées au formol et incluses en paraffine est recommandé à l'aide de la procédure de préparation d'échantillon 3-en-un pour le Dako PT Link. Suivre la procédure de prétraitement indiquée dans la notice de la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Ref. K8000/K8004). Remarque : après coloration, les coupes doivent être déshydratées, lavées et montées à l'aide d'un milieu de montage permanent.

4.6.3 Anexo N°3: Ficha de Datos de Seguridad de Invivofectamina



HOJA DE DATOS DE SEGURIDAD Fecha de revisión: 01-Dec-2010

Perspectiva General de Emergencia

Código del producto 100010181
Nombre del producto INVIVOFECTAMINE 2.0, 1ML

Identificación de la compañía o empresa

INVITROGEN CORPORATON
5791 VAN ALLEN WAY
PO BOX 6482
CARLSBAD, CA 92008
760-603-7200

GIBCO PRODUCTS
INVITROGEN CORPORATION
3175 STALEY ROAD P.O. BOX 68
GRAND ISLAND, NY 14072
716-774-6700

INVITROGEN CORPORATION
5250 MAINWAY DRIVE
BURLINGTON, ONT
CANADA L7L 6A4
800-263-6236

INVITROGEN CORPORATION NEW ZEALAND LIMITED
18 - 24 BOTHA ROAD
PENROSE
AUCKLAND 1006
NEW ZEALAND
+64 9 579 3024
0 800 600 200

GIBCO PRODUCTS
INVITROGEN CORPORATION
3175 STALEY ROAD P.O. BOX 68
GRAND ISLAND, NY 14072
716-774-6700

INVITROGEN AUSTRALIA PTY LIMITED
30-32 COMPARK CIRCUIT
MULGRAVE VIC 3170
AUSTRALIA
+61 3 9262 3700
1 800 331 627

Teléfono de emergencia 866-536-0631
301-431-8585
Outside of the U.S. ++1-301-431-8585

Úselo solamente para investigación.

2. Composición/Información sobre los ingredientes

Nombre químico	CAS No.	% en peso
Alcohol etílico	64-17-5	10-30, 15-40

3. Identificación de los peligros

Perspectiva General de Emergencia	
Líquido inflamable	Estado físico líquido

Efectos potenciales sobre la salud

Ojos No hay información disponible.
Piel No hay información disponible.
Inhalación No hay información disponible.
Ingestión La ingestión puede ocasionar irritación gastrointestinal, náusea, vómito y diarrea.

Efectos específicos

efectos carcinógenos No hay información disponible.
efectos mutágenos No hay información disponible.
Toxicidad a la reproducción Puede provocar efectos reproductores adversos - tal como defectos de nacimiento, abortos, o esterilidad.
Sensibilización No hay información disponible.

Efectos sobre los Órganos de Destino El acrilonitrilo líquido puede atacar a muchos plásticos, cauchos y recubrimientos.

HMIS

Salud	2
Inflamabilidad	3
Reactividad	0

4. Primeros auxilios

Contacto con la piel Lávese inmediatamente con agua abundante.
Contacto con los ojos Enjuague inmediatamente con abundante agua, también debajo de los párpados, por lo menos durante 15 minutos.
Ingestión Nunca debe administrarse nada por la boca a una persona inconsciente.
Inhalación Salga al aire libre.
Notas para el médico Trate sintómicamente.

5. Medidas de lucha contra incendios

Medios de extinción adecuados producto químico en polvo.
Equipo de protección especial para los bomberos Use equipo respiratorio autónomo y traje de protección.

6. Medidas que deben tomarse en caso de vertido accidental

Precauciones individuales Retire todas las fuentes de ignición.
Métodos de limpieza Empape con material absorbente inerte.

7. Manipulación y almacenamiento

Manipulación Use equipo de protección personal.
Almacenamiento Conserve el envase herméticamente cerrado en un lugar seco y bien ventilado. Manténgase separado del calor y de las fuentes de ignición.

8. Controles de exposición/protección personal

Control de exposición laboral

Límite(s) de exposición

Nombre químico	OSHA PEL	OSHA PEL (Ceiling)	ACGIH TLV	ACGIH OEL (STEL)
Alcohol etílico	1000 ppm 1900 mg/m ³	-	1000 ppm	-

Disposiciones de ingeniería Asegúrese que haya una ventilación adecuada, especialmente en locales cerrados

Protección personal

Protección respiratoria En caso de ventilación insuficiente, use equipo de respiración adecuado.

Protección de las manos guantes protectores.

Protección de los ojos Gafas protectoras con cubiertas laterales.

Protección de la piel y del cuerpo Ropa protectora ligera.

Medidas de higiene Manipúlelo con las precauciones de higiene industrial adecuadas, y respete las prácticas de seguridad.

Control de exposición ambiental Evite que el producto vaya al alcantarillado.

9. Propiedades físicas y químicas

Información General

Estado físico líquido

Información importante para la seguridad de la salud y del medio ambiente

Temperatura de ebullición/rango	°C sin datos disponibles	°F sin datos disponibles
Punto de fusión/rango	°C sin datos disponibles	°F sin datos disponibles
Punto de inflamación	°C sin datos disponibles	°F sin datos disponibles
Temperatura de auto-inflamación	°C sin datos disponibles	°F sin datos disponibles
Propiedades comburentes	No hay información disponible	
Hidrosolubilidad	soluble	

10. Estabilidad y reactividad

Estabilidad Peligro de Incendio.
Materias a evitar Agentes oxidantes fuertes.
Productos de descomposición peligrosos óxidos de carbono.

polimerización

La polimerización peligrosa no ocurre

11. Información toxicológica

Toxicidad aguda

Nombre químico	LD50 (oral, rat/mouse)	LD50 (dermal, rat/rabbit)	LC50 (inhalation, rat/mouse)
Alcohol etílico	7060 mg/kg (Rat) 124.7 mg/L (Rat)	7060 mg/kg (Rat) 124.7 mg/L (Rat)	64,000 ppm/4hr

Efectos potenciales sobre la salud

Ojos	No hay información disponible.
Piel	No hay información disponible.
Inhalación	No hay información disponible.
Ingestión	La ingestión puede ocasionar irritación gastrointestinal, náusea, vómito y diarrea.

Efectos específicos

efectos carcinógenos
efectos mutágenos
Toxicidad a la reproducción

(Long Term Effects)

No hay información disponible.
No hay información disponible.
Puede provocar efectos reproductores adversos - tal como defectos de nacimiento, abortos, o esterilidad.
No hay información disponible.

Sensibilización

Efectos sobre los Órganos de Destino

El acrilonitrilo líquido puede atacar a muchos plásticos, cauchos y recubrimientos.

12. Informaciones ecológicas

Efectos ecotoxicológicos	No hay información disponible.
Movilidad	No hay información disponible.
Biodegradación	No hay información disponible.
Bioacumulación	No hay información disponible.

13. Información relativa a la eliminación de los productos

Desechar de acuerdo con las regulaciones locales.

14. Información relativa al transporte

IATA

Denominación adecuada de envío	Ethanol solution
Clase de peligro	3
Clase subsidiaria	Ninguno(a)
Grupo de embalaje	III
No UN	UN1170

15. Información reglamentaria

Inventarios Internacionales

Nombre químico	TSCA	PICCS	ENCs	DSL	NDSL	AICS
Alcohol etílico	Listed	Listed	Listed	Listed	-	Listed

4.6.4 Anexo N°4: Inserto de *Silencer*® Seleccionado Pre-diseñado y Validado siRNA



***Silencer*® Select Pre-designed and Validated siRNA, In Vivo Ready**
Ambion® In Vivo Pre-designed and Custom Designed siRNA, In Vivo Ready or HPLC-purified
Custom Select siRNA and Ambion® In Vivo Custom siRNA, In Vivo Ready

Insert PN 4457172 Rev. C

Note: For all reagents, read the Safety Data Sheet (SDS) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves.

Product information

Ambion® *Silencer*® Select Pre-designed siRNAs are designed using a novel algorithm that was developed using the latest advances in machine-learning methods. These next-generation siRNAs exhibit up to 100-fold higher silencing potency than siRNAs from other leading siRNA manufacturers. In cell-based assays, off-target activity (assayed by microarray analysis) is reduced by up to 90% because *Silencer* Select siRNAs can be used at 5- to 20-fold lower concentrations, they are bio-informatically screened using the latest knowledge about miRNA seed regions and toxic sequence motifs, and they incorporate strategic chemical modifications. As a result, *Silencer* Select siRNAs provide unrivalled specificity and cleaner, more consistent phenotypic data.

Silencer Select Validated siRNAs have been verified experimentally in cell-based assays to reduce the expression of their individual target genes by 80% in at least 3 biological replicates.

Silencer Select Custom Designed siRNAs are designed to your specified target, using the same algorithm and with the same modifications as *Silencer* Select Pre-designed siRNAs.

Custom Select siRNAs are synthesized with your sequence, but they incorporate the same strategic chemical modifications, designed to block off-target activity, that are found in *Silencer* Select siRNAs.

Ambion In Vivo Pre-designed siRNAs are designed using the *Silencer* Select algorithm and incorporate additional chemical modifications for superior serum stability (half life >5 hours at 37 °C in 90% mouse serum) with *in vivo* applications. Ambion *In Vivo* siRNAs are non-toxic and non-immunogenic *in vitro* (peripheral blood nonnuclear cells; PBMC) and *in vivo* (mouse). In cell-based assays, Ambion *In Vivo* siRNAs exhibit potency and specificity equivalent to *Silencer* Select siRNAs.

Ambion In Vivo Custom Designed siRNAs are designed to your specified target, using the *Silencer* Select algorithm and Ambion *In Vivo* chemical modifications.

Ambion In Vivo Custom siRNAs are synthesized with your sequence, with Ambion *In Vivo* chemical modifications for serum stability.

In Vivo Ready siRNAs are high-quality siRNAs that are purified especially for introduction into animals. Each siRNA strand is individually purified by HPLC, desalted, and annealed with its complementary strand. In Vivo Ready siRNAs are then further purified using a process that removes excess salt via a semi-permeable membrane. The result is a highly pure siRNA with minimal salt content, suitable for *in vivo* applications. In Vivo Ready siRNAs are then filtered through a 0.2-µm pre-sterilized filter and tested for the presence of endotoxin.

At a concentration of 50 µM in de-ionized water, In Vivo Ready siRNA contains <5.0 mM Na⁺, <0.06 mM K⁺, and <0.02 mM Mg²⁺.

Handling instructions

RNA oligonucleotides such as siRNA are susceptible to degradation by exogenous ribonucleases introduced during handling.

- Wear gloves when handling this product.
- Use RNase-free reagents, tubes, and barrier pipette tips.
- Use standard biological sterile techniques when handling In Vivo Ready siRNA that will be administered to animals.

Storage of dried siRNA: Store at 4 °C, or in a non-frost-free freezer at or below -20 °C (dried oligonucleotides are shipped at ambient temperature). For long-term storage, store at or below -20 °C in a non-frost-free freezer.

Using In Vivo Ready siRNA with InvivoFectamine® 2.0 Reagent

InvivoFectamine® 2.0 Reagent (PN 1388501; www.invitrogen.com) is a proprietary, animal-origin-free, lipid-based transfection reagent that is designed for systemic, *in vivo* siRNA delivery to mouse liver tissue. InvivoFectamine 2.0 Reagent is ideally suited for use with Ambion *In Vivo* siRNA, with high *in vivo* transfection efficiency in liver following tail-vein injection. Low volume delivery of siRNA using low pressure, combined with the minimal toxicity of InvivoFectamine 2.0 Reagent, avoids a stress response in the animal.

Resuspension of siRNA for use with InvivoFectamine® 2.0 Reagent

1. Briefly centrifuge the tube to ensure that the dried siRNA is at the bottom of the tube.
2. Resuspend the siRNA in nuclease-free sterile water and vortex it thoroughly resuspend.

For best results, prepare the siRNA stock solution at the highest concentration that is workable for your experiments. Dilute the siRNA stock as needed for immediate use.

The working siRNA concentration for use with InvivoFectamine 2.0 Reagent is 200 µM [-3 mg/mL].

A calculator for suspension of dried oligonucleotides is available at: www.appliedbiosystems.com/techlib/append/oligo_dilution.html

Storage of resuspended siRNA: Store at or below -20 °C. siRNA stock solutions at concentrations ≥2 µM can undergo up to 50 freeze-thaw cycles without significant degradation. Storage in a frost-free freezer is not recommended, however.

Long-term storage at -70 °C has traditionally been recommended, but siRNA stock solutions at concentrations ≥2 µM can be stored at -20 °C for extended periods (up to 1 year).

Preparation of InvivoFectamine® 2.0 Reagent-siRNA complexes and *in vivo* delivery

Follow the instructions provided with InvivoFectamine 2.0 Reagent, available at the web catalog page at www.invitrogen.com [search for InvivoFectamine 2.0 Reagent]. An siRNA dose of 7 mg/kg is recommended as a starting point for experiments. This dose corresponds to 200 µL of a 0.7 mg/mL solution injected into a 20-g mouse.

Using In Vivo Ready siRNA with other *in vivo* delivery strategies

Resuspension of In Vivo Ready siRNA

Follow the instructions for resuspension on page 1. At step 2, resuspend the siRNA in sterile water or a sterile buffer appropriate for your application. Common examples are provided below.

Commonly used sterile buffers for <i>In vivo</i> delivery	
Systemic delivery	<ul style="list-style-type: none"> • Phosphate buffered saline (PBS) • Saline (0.9% NaCl), or variants containing sugars such as mannitol or glucose [5-15%] • Ringer's solution: 147 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.13 mM CaCl₂
Central nervous system delivery	<ul style="list-style-type: none"> • Saline (0.9% NaCl) • Isotonic buffer (100 mM potassium acetate, 30 mM HEPES-KOH, 2 mM magnesium acetate, 26 mM NaCl, pH 7.4)

Store resuspended siRNA as described on page 1.

Suggested dosing for a 20-g mouse

A typical volume for systemic delivery is ~200 µL (for low pressure injection) at concentrations of 50 to 500 µM. This combination corresponds to an siRNA dosing range of 5 to 50 mg/kg for a 20-g mouse.

Dose (mg/kg)	nmol siRNA/Dose	Concentration for 200-µL Dose (µM) [†]
1.0	1.5	7.4
5.0	7.4	37.0
10.0	14.8	74.0
20.0	29.6	148.0
50.0	74.0	370.0

[†] In Vivo Ready siRNAs are soluble in aqueous solution at concentrations 4.5 mM.

For more information

Visit these web resources for more information on buffers, injection routes, and dosing strategies for *in vivo* siRNA delivery:

- www4.appliedbiosystems.com/RNAi/invivo
- www.invitrogen.com > Products & Services > Applications > RNAi, Epigenetics & Gene Regulation > RNAi > *in vivo* RNAi > *in vivo* RNAi Protocols

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT INTENDED FOR ANY ANIMAL OR HUMAN THERAPEUTIC OR DIAGNOSTIC USE.

Information in this document is subject to change without notice. Ambion, a part of Life Technologies Corporation, assumes no responsibility for any errors that may appear in this document. LIFE TECHNOLOGIES AND/OR ITS AFFILIATE(S) DISCLAIM ALL WARRANTIES WITH RESPECT TO THIS DOCUMENT, EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THOSE OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, IN NO EVENT SHALL LIFE TECHNOLOGIES AND/OR ITS AFFILIATE(S) BE LIABLE, WHETHER IN CONTRACT, TORT, WARRANTY, OR UNDER ANY STATUTE OR ON ANY OTHER BASIS FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THE USE THEREOF.

Safety Data Sheets: Safety Data Sheets (SDSs) are available from www.appliedbiosystems.com/sds.

Warranty and Liability: Ambion, a part of Life Technologies Corporation, is committed to delivering superior product quality and performance, supported by industry-leading global service and technical support teams. Warranty information for the accompanying consumable product is available at www.ambion.com/invowarranty in "Limited Warranty for Consumables," which is subject to the exclusions, exceptions, and limitations set forth under the caption "EXCLUSIONS, CONDITIONS, EXCEPTIONS, AND LIMITATIONS" in the full warranty statement. Please contact Ambion if you have any questions about our warranties or would like information about post-warranty support.

Trademarks, Patents, and Licensing: The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies Corporation or their respective owners.

Limited Use Label License

The purchase of this product conveys to the purchaser the limited, non-transferable right to use the purchased amount of the product only to perform internal research for the sole benefit of the purchaser. No right to resell this product or any of its components is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for internal research purposes only and is not for use in commercial services of any kind, including, without limitation, reporting the results of purchaser's activities for a fee or other form of consideration. For information on obtaining additional rights, please contact outlicensing@lifetechn.com or Our Licensing, Life Technologies, 3791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008.

This product is licensed by Alnylam Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, USA and is provided only for use in academic and commercial research including *in vitro* and *in vivo* identification and validation of drug targets (but excluding the evaluation or characterization of this product as the potential basis for a siRNA-based drug) and not for any other commercial purposes. Information about licenses for commercial use (including discovery and development of siRNA-based drugs) is available from Alnylam Pharmaceuticals, Inc., 300 Third Street, Cambridge, MA 02142, USA.

Locked Nucleic Acids are covered by patents and patent applications owned by Exigo A/S. This product is for research use only and not for diagnostic or therapeutic use. The products may be used only for the buyer's internal research purposes and not for commercial use except for providing a service to research customers. The buyer may not resell products in their original or any modified form.

Purchaser notification: Unless expressly stated, the purchase of this product conveys no license or grant of any intellectual property rights, whether express, implied, by estoppel or otherwise.
 © Copyright 2011, Life Technologies Corporation. All rights reserved.

Part Number 4457172 Rev. C 08/2011



Headquarters
 3791 Van Allen Way | Carlsbad, CA 92008 USA
 Phone 760.463.7200
www.lifetechnologies.com

Technical Resources and Support
 For the latest technical resources and support information for all locations, please refer to our Web sites
www.appliedbiosystems.com | www.invitrogen.com



4.6.5 Anexo N°5: Inserto de Factor VII siARN

Catalog #: 4459408, 4457292

Ambion® *In Vivo* Factor VII siRNA, *In Vivo* Ready

Store at or below -20°C .
Do not store in a frost-free freezer.

Catalog # (P/N):	4459408	4457292
Amount:	50 nmol	250 nmol
Appearance:	Powder	
Target Information:	<u>Gene Symbol:</u> F7 <u>Full Gene Name:</u> Coagulation factor VII <u>Organism(s):</u> Mouse (<i>Mus musculus</i>) <u>RefSeq Number(s):</u> NM_010172.3 <u>Entrez Gene ID(s):</u> 14068	

Format:	Annealed
Purity:	<i>In Vivo</i> Ready (HPLC purified)
Storage Conditions:	Store at or below -20°C . Do not store in a frost-free freezer. (Dried oligonucleotides are shipped at ambient temperature.)
Safety Information:	Read the Safety Data Sheet, and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves.

USER INFORMATION

Product Description: Ambion® *In Vivo* Factor VII siRNA, *In Vivo* Ready, provides a positive control for experiments involving Ambion *In Vivo* siRNA delivery to mice. Factor VII (FVII/F7; also known as proconvertin) is a vitamin K-dependent serine protease that functions as a central protein in the coagulation cascade. FVII is synthesized exclusively in the liver and secreted to the plasma where it circulates in an inactive form. After delivery of FVII-targeting siRNA to the liver, knockdown can be measured by quantifying FVII protein levels in blood by robust, commercially available chromogenic assays. Moreover, blood samples can be collected from the same animal at multiple time points post-siRNA injection. These features enable much more rapid and efficient knockdown measurements for FVII than for gene targets that require quantitation of mRNA levels in liver tissue, making FVII an ideal control for *in vivo* siRNA delivery to the liver.

Ambion *In Vivo* siRNAs are designed using the Silencer® Select siRNA algorithm. This novel algorithm was developed utilizing advanced machine-learning methods and bioinformatic screening using the latest knowledge about miRNA seed regions and toxic sequence motifs. Ambion *In Vivo* siRNAs incorporate additional chemical modifications for superior serum stability (half life >5 hours at 37°C in 90% mouse serum) with *in vivo* applications. Ambion *In Vivo* siRNAs are non-toxic and non-immunogenic *in vitro* (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) and *in vivo* (mouse). In cell-based assays, Ambion *In Vivo* siRNAs exhibit potency and specificity equivalent to Silencer Select siRNAs.

In Vivo Ready siRNAs are high quality siRNAs that are purified especially for introduction into animals. Each siRNA strand is individually purified by HPLC, desalted, and annealed with its complementary strand. *In Vivo* Ready siRNAs are then further purified utilizing a process that removes excess salt, via a semi-permeable membrane. The result is a highly pure siRNA with minimal salt content, suitable for *in vivo* applications. *In Vivo* Ready siRNAs are then filtered through a $0.2\ \mu\text{m}$ pre-sterilized filter and tested for the presence of endotoxin.

At a concentration of $50\ \mu\text{M}$ in de-ionized water, *In Vivo* Ready siRNA contains $<5.0\ \text{mM Na}^+$, $<0.06\ \text{mM K}^+$, and $<0.02\ \text{mM Mg}^{2+}$.

Handling Instructions: RNA oligonucleotides are susceptible to degradation by exogenous ribonucleases introduced during handling. Wear gloves when handling this product. Use RNase-free reagents, tubes, and barrier pipette tips.

Upon receipt, store dried oligonucleotides at 4°C , or in a non-frost-free freezer at or below -20°C (dried oligonucleotides are shipped at ambient temperature). For long-term storage, store at or below -20°C in a non-frost-free freezer.

Use standard biological sterile techniques when handling *In Vivo* Ready siRNA that will be administered to animals.



Using *In Vivo* Ready siRNA with Invivoectamine® 2.0 Reagent:

Invivoectamine® 2.0 Reagent (P/N 1388501) is a proprietary, animal-origin-free, lipid-based transfection reagent for systemic, *in vivo* siRNA delivery to mouse liver tissue. Invivoectamine 2.0 Reagent is ideally suited for use with Ambion *In Vivo* siRNA, with high *in vivo* transfection efficiency in liver following tail-vein injection. Low volume delivery of siRNA using low pressure, combined with the low toxicity of Invivoectamine 2.0 Reagent, avoids a stress response in the animal.

Resuspension of siRNA for use with Invivoectamine® 2.0 Reagent

- Briefly centrifuge the tube to ensure that the dried siRNA is at the bottom of the tube.
- Resuspend the siRNA in nuclease-free sterile water and vortex to thoroughly resuspend.
For best results, prepare the siRNA stock solution at the highest concentration that is workable for your experiments. Dilute the siRNA stock as needed for immediate use.
The working siRNA concentration for use with Invivoectamine 2.0 is $200\ \mu\text{M}$ (~3 mg/mL).

A calculator for suspension of dry oligonucleotides is available at:
www4.appliedbiosystems.com/techlib/append/oligo_dilution.html

Storage of resuspended siRNA: Store at or below -20°C . Stock solutions of siRNA at concentrations $\geq 2\ \mu\text{M}$ can undergo up to 50 freeze-thaw cycles without significant degradation. Storage in a frost-free freezer is not recommended, however. Long-term storage at -70°C has traditionally been recommended, but siRNA stock solutions at concentrations $\geq 2\ \mu\text{M}$ can be stored at -20°C for extended periods (up to 1 year).

Preparation of Invivoectamine® 2.0-siRNA complexes and *in vivo* delivery
Follow the instructions provided with Invivoectamine 2.0 Reagent, available at the web catalog page at www.invitrogen.com (search for Invivoectamine 2.0). An siRNA dose of 7 mg/kg is recommended as a starting point for experiments. This dose corresponds to $200\ \mu\text{L}$ of a $0.7\ \text{mg/mL}$ solution injected into a 20-g mouse.

Using *In Vivo* Ready siRNA with Other *In Vivo* Delivery Strategies:

Resuspension of *In Vivo* Ready siRNA
Follow the instructions for resuspension with use with Invivoectamine 2.0 Reagent. At step 2, resuspend the siRNA in sterile water or a sterile buffer appropriate for your application. Common examples are provided below.

Suggested Buffers for Systemic Delivery

- Sterile, phosphate buffered saline (PBS)
- Sterile saline (0.9% NaCl), or variants containing sugars such as mannitol or glucose (5–15%)
- Ringer's solution: 147 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.13 mM CaCl₂

Suggested Non-irritating Buffers for Central Nervous System Delivery

- Sterile saline (0.9% NaCl)
- Isotonic buffer (100 mM potassium acetate, 30 mM HEPES-KOH, 2 mM magnesium acetate, 28 mM NaCl, pH 7.4)

Store resuspended siRNA as described under "Resuspension of siRNA for use with Invivoectamine 2.0 Reagent."

Suggested dosing for a 20-g mouse

A typical volume for systemic delivery is ~200 μL (for low pressure injection) at concentrations of 50–500 μM . This combination corresponds to an siRNA dosing range of 5–50 mg/kg for a 20-g mouse.

Dose (mg/kg)	nmol siRNA/Dose	Concentration for 200 μL Dose (μM *)
1.0	1.5	7.4
5.0	7.4	37.0
10.0	14.8	74.0
20.0	29.6	148.0
50.0	74.0	370.0

* *In Vivo* Ready siRNAs are soluble in aqueous solution at concentrations up to 1.5 mM.

For more information

Visit these web resources for more information on buffers and injection routes:
www4.appliedbiosystems.com/RNAi/invivo

www.invitrogen.com > Products & Services > Applications > RNAi, Epigenetics & Gene Regulation > RNAi > *in vivo* RNAi > *in vivo* RNAi Protocols

RELATED PRODUCTS

Ambion® In Vivo Pre-designed and Validated siRNAs
P/N Various (see www4.appliedbiosystems.com/geneassist)
An all-new class of modified siRNAs with superior serum stability for in vivo applications, designed with the Silencer® Select algorithm. Ambion® In Vivo siRNAs are non-toxic in vivo (mouse) and non-immunogenic (cell-based assays), while exhibiting potency and specificity equivalent to or better than Silencer Select siRNAs.

Invivoectamine® 2.0 Reagent
P/N 1377-505, 1377-501
A proprietary lipid-based reagent designed to efficiently deliver siRNA to mouse liver tissue in an easy-to-complex preparation. See www.invitrogen.com.

TaqMan® Gene Expression Assays
www.allgenes.com or www4.appliedbiosystems.com/geneassist
A comprehensive collection of over 700,000 probe and primer sets for quantitative gene expression analysis using real-time PCR. Search the GeneAssist™ Atlas at www4.appliedbiosystems.com/geneassist to find suggested TaqMan Gene Expression Assays corresponding to your siRNA targets of interest.

QUALITY CONTROL

Identity: The mass of a sample of each single-stranded RNA oligonucleotide is analyzed using MALDI-TOF mass spectrometry and compared to the calculated mass.

Purity: Analytical HPLC of a sample of the final purified single-stranded RNA oligonucleotides is used to confirm ≥90% purity.

Annealing: A sample of the annealed siRNA is analyzed by nondenaturing gel electrophoresis.

Endotoxin: A *Limulus* Amebocyte Lysate (LAL) assay of a sample of the siRNA is used to confirm <10 Endotoxin Units (EU) per nmol.

OTHER INFORMATION

Safety Data Sheets: Safety Data Sheets (SDSs; previously known as MSDSs) for any chemical product supplied by Applied Biosystems or Ambion are available 24 hours a day. At www.appliedbiosystems.com, select Support, then SDS/MSDS. Search by chemical name, product name, product part number, or SDS/MSDS part number. Right-click to print or download the SDS of interest. At www.ambion.com, go to the web catalog page for the product of interest. Select SDS/MSDS, then right-click to print or download. Or, e-mail (MSDS Inquiry_CCRM@lifetech.com), telephone (650-554-2756; USA), or fax (650-554-2252; USA) your request, specifying the catalog or part number(s) and the name of the product(s). We will e-mail the associated SDSs unless you request fax or postal delivery. Requests for postal delivery require 1-2 weeks for processing.

Warranty and Liability: *For research use only. Not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.*

Ambion, a part of Life Technologies Corporation, is committed to delivering superior product quality and performance, supported by industry-leading global service and technical support teams. Warranty information for the accompanying consumable product is available at www.ambion.com/info/warranty in "Limited Warranty for Consumables," which is subject to the exclusions, conditions, exceptions, and limitations set forth under the caption "EXCLUSIONS, CONDITIONS, EXCEPTIONS, AND LIMITATIONS" in the full warranty statement. Please contact Ambion if you have any questions about our warranties or would like information about post-warranty support.

Information in this document is subject to change without notice. Ambion, a part of Life Technologies Corporation, assumes no responsibility for any errors that may appear in this document.

Trademarks, Patents, and Licensing: The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies Corporation or their respective owners. TaqMan is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc.

Limited Use Label License
The purchase of this product conveys to the purchaser the limited, non-transferable right to use the purchased amount of the product only to perform internal research for the sole benefit of the purchaser. No right to resell this product or any of its components is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for internal research purposes only and is not for use in commercial services of any kind, including, without limitation, reporting the results of purchaser's activities for a fee or other form of consideration. For information on obtaining additional rights, please contact outlicensing@lifetech.com or Out Licensing, Life Technologies, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008.

This product is licensed under European Patents 1144623, 1214945 and foreign equivalents from Ainyliam Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, USA and is provided only for use in academic and commercial research including in vitro and in vivo identification and validation of drug targets (but excluding the evaluation or characterization of this product as the potential basis for a siRNA-based drug) and not for any other commercial purposes. Information about licenses for commercial use (including discovery and development of siRNA-based drugs) is available from Ainyliam Pharmaceuticals, Inc., 300 Third Street, Cambridge, MA 02142, USA.

This product is covered by U.S. Patent Nos. 6,506,559; 7,056,704 and 7,078,196.

Locked Nucleic Acids are covered by patents and patent applications owned by Exiqon A/S. This product is for research use only and not for diagnostic or therapeutic use. The products may be used only for the buyer's internal research purposes and not for commercial use except for providing a service to research customers. The buyer may not resell products in their original or any modified form.

4.6.6 Anexo N°6: Ficha de Datos de Seguridad de Acrilamida



3050 Spruce Street
Saint Louis, Missouri 63103 USA
Telephone (800) 325-8832 (314) 771-5765
Fax (314) 266-7926
email: techserv@sigma.com
sigma-aldrich.com

Product Information

ACRYLAMIDE
MOLECULAR BIOLOGY REAGENT
Sigma Prod. No. A 9099

STRUCTURE: CH₂=CH-CO-NH₂
CAS NUMBER: 79-06-1
SYNONYM: 2-propenamida

Product Description

Appearance: White powder
Molecular formula: C₃H₅NO
Molecular weight: 71.08
Melting point: 84.5 °C, although stable in the dark, it readily polymerizes at its melting point, in solution or under ultraviolet light.¹
Special tests: DNase, RNase and Protease were not detected per procedures on lot-specific data sheet.

Acrylamide as a monomer is used in a variety of synthetic processes to form polymers, copolymers. It is readily polymerized in the presence of free radicals, usually in aqueous solutions. Polyacrylamide plastics have numerous commercial applications, due in part to the tendency of polyacrylamide to adsorb many times its own mass in water.

In biochemistry, its principle use is in the preparation of polyacrylamide gels, using suitable cross-linkage agents, for use in electrophoresis separation techniques. Common reaction initiators are riboflavin, ammonium persulfate; varying the ratio of acrylamide to crosslinking agent permits the formation of a gel with predictable average pore size and texture. A number of excellent laboratory manuals give specific protocols for preparing "PAGE" (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) gels; see page 2 for a partial reference list. Acrylamide has a tendency to hydrolyze under acidic or basic conditions to form acrylic acid.

Acrylic acid and any ionic impurities in the acrylamide can have significant effects on the performance of the PAGE gel formed, since the voltage across the gel is affected by the ionic charge of the gel and usage buffers. Sigma tests each lot of A9099 for its suitability for use in electrophoresis of nucleic acids (more detail is available on lot-specific information sheets sent with the product.) Several other products are also available:

A 3553, Electrophoresis Reagent, which has a higher purity specification and additional testing for trace impurities, solution conductivity and acrylic acid content; and A 4058, which is a ready-to-use 40% solution prepared from A 3553; A8887 is also of high purity, but has not received as extensive testing for application suitability.

NOTE:

Acrylamide as a monomer is considered toxic, directly affecting the nervous system, and it may reasonably be considered to be a carcinogen.⁴ Acrylamide is readily absorbed through intact skin from aqueous solutions.¹ Please consult the Material Safety Data Sheet and appropriate safety procedures before handling this material. Once polymerized, the solid POLYacrylamide is considered quite safe, although PAGE gels should still be handled with gloves under the assumption that they may still contain unreacted monomer.

Storage/Stability

If acrylamide is kept protected from light, it is expected to be stable indefinitely at room temperature. After three weeks storage at 50 °C, there is no evidence of polymer formation and only slight yellowing occurs. Even after 24 hours at 80 °C (slightly below melting), pure samples show little or no polymer formation.³ It should be evaluated for continued suitability every three years.

Acrylamide is routinely tested at 250 mg/mL in water, giving a clear colorless solution. It is soluble in at least 40% (w/v) in water², and reportedly up to 215 g/100 mL in water at 30 °C.¹ It is soluble in methanol (155 g/100 mL), ethanol (86 g/100 mL), acetone (83.1 g/100 mL); only minimally soluble in benzene or heptane.¹

Solutions should be stable at 2-8 °C for at least a year if stored protected from light.²

References

1. Merck Index, 12th Ed., #131 (1996).
2. Sigma data.
3. Supplier information.
4. Sigma Material Safety Data Sheet.


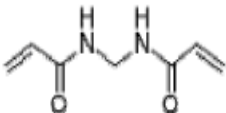

Additional Usage References:

1. *Protein Structure: A Practical Approach*, ed. T.E. Creighton (IRL PRESS, 1990), pages: 4-8, 36-38, 523-55, 79-80, 150-151, 233-234.
2. *Gel Electrophoresis: Essential Data*, D. Patel (Wiley Press, 1994) - A small book with extensive recipes for gel production.
3. *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*, 2nd Ed., eds. B.D. Hames and D. Rickwood (IRL Press, 1994)
4. *Electrophoresis: Theory, Techniques, and Biochemical and Clinical Applications*, 2nd Ed., A.T. Andrews (Oxford University Press, 1986).

JWM 5/29/2003

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc. Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.

4.6.7 Anexo N°7: Ficha de Datos de Seguridad de NN-Metilenbisacrilamida

SECCION I. DATOS GENERALES DE LAS HDS Proveedor: Sigma-Aldrich Química, S. de R. L. de C.V.. Parque Industrial Toluca 2000 Calle 6 Norte No. 107. 50200 Toluca, México Teléfono: +(55) (0) 1-800-007-5300 Emergencias: 1-800-521-8956				-Color: Blanco -Olor: S/D -Solubilidad en agua: 20mg/mL (20°C), totalmente soluble.			
SECCION II. DATOS DE LA SUSTANCIA QUIMICA PELIGROSA -Formula química: C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂ -Nombre químico: N,N'-Metilenbisacrilamida Sinónimos: Bis-acrilamida, N,N'- Metilenbis(2-propenamida), Metilendiacrilamida.				SECCION V. RIESGOS DE FUEGO O EXPLOSION -Medios de Extinción: Usar agua pulverizada, espuma resistente al alcohol, polvo seco o dióxido de carbono. -Equipo de protección especial de lucha contra incendios: Si es necesario, usar equipo de respiración autónomo para la lucha contra el fuego.		-Productos de combustión peligrosos: Productos de descomposición peligrosos formados en condiciones de incendio, oxido de carbono, oxido de nitrógeno (NOx) 	
SECCION III. IDENTIFICACION DE SUSTANCIA QUIMICA PELIGROSA No. CAS: 110-26-9 No. ONU: S/D LMPE-PPT, LMPE-CT y LMPE-P: DL50 Oral-rata- 390 mg/kg IPVS(IDLH): S/D RIESGO A LA SALUD: 2 Inhalación: Puede ser nocivo si se inhala. Provoca una irritación del tracto respiratorio. Piel: Puede ser nocivo si se absorbe por la piel y provocar irritación Ingestión: Tóxico si se ingiere RIESGO DE INFLAMABILIDAD: 0 RIESGO DE REACTIVIDAD: 0							
SECCION IV. PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS -Temperatura de ebullición: S/D -Temperatura de fusión: >300 °C (>572 °F) -Temperatura de inflamación: S/D -Temperatura de ignición: S/D -Densidad: 1.2 g/cm ³ -Ph: >5 (2.5% soln), solución acuosa -Estado físico: Sólido							
SECCION VI. REACTIVIDAD -Estabilidad: El producto es químicamente estable bajo condiciones de almacenamiento normales. -Inestabilidad: Evitar exposición al aire. -Incompatibilidad: ácidos, bases, oxidantes, agentes reductores, hierro, sales férricas, cobre, aluminio, latón, iniciadores de radicales libres. -Productos peligrosos de la descomposición: Productos de descomposición peligrosos formados en condiciones de incendio, óxidos de carbono y nitrógeno. -Posibilidad de reacciones peligrosas: S/D							
SECCION VII. RIESGOS A LA SALUD Y PRIMEROS AUXILIOS Según Vía de Ingreso al Organismo: -Ingestión: Tóxico si se ingiere. -Inhalación: Puede ser nocivo si se inhala. Puede provocar una irritación en el tracto respiratorio. -Contacto con la piel: Puede ser nocivo si es absorbido por la piel, puede causar irritación en la piel. Eliinar lavando con mucho jabón y abundante agua. -Contacto con ojos: Provoca irritación ocular. Lavarse abundantemente los ojos con agua como medida de precaución. Sustancia Química Considerada como: -Mutagenica: S/D Otros Riesgos o Efectos para la Salud Antídotos: S/D							
SECCION VIII. INDICACIONES EN CASO DE FUGA O DERRAMES Procedimiento y precauciones inmediatas - Utilizar equipo de protección individual. Evitar la formación de polvo, evitar respirar los vapores, la neblina o el gas. Asegúrese de una ventilación adecuada. Evitar despirar el polvo. No dejar el producto en un sistema de alcantarillado. - Recoger y reparar eliminación sin originar polvo. Limpiar y traspalar. Guardar en contenedores cerrados para su eliminación.							
SECCION IX. PROTECCION ESPECIAL ESPECIFICA PARA SITUACIONES DE EMERGENCIA							

-Protección de los ojos /cara: Gafas de seguridad con protecciones laterales.
-Protección de las manos sumersión: Guante de caucho nitrilo de 0.11mm de espesor tiempo de perforación de >480min
-Protección respiratoria: Mascarilla con un filtro recomendado P95 o tipo P1.

SECCION X. INFORMACION SOBRE TRANSPORTACION

-ADR/RID: Transporte terrestre.
-Peligrosas ambientalmente: No

SECCION XI. INFORMACION SOBRE ECOLOGIA

De acuerdo con la SEMARNAP en Materia de agua, aire, suelo y residuos peligrosos

-Toxicidad:
-Para los peces DL50 *Oncorhynchus mykiss* (trucha irisada): >100mg/L- 96 horas.
-Persistencia y degradabilidad: S/D
-Potencial de bioacumulación: S/D
-Movilidad en el suelo: S/D
-Resultados de la valoración PBT y mPmB: S/D
-otra información importante: La descarga en el ambiente debe ser evitada. Para la eliminación de este producto, dirigirse a un servicio profesional autorizado. Disolver o mezclar el producto con un solvente combustible y quemarlo en un incinerador apto para productos químicos provisto de postquemador y lavador.

SECCION XII. PRECAUCIONES ESPECIALES

Para su Manejo, Transporte y Almacenamiento

-Manejo: Evítese el contacto con los ojos y piel. Evítese la formación de polvo y aerosoles. Debe disponer una extracción adecuada en aquellos lugares donde se forma polvo: Almacenar en un lugar fresco. Conservar el envase herméticamente cerrado en un lugar seco y bien ventilado. Es fuertemente Higroscópico, sensible al aire y a la humedad, manipular y almacenar en atmosfera inerte. Almacenar entre +15°C y +25°C

4.6.8 Anexo N°8: Ficha de Datos de Seguridad de Tris Base



Ficha de datos de seguridad según 1907/2006/CE, Artículo 31

página: 1/7

fecha de impresión 24.07.2014

Revisión: 24.07.2014

SECCIÓN 1: Identificación de la sustancia o la mezcla y de la sociedad o la empresa

1.1 Identificador del producto
Nombre comercial: **Tris Base**

Número del artículo: H513

1.2 Usos pertinentes identificados de la sustancia o de la mezcla y usos desaconsejados
No existen más datos relevantes disponibles.

Utilización del producto / de la elaboración Sustancias químicas de laboratorio

1.3 Datos del proveedor de la ficha de datos de seguridad

Fabricante/distribuidor:

Promega Corporation
2800 Wood Hollow Road
Madison, WI 53711
U.S.A.
1-608-274-4330
1-800-356-9526

Área de información:

Promega Biotech Ibérica, SL
Edificio Bruselas
Avenida de Bruselas 5 – 3ª planta
Madrid
Alcobendas
Madrid
SPAIN
Teléfono: 902 538 200
Fax: 902 538 300
E-mail Address: esp_custserv@promega.com
Web Address: www.promega.com/es

SDS autor: Regulatory.Affairs@Promega.com

1.4 Teléfono de emergencia:

Para Caída de Emergencia Química, Agujero, Fuego, Exposición, o Llamada de Accidente Día de CHEMTREC o Noche Dentro de EE. UU y Canadá: 1-800-424-9300
Fuera de EE. UU y Canadá: 1 703-527-3887 (llamadas por cobrar aceptadas)

SECCIÓN 2: Identificación de los peligros

2.1 Clasificación de la sustancia o de la mezcla
Clasificación con arreglo al Reglamento (CE) n° 1272/2008



GHS07

Skin Irrit. 2 H315 Provoca irritación cutánea.
Eye Irrit. 2 H319 Provoca irritación ocular grave.
STOT SE 3 H335 Puede irritar las vías respiratorias.

(se continúa en página 2)

fecha de impresión 24.07.2014

Revisión: 24.07.2014

Nombre comercial: **Tris Base**

(se continúa en página 1)

2.2 Elementos de la etiqueta

Etiquetado con arreglo al Reglamento (CE) n° 1272/2008

El producto se ha clasificado y etiquetado de conformidad con el reglamento CLP.

Pictogramas de peligro GHS07

Palabra de advertencia Atención

Componentes peligrosos a indicar en el etiquetaje:

2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol

Indicaciones de peligro

H315 Provoca irritación cutánea.

H319 Provoca irritación ocular grave.

H335 Puede irritar las vías respiratorias.

Consejos de prudencia

P261 Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.

P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P305+P351+P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

P321 Se necesita un tratamiento específico (ver en esta etiqueta).

P405 Guardar bajo llave.

P501 Eliminar el contenido o el recipiente conforme a la reglamentación local/regional/nacional/internacional.

2.3 Otros peligros

Resultados de la valoración PBT y mPmB

PBT: No aplicable.

mPmB: No aplicable.

SECCIÓN 3: Composición/información sobre los componentes

3.1 Caracterización química: Sustancias

Denominación N° CAS

77-86-1 trometamol

Número(s) de identificación

Número CE: 201-064-4

3.2 Caracterización química: Mezclas

Descripción

El producto es una mezcla de las sustancias arriesgadas puestas en una lista abajo junto con sustancias no arriesgadas no inscritas.

Componentes peligrosos:

CAS: 77-86-1	2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol	75-100%
EINECS: 201-064-4	Skín Irrit. 2, H315; Eye Irrit. 2, H319; STOT SE 3, H335	

SECCIÓN 4: Primeros auxilios

4.1 Descripción de los primeros auxilios

En caso de inhalación del producto:

Las personas desmayadas deben tenderse y transportarse de lado con la suficiente estabilidad.

En caso de contacto con la piel:

Lavar inmediatamente con agua y jabón y enjuagar bien.

En caso de irritaciones continuas de la piel, consultar un médico.

En caso de con los ojos:

Limpia los ojos abiertos durante varios minutos con agua corriente. En caso de trastornos persistentes consultar un médico.

(se continúa en página 3)

Nombre comercial: Tris Base	
(se continua en página 2)	
<p><i>En caso de ingestión:</i> Consultar un médico si los trastornos persisten.</p> <p>4.2 Principales síntomas y efectos, agudos y retardados Ninguno</p> <p>4.3 Indicación de toda atención médica y de los tratamientos especiales que deban dispensarse inmediatamente No existen más datos relevantes disponibles.</p>	
SECCIÓN 5: Medidas de lucha contra incendios	
<p>5.1 Medios de extinción Sustancias extintoras apropiadas: CO₂, polvo extintor o chorro de agua rociada. Combatir incendios mayores con chorro de agua rociada o espuma resistente al alcohol.</p> <p>5.2 Peligros específicos derivados de la sustancia o la mezcla Ninguno conocido</p> <p>5.3 Recomendaciones para el personal de lucha contra incendios Ningún consejo especial</p>	
SECCIÓN 6: Medidas en caso de vertido accidental	
<p>6.1 Precauciones personales, equipo de protección y procedimientos de emergencia Usar ropa de protección personal.</p> <p>6.2 Precauciones relativas al medio ambiente: Evitar que penetre en la canalización /aguas de superficie /agua subterráneas.</p> <p>6.3 Métodos y material de contención y de limpieza: Asegurar suficiente ventilación.</p> <p>6.4 Referencia a otras secciones Ver capítulo 13 para mayor información sobre una manipulación segura. Para mayor información sobre cómo desechar el producto, ver capítulo 13.</p>	
SECCIÓN 7: Manipulación y almacenamiento	
<p>7.1 Precauciones para una manipulación segura Si se manipulan correctamente, no se requieren medidas especiales. Prevención de incendios y explosiones: El producto no es inflamable.</p> <p>7.2 Condiciones de almacenamiento seguro, incluidas posibles incompatibilidades Almacenamiento: Exigencias con respecto al almacén y los recipientes: No se requieren medidas especiales. Normas en caso de un almacenamiento conjunto: No es necesario Indicaciones adicionales sobre las condiciones de almacenamiento: Mantener el recipiente cerrado herméticamente.</p> <p>7.3 Usos específicos finales No existen más datos relevantes disponibles.</p>	
SECCIÓN 8: Controles de exposición/protección individual	
<p>Instrucciones adicionales para el acondicionamiento de instalaciones técnicas: Sin datos adicionales, ver punto 7.</p> <p>8.1 Parámetros de control Componentes con valores límite admisibles que deben controlarse en el puesto de trabajo: El producto no contiene cantidades relevantes de sustancias con valores límite que exijan un control en el puesto de trabajo. Indicaciones adicionales: Como base se han utilizado las listas vigentes en el momento de la elaboración.</p>	
(se continua en página 4)	

Nombre comercial: Tris Base	
(se continua en página 3)	
<p>8.2 Controles de la exposición Equipo de protección individual: Medidas generales de protección e higiene: Mantener alejado de alimentos, bebidas y alimentos para animales. Quitarse de inmediato la ropa ensuciada o impregnada. Lavarse las manos antes de las pausas y al final del trabajo. Evitar el contacto con los ojos y la piel. No comer ni beber durante el trabajo. Limpiar la piel a fondo después de manipular el producto.</p> <p>Protección respiratoria: Si la exposición va a ser breve o de poca intensidad, colocarse una máscara respiratoria. Para una exposición más intensa o de mayor duración, usar un aparato de respiración autónomo.</p> <p>Protección de manos: Guantes de protección. Seleccione el material de guante consideración del tiempo de penetración, el precio de tiempo de degradación y difusión. Los guantes protectores seleccionados deben satisfacer las especificaciones de Unión Europea la Directiva 89/686/EEC y el estándar EN 374 sacado de ello.</p> <p>Material de los guantes La elección del guante adecuado no depende únicamente del material, sino también de otras características de calidad, que pueden variar de un fabricante a otro. Teniendo en cuenta que el producto está fabricado a partir de diferentes materiales, su calidad no puede ser evaluada de antemano, de modo que los guantes deberán ser controlados antes de su utilización.</p> <p>Protección de ojos: Gafas de protección. Equipo de uso para protección de ojo probada y aprobada bajo estándar del gobierno EN 166 (Unión Europea).</p>	
SECCIÓN 9: Propiedades físicas y químicas	
9.1 Información sobre propiedades físicas y químicas básicas	
Datos generales	
Aspecto:	
Forma:	Cristalino
Color:	Blanco
Olor:	Suave
Umbral olfativo:	No determinado.
valor pH:	No aplicable.
Cambio de estado	
Punto de fusión /campo de fusión:	172 °C
Punto de ebullición /campo de ebullición:	Indeterminado
Punto de inflamación:	No aplicable.
Inflamabilidad (sólido, gaseiforme):	No determinado.
Temperatura de ignición:	
Temperatura de descomposición:	No determinado.
Autoinflamabilidad:	El producto no es autoinflamable.
Peligro de explosión:	El producto no es explosivo.
Límites de explosión:	
Inferior:	No determinado.
Superior:	No determinado.
(se continua en página 3)	

Nombre comercial: **Tris Base**

(se continua en página 4)

Presión de vapor:	No aplicable.
Densidad a 20 °C:	0,84 g/cm ³
Densidad relativa:	No determinado.
Densidad de vapor:	No aplicable.
Velocidad de evaporación:	No aplicable.
Solubilidad en / miscibilidad con Agua:	Soluble
Coefficiente de reparto (n-octanol/agua):	No determinado.
Viscosidad:	No aplicable.
Dinámica:	No aplicable.
Cinemática:	No aplicable.
Disolventes orgánicos:	0,0 %
Contenido de cuerpos sólidos:	100,0 %
9.2 Información adicional	No existen más datos relevantes disponibles.

SECCIÓN 10: Estabilidad y reactividad

- 10.1 Reactividad
 10.2 Estabilidad química
 Descomposición térmica / condiciones que deben evitarse: No se descompone al emplearse adecuadamente.
 10.3 Posibilidad de reacciones peligrosas No se conocen reacciones peligrosas.
 10.4 Condiciones que deben evitarse No existen más datos relevantes disponibles.
 10.5 Materiales incompatibles: No existen más datos relevantes disponibles.
 10.6 Productos de descomposición peligrosos: No se conocen productos de descomposición peligrosos.

SECCIÓN 11: Información toxicológica

11.1 Información sobre los efectos toxicológicos
 Toxicidad aguda:

Valores LD/LC50 (dosis letal / dosis letal = 50%) relevantes para la clasificación:

77-86-1 2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol

Oral LD50 5900 mg/kg (Rat)

Efecto estimulante primario:

En la piel: Irrita la piel y las mucosas.

En el ojo: Produce irritaciones.

Sensibilización: No se conoce ningún efecto sensibilizante

Indicaciones toxicológicas adicionales:

En conformidad con el procedimiento de cálculo contenido en la última versión de la Normativa General de

Clasificación de la CE para Preparados, el producto tiene los siguientes riesgos:

Irritante

SECCIÓN 12: Información ecológica

12.1 Toxicidad

Toxicidad acuática No dañosa al ambiente acuático.

12.2 Persistencia y degradabilidad No disponible

12.3 Potencial de bioacumulación No conocido

12.4 Movilidad en el suelo No existen más datos relevantes disponibles.

(se continua en página 6)

Nombre comercial: **Tris Base**

(se continua en página 5)

Efectos ecotóxicos:

Observación: No disponible

Indicaciones medioambientales adicionales:

Indicaciones generales:

Nivel de riesgo para el agua 1 (autoclasiificación): escasamente peligroso para el agua

En estado no diluido o no neutralizado, no dejar que se infiltre en aguas subterráneas, aguas superficiales o en alcantarillados.

12.5 Resultados de la valoración PBT y mPmB

PBT: No aplicable.

mPmB: No aplicable.

12.6 Otros efectos adversos No existen más datos relevantes disponibles.

SECCIÓN 13: Consideraciones relativas a la eliminación

13.1 Métodos para el tratamiento de residuos

Recomendación:

La disposición debería ser de acuerdo con leyes regionales, nacionales y locales aplicables y regulaciones.

Refiérase a la Sección 7: Manejo y Almacenaje y la Sección 8: Protección de Control/Personal de Exposición para información de manejo adicional y protección de empleados.

Embalajes sin limpiar:

Recomendación: Eliminar conforme a las disposiciones oficiales.

Producto de limpieza recomendado: Agua, eventualmente añadiendo productos de limpieza.

SECCIÓN 14: Información relativa al transporte

14.1 Número UN
 ADR, ADN, IMDG, LATA Ninguno
 suprimido

14.2 Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas
 ADR, ADN, IMDG, LATA Ninguno
 suprimido

14.3 Clase(s) de peligro para el transporte
 ADR, ADN, IMDG, LATA Ninguno

Clase suprimido

14.4 Grupo de embalaje
 ADR, IMDG, LATA Ninguno
 suprimido

14.5 Peligros para el medio ambiente:
 Contaminante marino: No

14.6 Precauciones particulares para los usuarios No aplicable.

14.7 Transporte a granel con arreglo al anexo II del Convenio Marpol 73/78 y del Código IBC No aplicable.

"Reglamentación Modelo" de la UNECE: -

(se continua en página 7)

4.6.9 Anexo N°9: Ficha de Datos de Persulfato de Amonio

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD

de acuerdo al Reglamento (CE) No. 1907/2006
Versión 5.3 Fecha de revisión 19.06.2014
Fecha de impresión 29.10.2014
GENERIC EU MSDS - NO COUNTRY SPECIFIC DATA - NO OEL DATA

SECCIÓN 1: Identificación de la sustancia o la mezcla y de la sociedad o la empresa

- 1.1 Identificadores del producto**
Nombre del producto : Ammonium persulfate
- Referencia : A3678
Marca : Sigma
No. Índice : 016-060-00-6
REACH No. : Un número de registro no está disponible para esta sustancia, ya que la sustancia o sus usos están exentos del registro, el tonelaje anual no requiere registro o dicho registro está previsto para una fecha posterior
- No. CAS : 7727-54-0
- 1.2 Usos pertinentes identificados de la sustancia o de la mezcla y usos desaconsejados**
Usos identificados : Reactivos para laboratorio, Fabricación de sustancias
- 1.3 Datos del proveedor de la ficha de datos de seguridad**
Compañía : Sigma-Aldrich
3050 Spruce Street
SAINT LOUIS MO 63103
USA
- Teléfono : +1 800-325-5832
Fax : +1 800-325-5052
- 1.4 Teléfono de emergencia**
Teléfono de Urgencia : (314) 776-6555

SECCIÓN 2: Identificación de los peligros

- 2.1 Clasificación de la sustancia o de la mezcla**
Clasificación de acuerdo con el Reglamento (CE) 1272/2008
Sólidos comburentes (Categoría 3), H272
Iritación cutánea (Categoría 2), H315
Iritación ocular (Categoría 2), H319
Sensibilización respiratoria (Categoría 1), H334
Sensibilización cutánea (Categoría 1), H317
Toxicidad aguda, Oral (Categoría 4), H302
Toxicidad específica en determinados órganos - exposición única (Categoría 3), Sistema respiratorio, H335
- Para el texto íntegro de las Declaraciones-H mencionadas en esta sección, véase la Sección 16.
- Clasificación de acuerdo con las Directivas de la UE 67/548/CEE ó 1999/45/CE
- | | | |
|----|------------|-----|
| O | Comburente | R 8 |
| Xn | Nocivo | R22 |

--	--	--

Para el texto completo de las frases de Riesgo y Seguridad mencionadas en esta Sección, ver la Sección 16

SECCIÓN 4: Primeros auxilios

- 4.1 Descripción de los primeros auxilios**
Recomendaciones generales
Consultar a un médico. Mostrar esta ficha de seguridad al doctor que esté de servicio.
- Si es inhalado**
Si aspiró, mueva la persona al aire fresco. Si ha parado de respirar, hacer la respiración artificial.
Consultar a un médico.

Pictograma



Palabra de advertencia

Peligro

Indicación(es) de peligro

H272
H302
H315
H317
H319
H334

Puede agravar un incendio; comburente.
Nocivo en caso de ingestión.
Provoca irritación cutánea.
Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
Provoca irritación ocular grave.
Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación.
Puede irritar las vías respiratorias.

H335

Declaración(es) de prudencia

P220
P261
P280
P305 + P351 + P338

Mantener o almacenar alejado de la ropa/materiales combustibles.
Evitar respirar el polvo.
Llevar guantes de protección.
EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.
En caso de síntomas respiratorios: Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico.

P342 + P311

Declaración Suplementaria del Peligro : ninguno(a)

2.3 Otros Peligros - ninguno(a)

SECCIÓN 3: Composición/información sobre los componentes

- 3.1 Sustancias**
Sinónimos : AP
Ammonium peroxodisulfate
APS
PER
Ammonium peroxydisulfate
- Formula : H₈N₂O₈S₂
Peso molecular : 228,20 g/mol
No. CAS : 7727-54-0
No. CE : 231-786-5
No. Índice : 016-060-00-6

Ingredientes peligrosos de acuerdo con el Reglamento (CE) N° 1272/2008

Componente	Clasificación	Concentración
Diammonium peroxodisulphate		
No. CAS : 7727-54-0	Ox. Sol. 3; Acute Tox. 4; Skin Irrit. 2; Eye Irrit. 2; Resp. Sens. 1; Skin Sens. 1; STOT SE 3; H272, H302, H315, H317, H319, H334, H335	<= 100 %
No. CE : 231-786-5		
No. Índice : 016-060-00-6		

Ingrediente peligroso según la Directiva 1999/45/CE

Componente	Clasificación	Concentración
Diammonium peroxodisulphate		
No. CAS : 7727-54-0	O, Xn, R 8 - R22 - R36/37/38 - R47/48	<= 100 %
No. CE : 231-786-5		

- 6.3 Métodos y material de contención y de limpieza**
Limpiar y traspalar. Contener y recoger el derrame con un aspirador aislado de la electricidad o cepillándolo, y meterlo en un envase para su eliminación de acuerdo con las reglamentaciones locales (ver sección 13). Guardar en contenedores apropiados y cerrados para su eliminación.
- 6.4 Referencia a otras secciones**
Para eliminación de desechos ver sección 13.

SECCIÓN 7: Manipulación y almacenamiento

- 7.1 Precauciones para una manipulación segura**
Evítese el contacto con los ojos y la piel. Evítese la formación de polvo y aerosoles.
Debe disponer de extracción adecuada en aquellos lugares en los que se forma polvo. Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas - No fumar. Manténgase separado del calor y de las fuentes de ignición. Ver precauciones en la sección 2.2

Si es utilizado en solución, o mezclado con otras sustancias, y bajo condiciones diferentes de la EN 374, ponerse en contacto con el proveedor de los guantes aprobados CE. Esta recomendación es meramente aconsejable y deberá ser evaluada por un responsable de seguridad e higiene industrial familiarizado con la situación específica de uso previsto por nuestros clientes. No debe interpretarse como una aprobación de oferta para cualquier escenario de uso específico.

Protección Corporal

Traje de protección completo contra productos químicos, El tipo de equipamiento de protección debe ser elegido según la concentración y la cantidad de sustancia peligrosa al lugar específico de trabajo.

Protección respiratoria

Donde el asesoramiento de riesgo muestre que los respiradores purificadores de aire son apropiados, usar un respirador que cubra toda la cara tipo N100 (EEUU) o tipo P3 (EN 143) y cartuchos de respuesto para controles de ingeniería. Si el respirador es la única protección, usar un respirador suministrado que cubra toda la cara Usar respiradores y componentes testados y aprobados bajo los estándares gubernamentales apropiados como NIOSH (EEUU) o CEN (UE)

Control de exposición ambiental

Impedir nuevos escapes o derrames si puede hacerse sin riesgos. No dejar que el producto entre en el sistema de alcantarillado. La descarga en el ambiente debe ser evitada.

SECCIÓN 9: Propiedades físicas y químicas

9.1 Información sobre propiedades físicas y químicas básicas

a) Aspecto	Forma: polvo Color: blanco
b) Olor	sin datos disponibles
c) Umbral olfativo	sin datos disponibles
d) pH	1,0 - 2 a 228 g/l a 25 °C
e) Punto de fusión/ punto de congelación	sin datos disponibles
f) Punto inicial de ebullición e intervalo de ebullición	sin datos disponibles
g) Punto de inflamación	sin datos disponibles
h) Tasa de evaporación	sin datos disponibles
i) Inflamabilidad (sólido, gas)	sin datos disponibles
j) Inflamabilidad superior/inferior o límites explosivos	sin datos disponibles
k) Presión de vapor	sin datos disponibles
l) Densidad de vapor	7,88 - (Aire = 1.0)
m) Densidad relativa	1,980 g/cm ³
n) Solubilidad en agua	228 g/l a 20 °C - totalmente soluble
o) Coeficiente de reparto n-octanol/agua	sin datos disponibles
p) Temperatura de auto-inflamación	sin datos disponibles
q) Temperatura de descomposición	sin datos disponibles

r) Viscosidad	sin datos disponibles
s) Propiedades explosivas	sin datos disponibles
t) Propiedades comburentes	La sustancia o mezcla se clasifica como oxidante con la categoría 3.

9.2 Otra información de seguridad

Densidad aparente	900 kg/m ³
Densidad relativa del vapor	7,88 - (Aire = 1.0)

SECCIÓN 10: Estabilidad y reactividad

- 10.1 Reactividad
sin datos disponibles
- 10.2 Estabilidad química
Puede descomponerse al exponerse al aire húmedo o al agua. Estable bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas.
- 10.3 Posibilidad de reacciones peligrosas
sin datos disponibles
- 10.4 Condiciones que deben evitarse
sin datos disponibles
- 10.5 Materiales incompatibles
Agentes extremadamente reductores, Materiales orgánicos, Metales en polvo
- 10.6 Productos de descomposición peligrosos
Otros productos de descomposición peligrosos - sin datos disponibles
En caso de incendio: véase sección 5

SECCIÓN 11: Información toxicológica

11.1 Información sobre los efectos toxicológicos

Toxicidad aguda
DL50 Oral - rata - 689 mg/kg
DL50 Cutáneo - rata - > 2.000 mg/kg

Corrosión o irritación cutáneas
Piel - conejo
Resultado: No irrita la piel

Lesiones o irritación ocular graves
Ojos - conejo
Resultado: No irrita los ojos

Ojos - conejo
Resultado: Ligera irritación en los ojos (OECD TG 405)

Sensibilización respiratoria o cutánea
- conejillo de indias
Resultado: Produce sensibilización. (OECD TG 406)

Mutagenicidad en células germinales
sin datos disponibles

Carcinogenicidad
IARC: No se identifica ningún componente de este producto, que presente niveles mayores que o igual a 0,1% como agente carcinógeno humano probable, posible o confirmado por la (IARC)

Agencia Internacional de Investigaciones sobre Carcinógenos.

Toxicidad para la reproducción
sin datos disponibles

Toxicidad específica en determinados órganos - exposición única
Puede irritar las vías respiratorias.

Toxicidad específica en determinados órganos - exposiciones repetidas
sin datos disponibles

Peligro de aspiración
sin datos disponibles

Información Adicional
RTECS: SE0350000

Según nuestras informaciones, creemos que no se han investigado adecuadamente las propiedades químicas, físicas y toxicológicas.

SECCIÓN 12: Información ecológica

12.1 Toxicidad

Toxicidad para los peces CL50 - Oncorhynchus mykiss (Trucha irisada) - 76 mg/l - 96 h

Toxicidad para las dafnias y otros invertebrados acuáticos CE50 - Daphnia magna (Pulga de mar grande) - 120 mg/l - 48 h

12.2 Persistencia y degradabilidad

sin datos disponibles

12.3 Potencial de bioacumulación

sin datos disponibles

12.4 Movilidad en el suelo

sin datos disponibles

12.5 Resultados de la valoración PBT y mPmB

La valoración de PBT / mPmB no está disponible ya que la evaluación de la seguridad química no es necesaria / no se ha realizado

12.6 Otros efectos adversos

Nocivo para los organismos acuáticos.

SECCIÓN 13: Consideraciones relativas a la eliminación

13.1 Métodos para el tratamiento de residuos

Producto

Quemar en un incinerador apto para productos químicos provisto de postquemador y lavador, procediendo con gran cuidado en la ignición ya que este producto es extremadamente inflamable. Ofertar el sobrante y las soluciones no-aprovechables a una compañía de vertidos acreditada.

Envases contaminados

Eliminar como producto no usado.

SECCIÓN 14: Información relativa al transporte

14.1 Número ONU ADR/RID: 1444 IMDG: 1444 IATA: 1444

14.2 Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas
ADR/RID: PERSULFATO AMÓNICO
IMDG: AMMONIUM PERSULPHATE
IATA: Persulfato amónico

14.3 Clase(s) de peligro para el transporte
ADR/RID: 5.1 IMDG: 5.1 IATA: 5.1

14.4 Grupo embalaje
ADR/RID: III IMDG: III IATA: III

14.5 Peligros para el medio ambiente
ADR/RID: no IMDG Contaminante marino: no IATA: no

14.6 Precauciones particulares para los usuarios
sin datos disponibles

SECCIÓN 15: Información reglamentaria

La hoja técnica de seguridad cumple con los requisitos de la Reglamentación (CE) No. 1907/2006.

15.1 Reglamentación y legislación en materia de seguridad, salud y medio ambiente específicas para la sustancia o la mezcla

sin datos disponibles

15.2 Evaluación de la seguridad química

Para este producto no se ha llevado a cabo una evaluación de la seguridad química

SECCIÓN 16: Otra información

Texto íntegro de las Declaraciones-H referidas en las secciones 2 y 3.

Acute Tox.	Toxicidad aguda
Eye Irrit.	Irritación ocular
H272	Puede agravar un incendio; comburente.
H302	Nocivo en caso de ingestión.
H315	Provoca irritación cutánea.
H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
H319	Provoca irritación ocular grave.
H334	Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación.
H335	Puede irritar las vías respiratorias.
Ox. Sol.	Sólidos comburentes
Resp. Sens.	Sensibilización respiratoria
Skin Irrit.	Irritación cutánea

El texto completo de las frases-R referidas en los puntos 2 y 3

O	Comburente
Xn	Nocivo
R 8	Peligro de fuego en contacto con materias combustibles.
R22	Nocivo por ingestión.
R36/37/38	Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias.
R42/43	Posibilidad de sensibilización por inhalación y por contacto con la piel.

Otros datos

Copyright 2014 Sigma-Aldrich Co. LLC. Se autoriza la reproducción en número ilimitado de copias para uso exclusivamente interno.

La información indicada arriba se considera correcta pero no pretende ser exhaustiva y deberá utilizarse únicamente como orientación. La información contenida en este documento esta basada en el presente estado de nuestro conocimiento y es aplicable a las precauciones de seguridad apropiadas para el producto. No representa ninguna garantía de las propiedades del producto. La Corporación Sigma-Aldrich y sus Compañías Afiliadas, no responderán por ningún daño resultante de la manipulación o contacto con el producto indicado arriba. Dirijase a www.sigma-aldrich.com y/o a los términos y condiciones de venta en el reverso de la factura o de la nota de entrega.

4.6.10 Anexo N°10: Ficha de Datos de TEMED

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD

de acuerdo el Reglamento (CE) No. 1907/2006
Versión 5.2 Fecha de revisión 23.05.2014

Fecha de impresión 29.10.2014

GENERIC EU MSDS - NO COUNTRY SPECIFIC DATA - NO OEL DATA

SECCIÓN 1: Identificación de la sustancia o la mezcla y de la sociedad o la empresa

1.1 Identificadores del producto

Nombre del producto : N,N,N',N'-Tetrametil-1,4-fenilendiamina, diclorhidrato

Referencia : 87890
Marca : Fluka
REACH No. : Un número de registro no está disponible para esta sustancia, ya que la sustancia o sus usos están exentos del registro, el tonelaje anual no requiere registro o dicho registro está previsto para una fecha posterior
No. CAS : 637-01-4

1.2 Usos pertinentes identificados de la sustancia o de la mezcla y usos desaconsejados

Usos identificados : Reactivos para laboratorio, Fabricación de sustancias

1.3 Datos del proveedor de la ficha de datos de seguridad

Compañía : Sigma-Aldrich
3050 Spruce Street
SAINT LOUIS MO 63103
USA

Teléfono : +1 800-325-5832
Fax : +1 800-325-5052

1.4 Teléfono de emergencia

Teléfono de Urgencia : (314) 776-6555

SECCIÓN 2: Identificación de los peligros

2.1 Clasificación de la sustancia o de la mezcla

Clasificación de acuerdo con el Reglamento (CE) 1272/2008
Iritación cutánea (Categoría 2), H315
Iritación ocular (Categoría 2), H319
Toxicidad específica en determinados órganos - exposición única (Categoría 3), H335

Para el texto íntegro de las Declaraciones-H mencionadas en esta sección, véase la Sección 16.

Clasificación de acuerdo con las Directivas de la UE 67/548/CEE ó 1999/45/CE
Xi Iritante R36/37/38

El texto completo de las frases R mencionadas en esta Sección, se indica en la Sección 16.

2.2 Elementos de la etiqueta

Etiquetado de acuerdo con el Reglamento (CE) 1272/2008

Pictograma



Palabra de advertencia : Atención

Indicación(es) de peligro

H315 : Provoca irritación cutánea.
H319 : Provoca irritación ocular grave.

H335

Puede irritar las vías respiratorias.

Declaración(es) de prudencia

P261

P305 + P351 + P338

Evitar respirar el polvo.

EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.

Declaración Suplementaria del Peligro : ninguno(a)

2.3 Otros Peligros - ninguno(a)

SECCIÓN 3: Composición/información sobre los componentes

3.1 Sustancias

Formula : C₁₀H₁₆N₂ · 2HCl
Peso molecular : 237,17 g/mol
No. CAS : 637-01-4
No. CE : 211-274-8

Ingredientes peligrosos de acuerdo con el Reglamento (CE) N° 1272/2008

Componente	Clasificación	Concentración
N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride		
No. CAS : 637-01-4 No. CE : 211-274-8	Skin Irrit. 2; Eye Irrit. 2; STOT SE 3; H315, H319, H335	<= 100 %

Ingrediente peligroso según la Directiva 1999/45/CE

Componente	Clasificación	Concentración
N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride		
No. CAS : 637-01-4 No. CE : 211-274-8	Xi, R36/37/38	<= 100 %

Para el texto completo de las frases de Riesgo y Seguridad mencionadas en esta Sección, ver la Sección 16

SECCIÓN 4: Primeros auxilios

4.1 Descripción de los primeros auxilios

Recomendaciones generales

Consultar a un médico. Mostrar esta ficha de seguridad al doctor que esté de servicio.

Si es inhalado

Si aspiró, mueva la persona al aire fresco. Si ha parado de respirar, hacer la respiración artificial. Consultar a un médico.

En caso de contacto con la piel

Eliminar lavando con jabón y mucha agua. Consultar a un médico.

En caso de contacto con los ojos

Lávese a fondo con agua abundante durante 15 minutos por lo menos y consulte al médico.

Si es tragado

Nunca debe administrarse nada por la boca a una persona inconsciente. Enjuague la boca con agua. Consultar a un médico.

4.2 Principales síntomas y efectos, agudos y retardados

Los síntomas y efectos más importantes conocidos se describen en la etiqueta (ver sección 2.2) y / o en la sección 11

- 4.3 **Indicación de toda atención médica y de los tratamientos especiales que deban dispensarse inmediatamente**
sin datos disponibles

SECCIÓN 5: Medidas de lucha contra incendios

- 5.1 **Medios de extinción**
Medios de extinción apropiados
Usar agua pulverizada, espuma resistente al alcohol, polvo seco o dióxido de carbono.
- 5.2 **Peligros específicos derivados de la sustancia o la mezcla**
Óxidos de carbono, óxidos de nitrógeno (NOx), Gas cloruro de hidrógeno
- 5.3 **Recomendaciones para el personal de lucha contra incendios**
Si es necesario, usar equipo de respiración autónomo para la lucha contra el fuego.
- 5.4 **Otros datos**
sin datos disponibles

SECCIÓN 6: Medidas en caso de vertido accidental

- 6.1 **Precauciones personales, equipo de protección y procedimientos de emergencia**
Utilícese equipo de protección individual. Evite la formación de polvo. Evitar respirar los vapores, la neblina o el gas. Asegúrese una ventilación apropiada. Evacuar el personal a zonas seguras. Evitar respirar el polvo.
Equipo de protección individual, ver sección 8.
- 6.2 **Precauciones relativas al medio ambiente**
No dejar que el producto entre en el sistema de alcantarillado.
- 6.3 **Métodos y material de contención y de limpieza**
Recoger y preparar la eliminación sin originar polvo. Limpiar y traspalar. Guardar en contenedores apropiados y cerrados para su eliminación.
- 6.4 **Referencia a otras secciones**
Para eliminación de desechos ver sección 13.

SECCIÓN 7: Manipulación y almacenamiento

- 7.1 **Precauciones para una manipulación segura**
Evítese el contacto con los ojos y la piel. Evítese la formación de polvo y aerosoles.
Debe disponer de extracción adecuada en aquellos lugares en los que se forma polvo. Disposiciones normales de protección preventivas de incendio.
Ver precauciones en la sección 2.2
- 7.2 **Condiciones de almacenamiento seguro, incluidas posibles incompatibilidades**
Almacenar en un lugar fresco. Conservar el envase herméticamente cerrado en un lugar seco y bien ventilado.
Sensible a la luz.
- 7.3 **Usos específicos finales**
Aparte de los usos mencionados en la sección 1.2 no se estipulan otros usos específicos

SECCIÓN 8: Controles de exposición/protección individual

- 8.1 **Parámetros de control**
Componentes con valores límite ambientales de exposición profesional.
- 8.2 **Controles de la exposición**
Controles técnicos apropiados
Manipular con las precauciones de higiene industrial adecuadas, y respetar las prácticas de seguridad.
Lávense las manos antes de los descansos y después de terminar la jornada laboral.

Protección de los ojos/ la cara

Gafas de seguridad con protecciones laterales conformes con la EN166 Use equipo de protección para los ojos probado y aprobado según las normas gubernamentales correspondientes, tales como NIOSH (EE.UU.) o EN 166 (UE).

Protección de la piel

Manipular con guantes. Los guantes deben ser inspeccionados antes de su uso. Utilice la técnica correcta de quitarse los guantes (sin tocar la superficie exterior del guante) para evitar el contacto de la piel con este producto. Deseche los guantes contaminados después de su uso, de conformidad con las leyes aplicables y buenas prácticas de laboratorio. Lavar y secar las manos.

Los guantes de protección seleccionados deben de cumplir con las especificaciones de la Directiva de la UE 89/686/CEE y de la norma EN 374 derivado de ello.

Sumersión

Material: Caucho nitrilo
espesura mínima de capa: 0,11 mm
Tiempo de perforación: 480 min
Material probado: Dermatri® (KCL 740 / Aldrich Z677272, Talla M)

Salpicaduras

Material: Caucho nitrilo
espesura mínima de capa: 0,11 mm
Tiempo de perforación: 480 min
Material probado: Dermatri® (KCL 740 / Aldrich Z677272, Talla M)

origen de datos: KCL GmbH, D-36124 Eichenzell, Teléfono +49 (0)6659 87300, e-mail sales@kcl.de, Método de prueba: EN374

Si es utilizado en solución, o mezclado con otras sustancias, y bajo condiciones diferentes de la EN 374, ponerse en contacto con el proveedor de los guantes aprobados CE. Esta recomendación es meramente aconsejable y deberá ser evaluada por un responsable de seguridad e higiene industrial familiarizado con la situación específica de uso previsto por nuestros clientes. No debe interpretarse como una aprobación de oferta para cualquier escenario de uso específico.

Protección Corporal

indumentaria impermeable, El tipo de equipamiento de protección debe ser elegido según la concentración y la cantidad de sustancia peligrosa al lugar específico de trabajo.

Protección respiratoria

Para exposiciones molestas use respirador de partículas tipo P95 (EE.UU.) o tipo P1 (UE EN 143). Para un nivel de protección mayor use cartuchos de respirador tipo OV/AG/P99 (EE.UU.) o ABEK-P2 (UE EN 143). Usar respiradores y componentes testados y aprobados bajo los estándares gubernamentales apropiados como NIOSH (EEUU) o CEN (UE)

Control de exposición ambiental

No dejar que el producto entre en el sistema de alcantarillado.

SECCIÓN 9: Propiedades físicas y químicas

9.1 Información sobre propiedades físicas y químicas básicas

- | | |
|---|--|
| a) Aspecto | Forma: sólido
Color: beige |
| b) Olor | sin datos disponibles |
| c) Umbral olfativo | sin datos disponibles |
| d) pH | sin datos disponibles |
| e) Punto de fusión/ punto de congelación | Punto/intervalo de fusión: 222 - 224 °C - lit. |
| f) Punto inicial de ebullición e intervalo de | sin datos disponibles |

	ebullición	
g)	Punto de inflamación	sin datos disponibles
h)	Tasa de evaporación	sin datos disponibles
i)	Inflamabilidad (sólido, gas)	sin datos disponibles
j)	Inflamabilidad superior/inferior o límites explosivos	sin datos disponibles
k)	Presión de vapor	sin datos disponibles
l)	Densidad de vapor	sin datos disponibles
m)	Densidad relativa	sin datos disponibles
n)	Solubilidad en agua	aprox.50 g/l
o)	Coefficiente de reparto n-octanol/agua	sin datos disponibles
p)	Temperatura de auto-inflamación	sin datos disponibles
q)	Temperatura de descomposición	sin datos disponibles
r)	Viscosidad	sin datos disponibles
s)	Propiedades explosivas	sin datos disponibles
t)	Propiedades comburentes	sin datos disponibles

9.2 Otra información de seguridad
sin datos disponibles

SECCIÓN 10: Estabilidad y reactividad

- 10.1 **Reactividad**
sin datos disponibles
- 10.2 **Estabilidad química**
Estable bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas.
- 10.3 **Posibilidad de reacciones peligrosas**
sin datos disponibles
- 10.4 **Condiciones que deben evitarse**
sin datos disponibles
- 10.5 **Materiales incompatibles**
Agentes oxidantes fuertes
- 10.6 **Productos de descomposición peligrosos**
Otros productos de descomposición peligrosos - sin datos disponibles
En caso de incendio: véase sección 5

SECCIÓN 11: Información toxicológica

- 11.1 **Información sobre los efectos toxicológicos**
- Toxicidad aguda**
sin datos disponibles
- Inhalación: sin datos disponibles
- Corrosión o irritación cutáneas**
sin datos disponibles

Fluka - 87890

Lesiones o irritación ocular graves
sin datos disponibles

Sensibilización respiratoria o cutánea
sin datos disponibles

Mutagenicidad en células germinales
sin datos disponibles

Carcinogenicidad

IARC: No se identifica ningún componente de este producto, que presente niveles mayores que o igual a 0,1% como agente carcinógeno humano probable, posible o confirmado por la (IARC) Agencia Internacional de Investigaciones sobre Carcinógenos.

Toxicidad para la reproducción
sin datos disponibles

Toxicidad específica en determinados órganos - exposición única
Inhalación - Puede irritar las vías respiratorias.

Toxicidad específica en determinados órganos - exposiciones repetidas
sin datos disponibles

Peligro de aspiración
sin datos disponibles

Información Adicional
RTECS: sin datos disponibles

Según nuestras informaciones, creemos que no se han investigado adecuadamente las propiedades químicas, físicas y toxicológicas.

SECCIÓN 12: Información ecológica

- 12.1 **Toxicidad**
sin datos disponibles
- 12.2 **Persistencia y degradabilidad**
sin datos disponibles
- 12.3 **Potencial de bioacumulación**
sin datos disponibles
- 12.4 **Movilidad en el suelo**
sin datos disponibles
- 12.5 **Resultados de la valoración PBT y mPmB**
La valoración de PBT / mPmB no está disponible ya que la evaluación de la seguridad química no es necesaria / no se ha realizado
- 12.6 **Otros efectos adversos**
sin datos disponibles

SECCIÓN 13: Consideraciones relativas a la eliminación

- 13.1 **Métodos para el tratamiento de residuos**
- Producto**
Ofertar el sobrante y las soluciones no-aprovechables a una compañía de vertidos acreditada. Para la eliminación de este producto, dirigirse a un servicio profesional autorizado. Disolver o mezclar el producto con un solvente combustible y quemarlo en un incinerador apto para productos químicos provisto de postquemador y lavador.
- Envases contaminados**
Eliminar como producto no usado.

Fluka - 87890

Página 6 de 7

4.6.11 Anexo N°11: Manejo de los Modelos Animales Experimentales

Fotografías N°1: Microambiente de modelos animales experimentales



Fotografías N°2 y 3: Identificación de cada modelo animal en jaulas



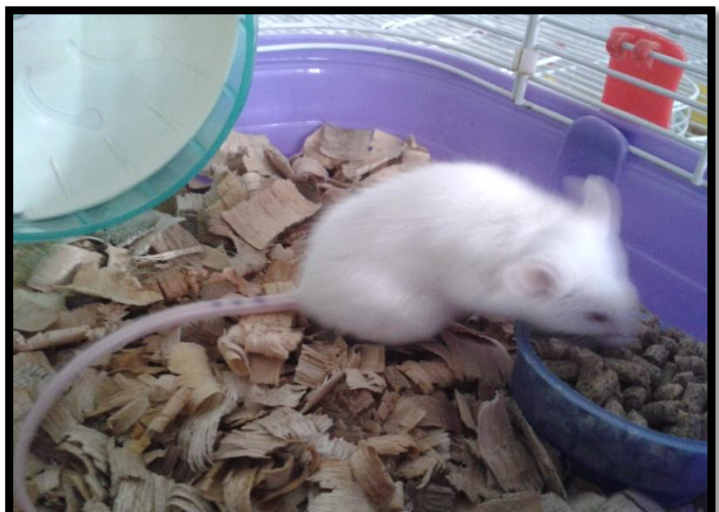
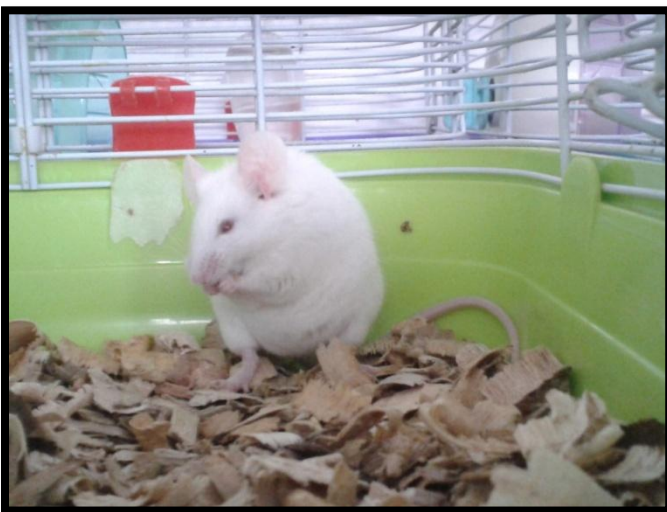
Fotografía N°4: Ratón inoculado con 3NP: Rigidez en la cola



Fotografía N°5: Ratón 3NP + ARNi



Fotografía N°6 y 7: Alimentación de los modelos animales experimentales



Fotografías N°8 y 9: Suministro de agua a modelos animales experimentales



Fotografías N°10 y 11: Peso de los modelos animales experimentales



Fotografía N°12: Sujecion y aplicación de ARNi /3NP/Ketamina y Xilocina



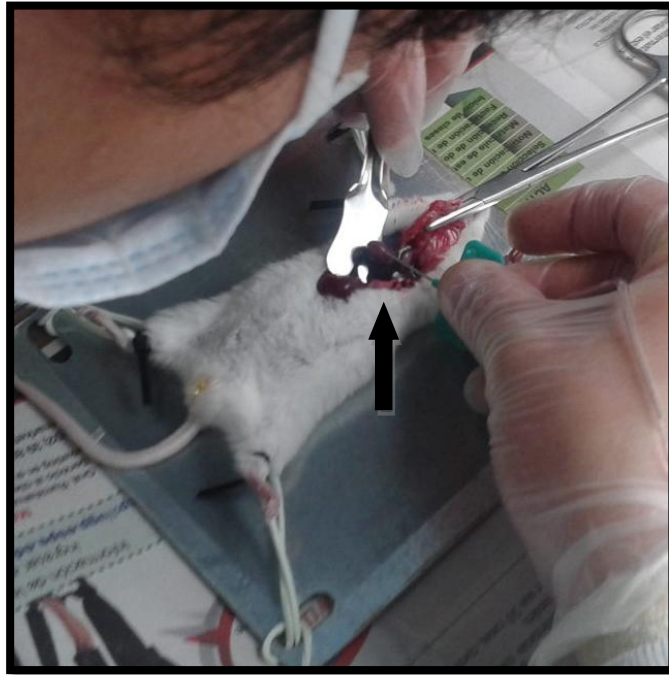
Fotografía N°13: Ratón sedado y Asegurado antes de Perfusión



Fotografías N°14 y 15: Inicio de la Perfusión del Ratón



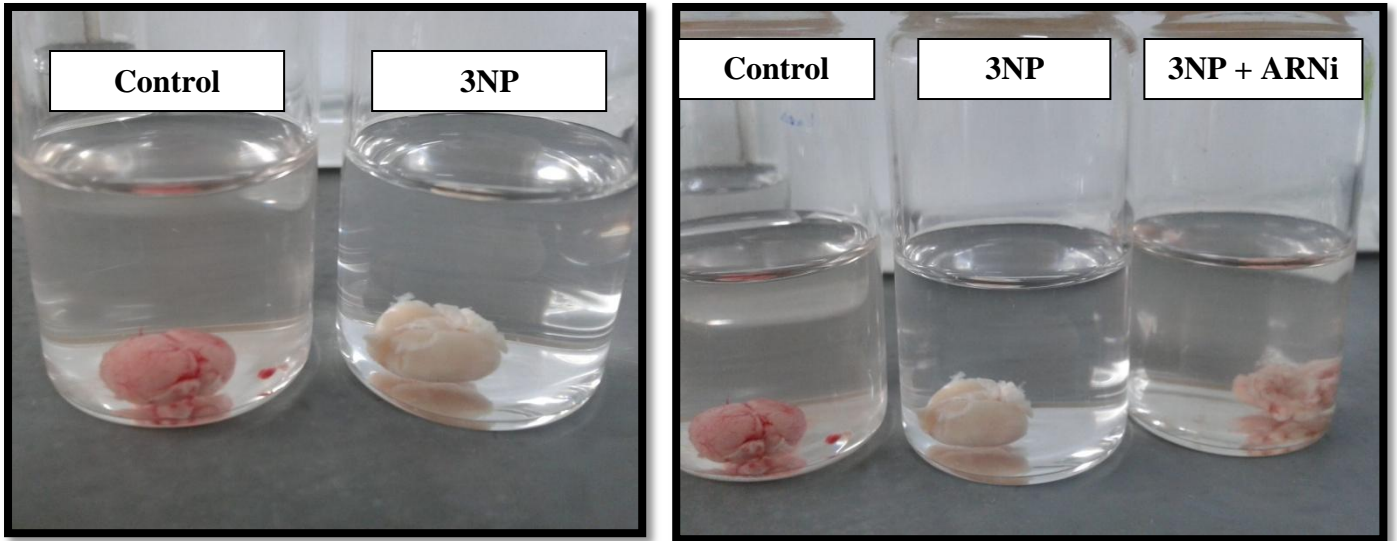
Fotografía N°16: Inyección de solución salina en el ventrículo izquierdo del corazón



Fotografías N°17 y 18: Aclaramiento del hígado, después de la inyección de solución salina



Fotografías N°19 y 20: Cerebros extraídos



4.6.13 Anexos N°12 y 13: Procedimientos de la investigación y Resultados

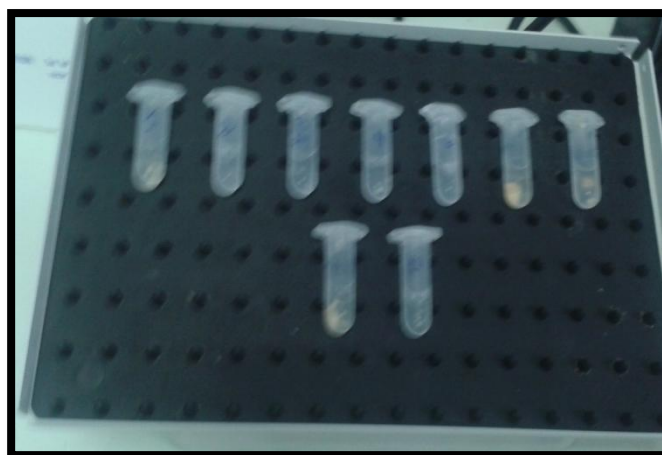
Fotografía N°21 y 22: Características macroscópicas de los modelos experimentales tratados con 3-NP y Control negativo



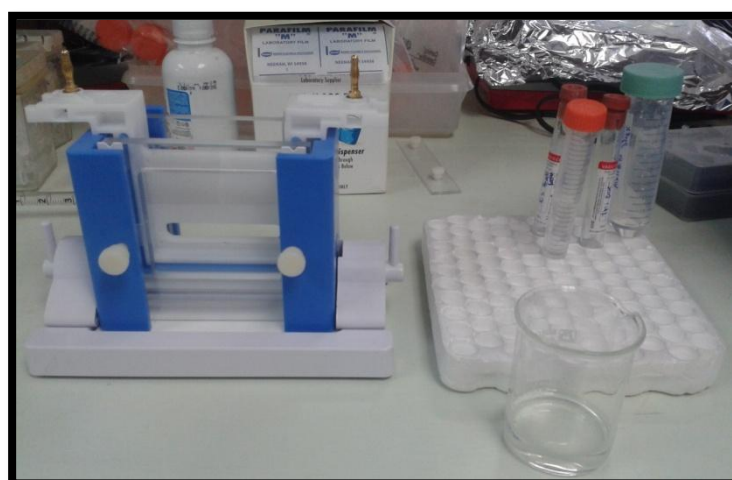
Fotografía N°23: Concentraciones de ARNi



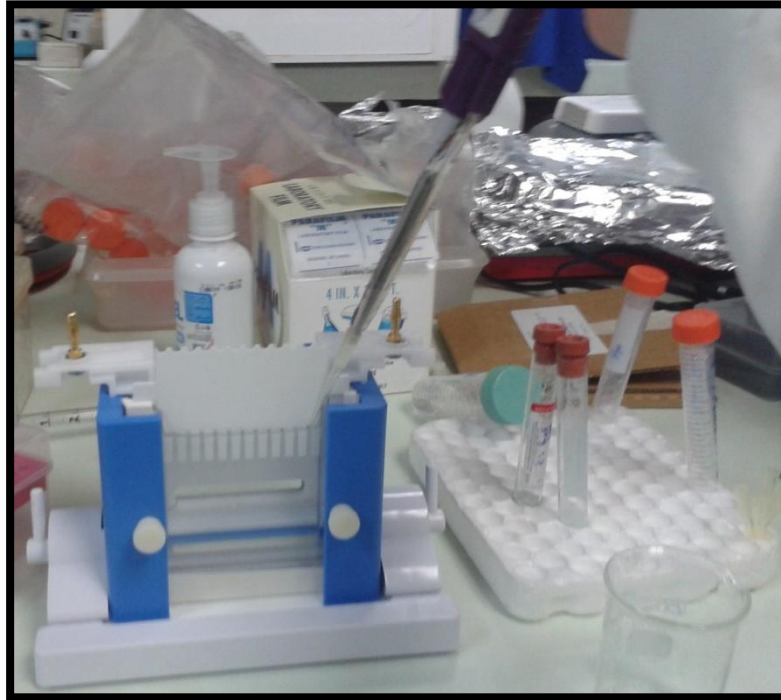
Fotografía N°24: Muestras de Tejido para análisis de electroforesis



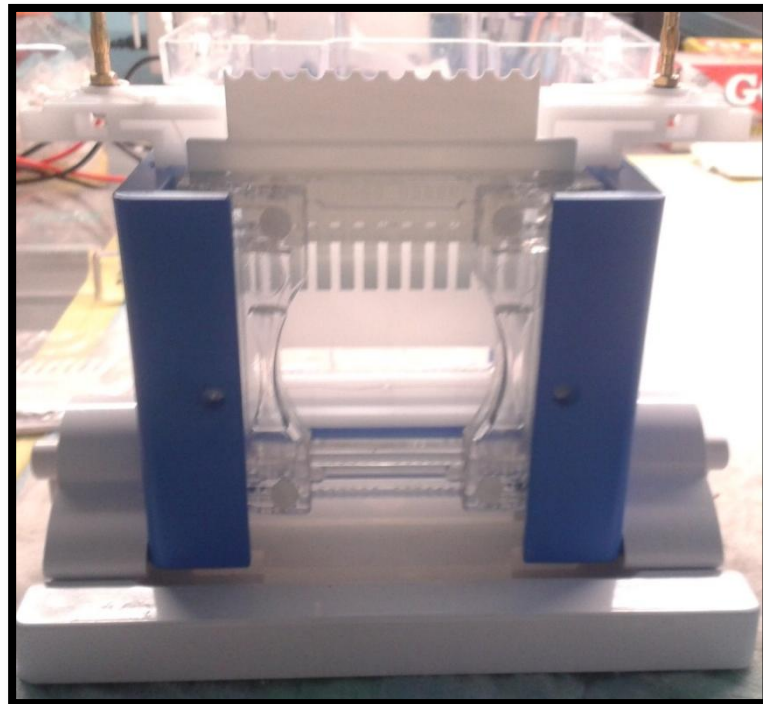
Fotografía N°25: Soluciones para llenar gel de policrilamida



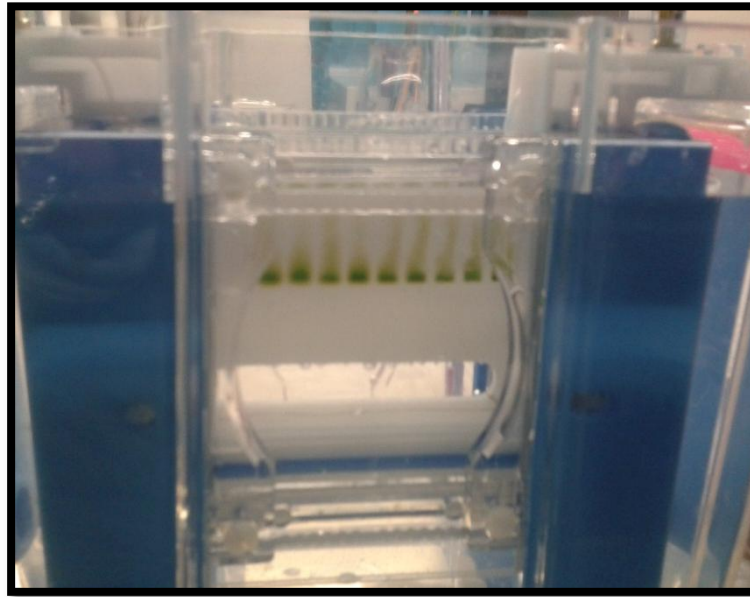
Fotografía N°26: Llenado del gel de poliacrilamida



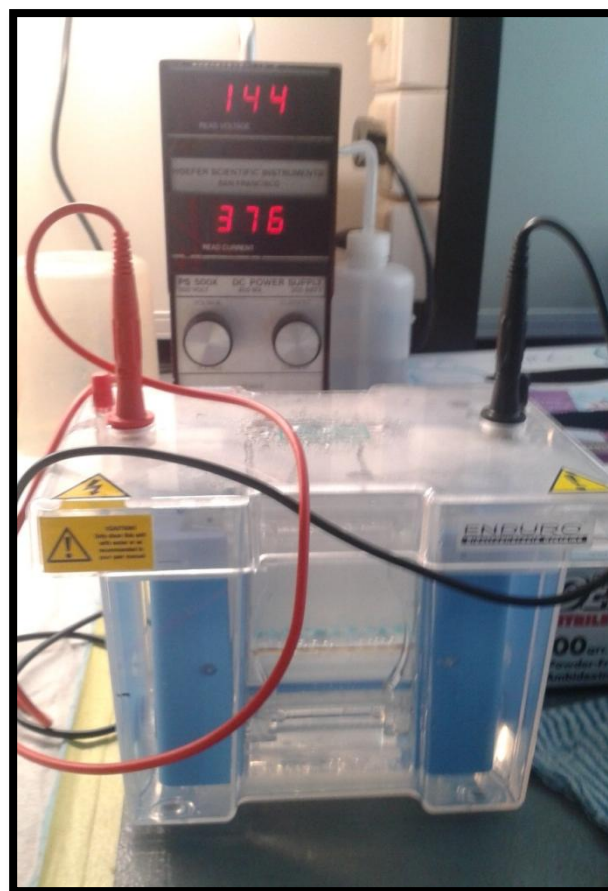
Fotografía N°27: Polimerización del gel



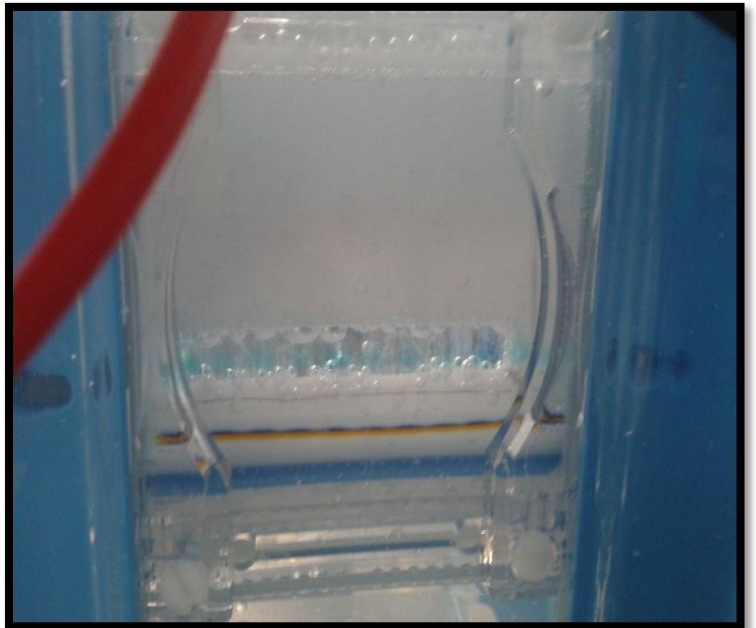
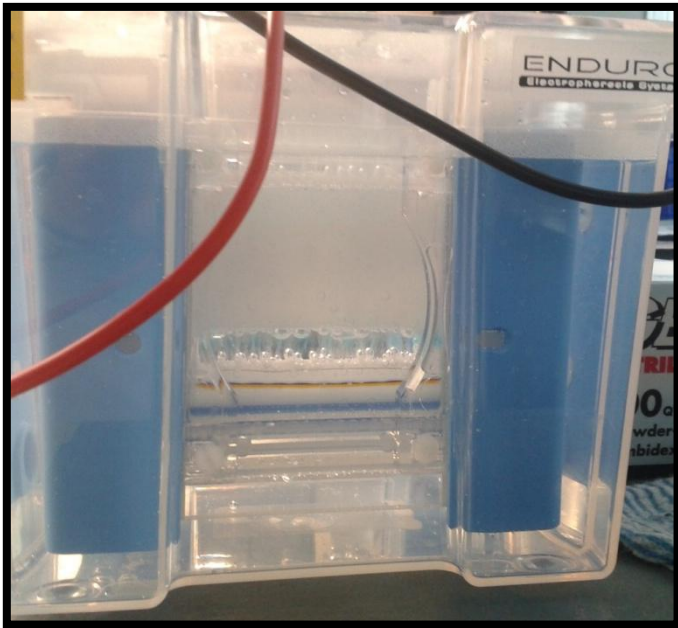
Fotografía N°28: Llenado de muestras en el gel de poliacrilamida



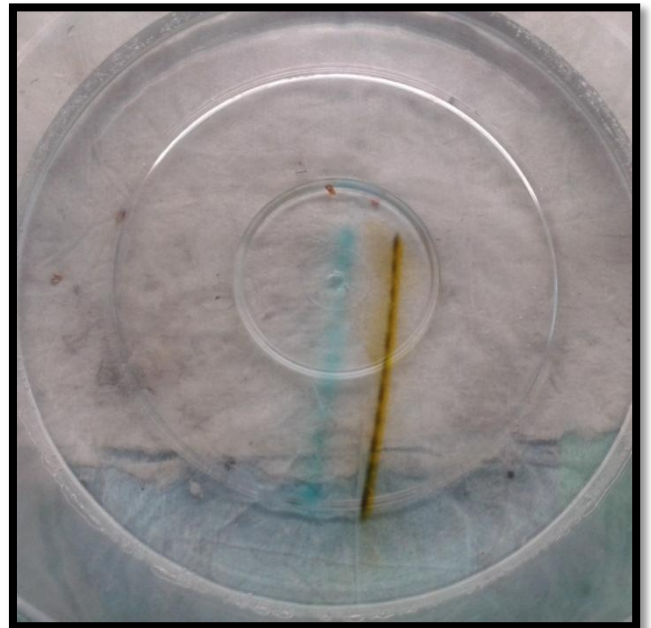
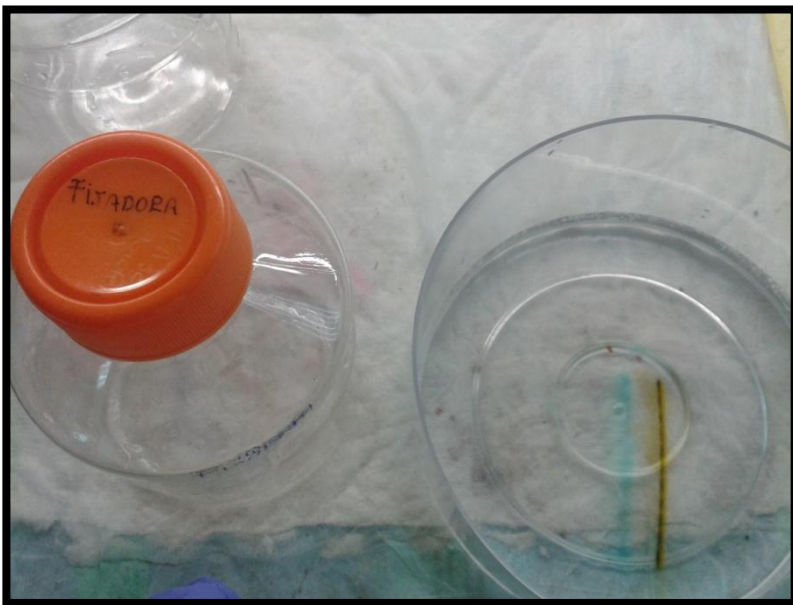
Fotografía N°29: Sistema de Gel de Electroforesis conectado a la fuente de voltaje



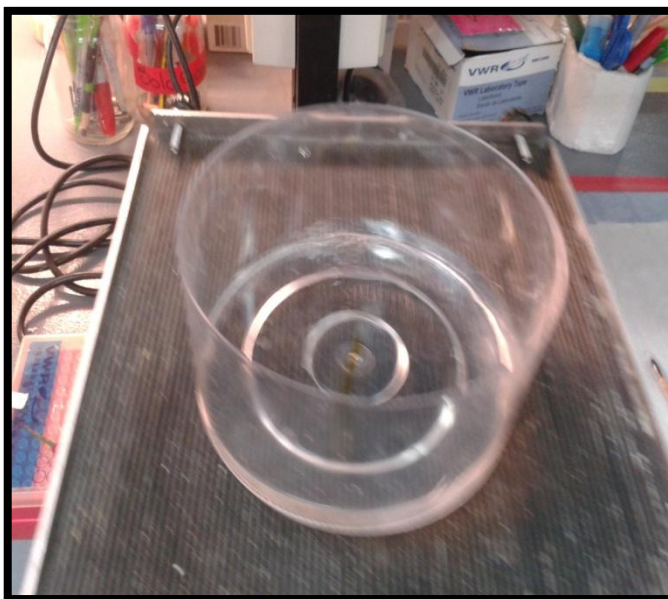
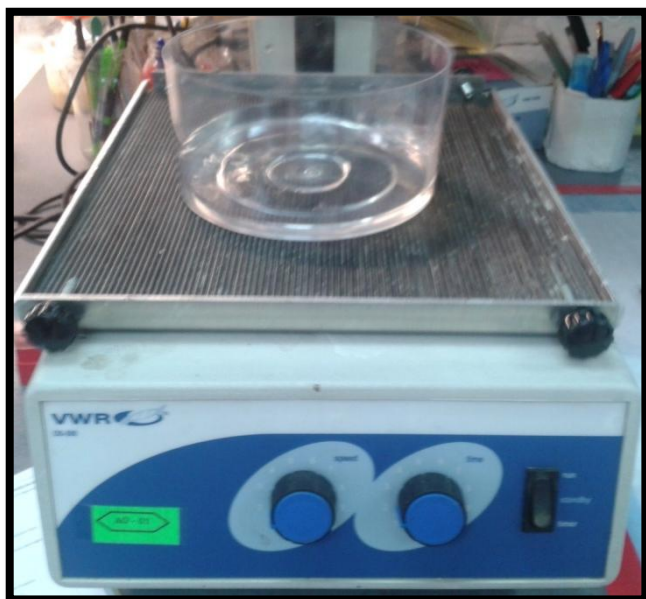
Fotografía N°30 y 31: Corrida de las muestras



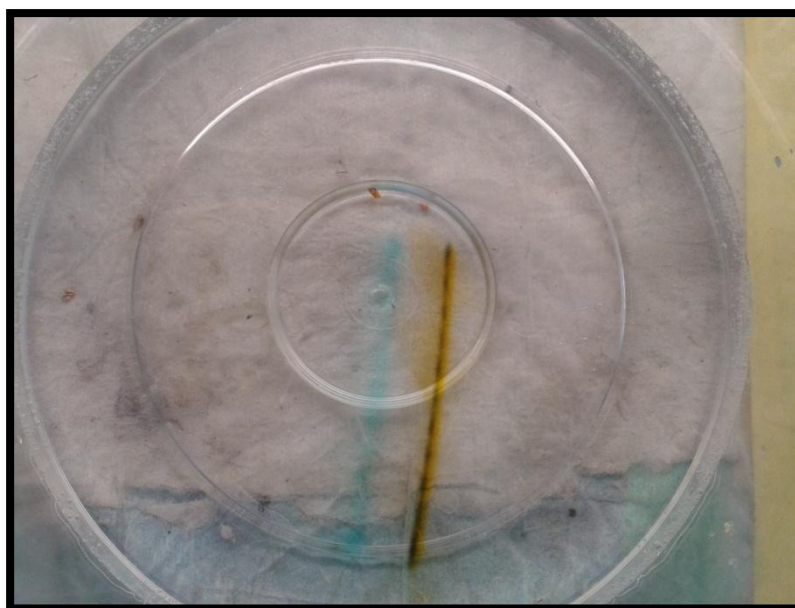
Fotografía N°32 y 33: Gel en Solución Fijadora



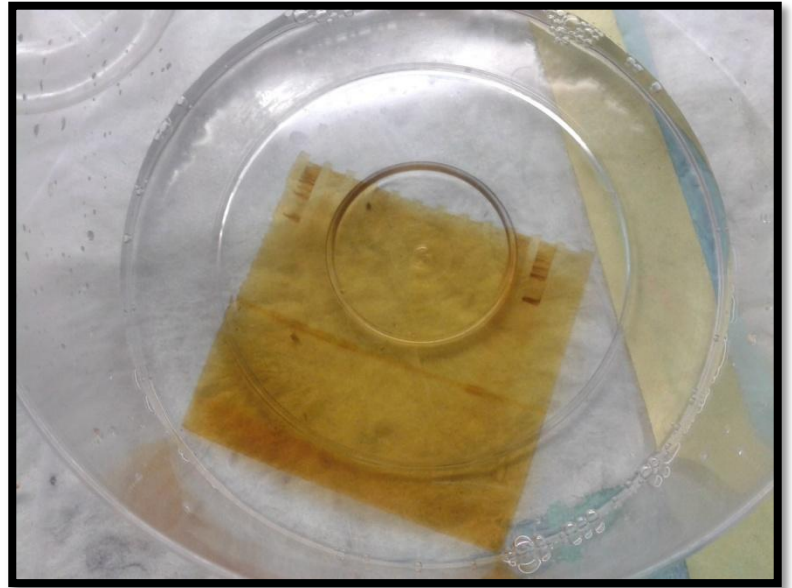
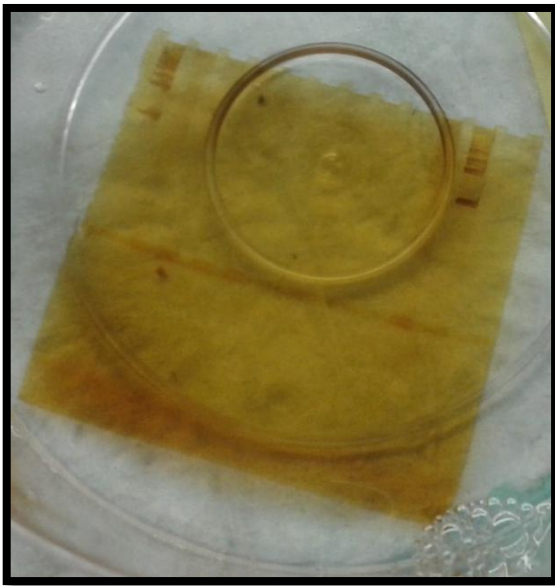
Fotografía N°34 y 35: Gel en Solución de Impregnación



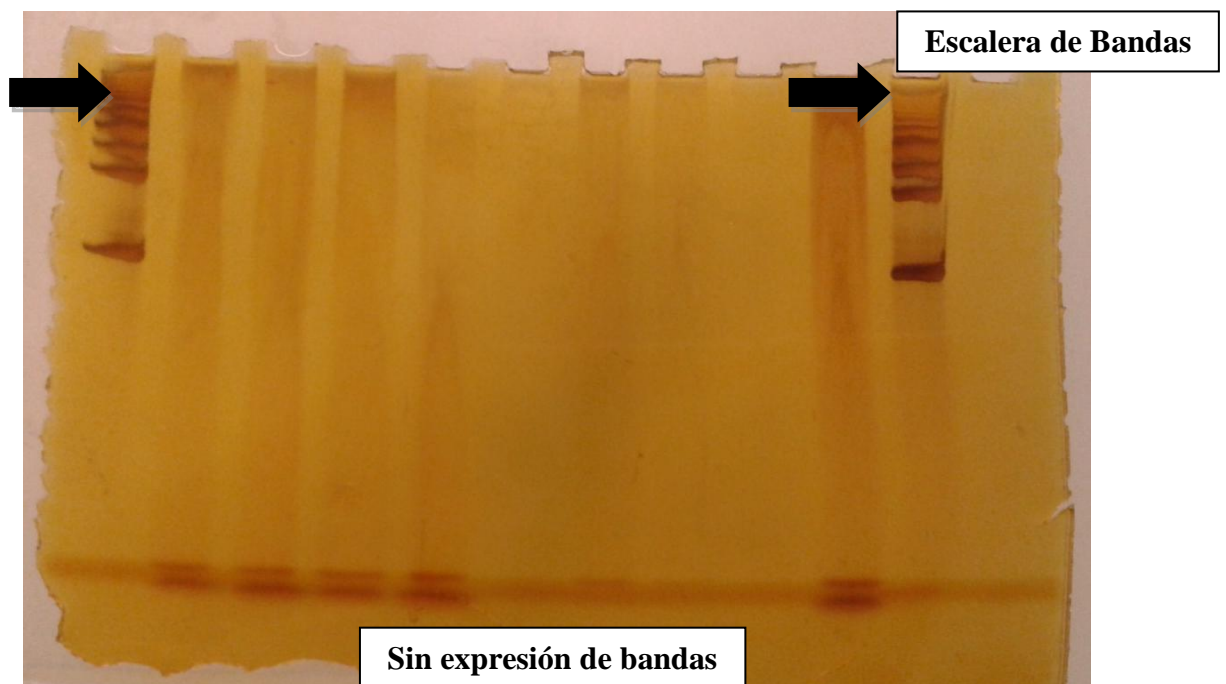
Fotografía N°36: Gel en Solución de Enjuague



Fotografía N°37 y 38: Gel en Solución de Revelado



Fotografía N° 39: Gel de policrilamida (No hay bandas de proteínas)



4.6.14 Anexo N°14: Condiciones para el manejo de modelos animales experimentales:

- Microambiente: El ambiente físico que rodea al ratón es la jaula o caja diseñadas para facilitar el bienestar, estas pueden ser de metal o plástico. Las características que debe cumplir son: proporcionar un espacio adecuado para la protección de amenazas y para que el modelo experimental tenga un espacio suficiente para moverse y expresar las posturas normales de conducta, una ventilación adecuada, facilidad al acceso de agua y alimento, permitir la observación del modelo experimental y un lecho o cama de material absorbente.
- Agua: El agua debe ser potable y ser suministrada libremente en bebederos de vidrio o de policarbonato durante toda la vida del modelo animal experimental. El consumo diario de agua debe ser de 3 a 7 mililitros.
- Alimento: Es importante para mantener la nutrición del animal. La composición del alimento. La composición del alimento debe ser digerible. Estar libre de harina de pescado, aditivos, drogas, hormonas, antibióticos, pesticidas o contaminantes patógenos. El consumo diario de alimento debe ser de 3 a 6 gramos.
- Aire y Ventilación: La ventilación es importante para controlar la humedad, el calor y los gases tóxicos.
- Temperatura y Humedad: La temperatura adecuada es de 20 a 25 °C y la humedad ambiental entre 40 y 70%.
- Iluminación: La distribución de la iluminación debe ser adecuada para el mantenimiento, inspección y bienestar de los modelos animales experimentales, se recomienda doce horas de luz y 12 horas de oscuridad.
- Ruido: Los modelos animales experimentales al ser sensibles al ruido se debe minimizar el ruido hasta 85 decibeles, si el ruido es mayor tiene efectos negativos como el estrés y problemas de fertilidad.
- Olor: El olor es un factor que afecta al modelo animal experimental, por esto no se debe utilizar desinfectantes que tengan olores, sean irritantes o desodorizantes.
- Cuarentena: Este es el tiempo de adaptación de los modelos animales experimentales desde su adquisición hasta su uso para tener animales más sanos y menos estresados.

- Limpieza: Se debe implementar un programa de limpieza de las jaulas con material y utensilios exclusivos para esta función. En el lavado de jaulas y de los frascos bebederos se debe utilizar detergente sobre la superficie interna de los mismos y desinfectarlos con agua caliente o con algún desinfectante como hipoclorito de sodio.

El sistema de control de todos los modelos experimentales tiene un registro para la identificación, controles, inoculaciones y operarios responsables del proyecto de investigación.

El manejo de los modelos animales experimentales se realiza a través de la inmovilización de los mismos al sujetarlos por la zona media de la cola, ubicando la cola entre los dedos anular y meñique, sujetar rápidamente la piel de la parte superior del cuello y hombros y finalmente levantar el animal (Fuentes et. alt, 2008).

4.6.15 Anexo N°15: Preparación y Administración Ácido 3- Nitropropiónico (3-NP)

La fórmula utilizada para la administración del químico es la siguiente:

Tabla N° 14: Fórmula Ácido 3- Nitropropiónico

Fórmula	Dosis	Fórmula para ratones
Ácido-3 Nitropropiónico (3-NP)	12 ml /kg	$3NP (ul) = \text{Peso ratón (g)} \frac{1 Kg}{1000g} * \frac{12 ml 3NP}{1 kg} \frac{1000 ul}{1 ml}$

La administración del ácido 3 nitropropiónico (3-NP) en los modelos animales experimentales se realizó a través de la vía intraperitoneal usando jeringas de 1ml y de bisel pequeño. Se aplicó la sujeción del ratón con una mano y se inmovilizó la pata izquierda con una inclinación hacia la cabeza para que se produzca un desplazamiento de las vísceras con el objetivo de no lesionar ninguna. Inmediatamente se insertó la aguja de la jeringa en la piel del ratón exactamente en el cuadrante izquierdo inferior del abdomen y se introduce en la cavidad peritoneal levantando la aguja contra la pared abdominal para evitar una punción en el interior del intestino.



Fuente: Elitono Central - CNPIS del INS. 2007

Figura N° 3: Sujeción del ratón (Fuentes Paredes et. alt, 2008)

Se recomienda que la administración del químico se realice de forma lenta ya que una rápida administración podría causar daño en el tejido y hemorragia provocado por la presión interna.

4.6.16 Anexo N°16: Preparación y Administración de Anestésicos para modelos animales experimentales

Tabla N° 15: Fórmula de Anestésicos para ratones

Fórmula Anestésico	Dosis	Fórmula para ratones
Ketamina	0.8 ml/kg	$Ketamina (ul) = \text{Peso ratón (Kg)} \frac{0,8 \text{ ml ketamina}}{1 \text{ kg}} * \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$
Xilocina	0.2 ml/kg	$Xilocina (ul) = \text{Peso ratón (Kg)} \frac{0,8 \text{ ml Xilocina}}{1 \text{ kg}} * \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$

El ratón al encontrarse sedado se lo colocó en una superficie lisa con el abdomen hacia arriba y con las patas aseguradas a cada extremo. Enseguida, se tomó con pinzas la piel a nivel del diafragma y se corta para exponer el hígado y el corazón.

Al exponer el corazón del modelo animal experimental, se inyecta en el ventrículo izquierdo con una aguja de mariposa. Se corta inmediatamente la aurícula derecha y se dispensa 10 ml de solución salina hasta que el hígado se aclaró a un color café tenue. Finalmente se dispensó 10 ml de Paraformaldehído al 97%.

Se realiza un corte en el cuello del modelo experimental, se comienza a retirar la piel para descubrir el cráneo y se retira el cerebro con cuidado. Al terminar la extracción de cerebro se lo pone en un tubo con paraformaldehído para su posterior análisis.

La perfusión se realizó 24 horas después de la última dosis de 3MP (Ácido 3 nitropropiónico).

4.6.17 Anexo N°17: Preparación y Administración de ARN de interferencia

Tabla N° 16: Fórmula de Solución Madre de ARNi

Total Ratones a Inocular:	8 ratones
Peso Ratones	Cantidad de Solución Madre
1 ratón pesa 20 g,	200 ul
8 ratones (aprox. c/u 25g) 200g	X
Total Solución Madre	2000 ul

La solución madre tiene una concentración de 3-mg/mL de dúplex siRNA en la resuspensión con 500ul de agua ADNasa / RNasa libre. Se recomienda que si es necesario poner la solución en un vortex para resuspender completamente.

Para la preparación de 500 ul de una solución de ARNsi 1.5-mg/mL, se realiza mediante la mezcla de 250 ul de solución madre de ARNsi a 3 mg / ml con 250 ul de tampón. Esta solución se mezcla junto con la invivofectamina, se incubo durante 30 minutos a 50°C y se centrifugo brevemente para recoger la solución final. El volumen final para la inyección al modelo experimental es de 500 ul.

La dosificación de concentraciones para la administración del ARNi se realizó según el peso de cada modelo animal experimental ya que en volumentípico la administración sistémica de 200 ul (para una inyección a baja presión) en concentraciones de 50 a 500mM. Esta combinacióncorresponde a un rango de dosis de ARNi como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla N° 17: 1° Concentración de ARNi

Dosis (mg/kg)	Nmol siRNA/Dosis	Concentración por 200 ul Dosis (uM)
1.0	1.5	7.4
5.0	7.4	37.0
10.0	14.8	74.0
20.0	29.6	148.0
50.0	74.0	370.0

La preparación de las concentraciones en los modelos animales experimentales se indica en la siguiente tabla:

Tabla N° 18: 1° Preparación de concentraciones de ARNi

PREPARACIÓN DE CONCENTRACIONES	
Fórmula: $C1*VI=C2*V2$	
Volumen Final de Solución ARN de interferencia: 500 ul	
Datos: Para concentración 7,4 nmol siRNA	
C1= 1,5 mg/ml siRNA V1= 250ul (0.25 ml) siRNA FVII C2=7.4 V2=X	$C2 = \frac{C1VI}{V2} = \frac{1.5 * 0.25}{7.4} = 0.050 \text{ ml}$ $= 50.67 \text{ ul}$ Volumen Ambion® siRNA FVII en 449.33 buffer compleción
Datos: para concentración 14.8 nmol siRNA	
C1= 1,5 mg/ml siRNA V1= 250ul (0.25 ml) siRNA FVII C2=14.8 V2=X	$C2 = \frac{C1VI}{V2} = \frac{1.5 * 0.25}{14.8} = 0.025 \text{ ml}$ $= 25.33 \text{ ul}$ Volumen Ambion® siRNA FVII en 474.66 buffer compleción
Datos: para concentración 29.6 nmol siRNA	
C1= 1,5 mg/ml siRNA V1= 250ul (0.25 ml) siRNA FVII C2=29.6 V2=X	$C2 = \frac{C1VI}{V2} = \frac{1.5 * 0.25}{29.6} = 0.012 \text{ ml}$ $= 12.66 \text{ ul}$ Volumen Ambion® siRNA FVII en 487.66 buffer compleción
Datos: para concentración 74,0 nmol siRNA	
C1= 1,5 mg/ml siRNA V1= 250ul (0.25 ml) siRNA FVII C2=74.0 V2=X	$C2 = \frac{C1VI}{V2} = \frac{1.5 * 0.25}{74.0} = 0.012 \text{ ml}$ $= 5.06 \text{ ul}$ Volumen Ambion® siRNA FVII en 494.93 buffer compleción

4.6.18 Anexo N°18: Técnica de Electroforesis de proteínas

- Preparación del sistema de electroblotting: Para comenzar el funcionamiento del electroblotting se limpió las placas de vidrio del sistema de electroblotting para cada gel primero con agua destilada y luego con etanol al 70%. Se recomienda evitar hendiduras entre las placas de vidrio del sistema de electroblotting que pueden provocar daño en la silicona. La unidad de electroblotting está lista para la preparación del gel.
- Ensamble del sistema de electroblotting: Se ubicó junto a la placa espaciadora de vidrio plano con la placa dentada para insertar el interior de barra de presión con el módulo sobre una superficie plana. Se apretó completamente los tornillos asegurándose que la unidad no tambalee para poner la solución de gel y dejar solidificar. Entonces en la solución del gel insertar el peine de apilamiento.
- Selección del Gel: Para la selección del gel se debió tener cuidado al seleccionar el tamaño de poro del gel. Estas fórmulas son para Trisglicina geles de SDS. El tamaño de los poros del gel determina la capacidad de resolver diferentes tamaños de proteína. La tabla siguiente detalla que porcentaje de gel para usar para separar los tamaños de las proteínas indicadas. Para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) se utilizó un gel del 12%.

Tabla N° 19: Resolución de Separación de gel según porcentaje de Acrilamida

Porcentaje Acrilamida	Resolución de Separación
5%	60-220 KD
7.5%	45-120 KD
10%	25-75 KD
12%	14.5-65 KD
15%	6.5-45 KD
17.5%	5.5-30 KD

- Preparación del gel:

La preparación de la solución de gel de separación para dos 10x10 utilizando geles de 1mm de espaciadores es descrita en la siguiente tabla:

Tabla N° 20: Preparación de Gel de poliacrilamida

Solución	5%	7.5%	10%	12%	15%	17.5%
Agua destilada	8.7 mL	7.5mL	6.3mL	5.25mL	3.7mL	2.5mL
30% de Solución Stock Acrilamida	2.5mL	3.75mL	5mL	6mL	7.5mL	8.75mL
4 X Tris SDS solución pH 8.8	3.75mL	3.75mL	3.75mL	3.75mL	3.75mL	3.75mL
10% Persulfato de amonio	150 ul	150 ul	150 ul	150 ul	150 ul	150 ul
TEMED (Tetramethylethylenediamine)	15 ul	15 ul	15 ul	15 ul	15 ul	15 ul

Para la preparación de las soluciones 30% Solución Stock Acrilamida, 4X Tris SDS y 10% Persulfato de amonio se siguieron las siguientes tablas:

Tabla N° 21: Preparación de Solución Stock 4X Resolving

Stock 4X Resolving Gel tris (1.5 M trisHCl pH8.8 0.4% SDS)
110 mL de agua destilada con 36.4 g de Tris base
8 mL de 10% SDS
Ajustar el pH 8.8 con 1N HCl
Ajustar el volumen final a 200 mL con Agua destilada

Tabla N° 22: Preparación de Solución Stock 4X Staking

Stock 4X Staking tris (0.5 M trisHCl pH6.8 0.4% SDS)
110 mL de agua destilada con 12.12 g de Tris base
8 mL de 10% SDS
Ajustar el pH 6.8 con 1N HCl
Ajustar el volumen final a 200 mL con Agua destilada

Tabla N° 23: Preparación de Solución Persulfato de amonio

10% APS solución persulfato de amonio	
0.1 g de persulfato de amonio	
1 ml de agua destilada	

Tabla N° 24: Preparación de Solución Stock de Gel Acrilamida 30%

Solución Stock de Gel de Acrilamida 30%	
30.0 g	Acrilamida
0.8 g	Bisacrilamida metileno
100ml	Agua destilada

Al tener preparado la solución del gel se llenó las placas de vidrio hasta la línea de los peines y se evitó la generación de burbujas de aire. El llenado se realizó rápidamente antes de que el gel sea demasiado viscoso. Se dejó que el gel de resolución se polimerice. Esto por lo general toma de 15 a 3 minutos. Es recomendable que si el tiempo de polimerización es excesivo, use un material fresco de solución de persulfato de amonio.

Tabla N° 25: Preparación de Solución 1X Tris glicina

1X Trisglicina tank buffer SDS
750 ml de 4X Tris glicina tank buffer SDS
30 ml de 10% SDS
3 L de agua destilada
Añadir agua destilada para un volumen final de 200 ml

- Preparación de la proteína para la carga en el gel:

Desparafinación de tejidos:

Tomar las muestras y añadir 1 ml de xilol precalentado a 50 °C a cada microtubo y se mantuvo a 56 °C por 10 minutos, luego centrifugar a 10000 rpm, temperatura ambiente, por 5 minutos. Decantar el sobrenadante y se realizar varios cambios de xilol hasta que la parafina se removiera. El tejido sin parafina

lavar con etanol absoluto, etanol al 95% y etanol al 70%, cada cambio fue antecedido por una centrifugación a 10000 rpm por cinco minutos.

Extracción de proteínas:

Las muestras que tienen 1 mg de tejido se adicionan 1 ml de tampón de lisis rápidamente al tubo, homogeneizar con un homogeneizador, mantener la agitación constante durante 2 horas a 4 ° C. Después se centrifuga durante 20 minutos a 12.000 rpm a 4 ° C en una microcentrífuga. Retire con cuidado los tubos de la centrífuga y aspirar el sobrenadante y colocar en un tubo nuevo; descartar el sedimentar.

Tabla N° 26: Preparación de Solución Tampón de Lisis

Tampón de Lisis
150 mM Cloruro de sodio
1,0% Triton X-100
50 mM Tris pH 8,0

Para la preparación de la carga de las proteínas el volumen de la muestra dependió de la capacidad de los pocillos.

Para la desnaturalización se calienta las muestras durante 2 minutos y se centrifuga las muestras en una microcentrífuga durante 20 segundos a 12.000 rpm. Las muestras de proteínas ya están listas para cargar.

- Carga de las proteínas: Se transfirió el gel interior en el tanque principal en la orientación correcta, se llenó el tanque exterior con tampón de reserva. El tanque interno mínimo se llena justo antes de inundar la parte inferior de las placas de vidrio, mínimo, (250 ml) lo que puede afectar la resolución. La carga de las muestras en los pocillos se realizó utilizando una punta de pipeta teniendo cuidado de no dañar los pozos o crear burbujas de aire y se debe tener en cuenta la orientación en la que las muestras se cargan.

-Funcionamiento del gel: Se colocó la tapa del sistema de electroblotting y se conectó a una fuente de alimentación. Para correr un gel se utiliza un voltaje de 90 a 225 voltios. La condición de potencia recomendada para una resolución óptima con

mínima distorsión de banda térmica es de 150 voltios, con un ajuste de voltaje constante. Los tiempos de ejecución varían con la concentración y tamaño de proteínas. El tiempo habitual de ejecuciones de aproximadamente 40 a 45 minutos. Durante 45 minutos de ejecución, la corriente disminuirá lentamente hasta aproximadamente 20mA por el gel. Esto es causado por el cambio de iones del tampón en el gel, causando un lento aumento en la resistencia en el gel. Como era de esperar de la Ley de Ohm. Se recomienda siempre desenchufar el cable de la fuente de alimentación antes de retirarla tapa. Se retira el módulo del gel después de vaciar el búffer interno en el tanque principal y se afloja los seguros de presión para liberar las placas de vidrio, suavemente apartarlas placas de vidrio.

El gel normalmente se adhiere a una de las placas y se puede quitar con un remojo en el tampón y luego levantándolo suavemente con una espátula. El gel está listo para su posterior análisis.

-Análisis del gel: El gel al finalizar su corrimiento se colocó en:

- Solución de Fijación: El gel debe permanecer en la solución fijadora por 15 minutos.

Tabla N° 27: Preparación de Solución de Fijación

Solución de Fijación
25ml de Etanol Absoluto
0,7 ml de Ácido Acético
Aforar a 250 ml de Agua destilada

-Solución de Impregnación: El gel debe permanecer en la solución de impregnación por 10 minutos en agitación constante

Tabla N° 28: Preparación de Solución de Impregnación

Solución de Impregnación
0,15 gr de Nitrato de Plata (AgNO_3)
50 ml de Solución Fijadora
100 ml de Agua destilada

- Solución de Enjuague: Al terminar con la impregnación, se realizó un enjuague con agua destilada por 1 minuto.

Solución de Revelado: Terminado el enjuague, se procedió al revelado y se agita hasta que se vean las bandas.

Tabla N° 29: Preparación de Solución de Revelado

Solución de Revelado
2 gr de Hidróxido de Sodio (NaOH)
1 ml de Formaldehido
140 ml de Agua destilada

Se dejó secar el gel por algunos minutos y se lo llevó a la plataforma de luz para fotografía.

4.6.19 Anexo N°19: Datos de modelos animales experimentales inoculados con 3- ácido Nitropropiónico (3-NP)

Tabla N° 30: Datos de ratones en cada dosis de 3 NP

Ratones inoculados con Ácido 3 Nitropropiónico				
N° de Ratón	1° Dosis 3 NP	2° Dosis 3 NP	3° Dosis 3 NP	Observación
1	Somnolencia, comportamiento pasivo, marcha descoordinada, sin rigidez en la cola	Movimientos ondulantes, disminución de la actividad motora, pérdida de movimiento de patas traseras y de visión. Pérdida de apetito y de consumo de agua. Movimientos anormales como temblor y leve rigidez de la cola	Movimientos ondulantes, disminución de la actividad motora, pérdida de movimiento de patas traseras y de visión. Pérdida de apetito y de consumo de agua. Movimientos anormales como temblor y rigidez de la cola. Aun mantiene sensibilidad de cola y patas traseras	Pérdida severa de peso aproximadamente de 5 gr. del 16/07/2013 al 18/07/2013 Pérdida total de movimientos de patas traseras, disminución total de actividad motora. No realiza ningún movimiento, aparentemente ciego. Además de pérdida de apetito y de consumo de agua Se realiza perfusión el 18/07/2013 con un peso de 0.01546 kg ya que no presenta esperanza de vida.
2	Somnolencia, comportamiento	Movimientos ondulantes,	Movimientos ondulantes,	

	pasivo, marcha descoordinada, sin rigidez en la cola	disminución de la actividad motora Movimientos anormales como temblor y leve rigidez de la cola	disminución de la actividad motora Movimientos anormales como leve rigidez de la cola. Presenta leve temblor. Comportamiento pasivo, no agresivo. Pérdida leve de movimiento patas traseras. Consumo mayor de agua	
3	Somnolencia, comportamiento pasivo, marcha descoordinada, sin rigidez en la cola	Movimientos ondulantes, disminución de la actividad motora Movimientos anormales como temblor y leve rigidez de la cola	Movimientos ondulantes, disminución de la actividad motora Movimientos anormales como leve rigidez de la cola. Presenta leve temblor. Comportamiento pasivo, no agresivo. Pérdida leve de	

			movimiento patas traseras. Pérdida de peso Consumo mayor de agua	
4	Somnolencia, comportamiento pasivo, marcha descoordinada, sin rigidez en la cola	Somnolencia, comportamiento pasivo marcha descoordinada Movimientos ondulantes, disminución de la actividad motora	Muerto 15/07/2013	No resistió la 2° dosis de 3NP Alcance de la dosis de 3NP del 29% (2 de 7 inyecciones)
5	Somnolencia, comportamiento pasivo, marcha descoordinada, sin rigidez en la cola	Movimientos ondulantes, disminución de la actividad motora Movimientos anormales como temblor y leve rigidez de la cola. Pérdida de movimiento de pata trasera izquierda Pérdida leve de apetito	Movimientos ondulantes, disminución de la actividad motora Movimientos anormales como temblor y leve rigidez de la cola. Pérdida de movimiento de pata trasera izquierda Pérdida de peso Recuperación de apetito y consumo mayor	

			de agua	
6	Somnolencia, comportamiento pasivo, marcha descoordinada, sin rigidez en la cola	Somnolencia, comportamiento pasivo marcha descoordinada Movimientos ondulantes, disminución de la actividad motora	Muerto 15/07/2013	No resistió la 2° dosis de 3NP Alcance de la dosis de 3NP del 29% (2 de 7 inyecciones)
7	Somnolencia, comportamiento pasivo, marcha descoordinada, sin rigidez en la cola	Movimientos ondulantes, disminución de la actividad motora Movimientos anormales como temblor y leve rigidez de la cola. Presenta temblor y una leve pérdida de movimiento de patas traseras	Movimientos ondulantes, disminución de la actividad motora Movimientos anormales como leve rigidez de la cola. Presenta leve temblor. Comportamiento pasivo, no agresivo. Pérdida leve de movimiento patas traseras. Pérdida de peso Consumo mayor de agua	

8	Somnolencia, comportamiento pasivo, marcha descoordinada, sin rigidez en la cola	Somnolencia, comportamiento pasivo marcha descoordinada Movimientos ondulantes, disminución de la actividad motora	Muerto 15/07/2013	No resistió la 2º dosis de 3NP Alcance de la dosis de 3NP del 29% (2 de 7 inyecciones)
9	Somnolencia, comportamiento pasivo, marcha descoordinada, sin rigidez en la cola	Somnolencia, comportamiento pasivo marcha descoordinada	Muerto 15/07/2013	No resistió la 2º dosis de 3NP Alcance de la dosis de 3NP del 29% (2 de 7 inyecciones)
10	Somnolencia, comportamiento pasivo, marcha descoordinada, sin rigidez en la cola	Movimientos ondulantes, disminución de la actividad motora	Muerto 15/07/2013	No resistió la 2º dosis de 3NP Alcance de la dosis de 3NP del 29% (2 de 7 inyecciones)

4.6.20 Anexo N°20: Datos de modelos animales experimentales inoculados con 3- ácido Nitropropiónico (3-NP) y tratados con ARN de interferencia (ARNi)

Tabla N° 31: Datos de ratones con 3 NP + ARNi

Ratones inoculados con 3NP + ARNi			
N° de Ratón	Semana	Descripción	Observación
1	Tercera	Movimientos normales, actividad motora en aumento, recuperación de movimiento de	Aumento de peso desde la inoculación con ARNi
2	Tercera	patas traseras Aumento de apetito y de consumo	Aumento de peso desde la inoculación con ARNi
3	Tercera	de agua. Movimientos anormales como temblor y rigidez de la cola disminuidos	Aumento de peso desde la inoculación con ARNi
4	Tercera		Aumento de peso desde la inoculación con ARNi
5	Tercera	Movimientos normales, actividad motora en aumento,	Aumento de peso desde la inoculación con ARNi

		Aumento de apetito y de consumo de agua.	
6	Tercera	Movimientos anormales como temblor y rigidez	Aumento de peso desde la inoculación con ARNi
7	Tercera	de la cola disminuidos Comportamiento pasivo, no agresivo.	Aumento de peso desde la inoculación con ARNi
8	Tercera		Aumento de peso desde la inoculación con ARNi
9	Tercera	Movimientos normales, actividad motora en aumento, recuperación de movimiento de patas traseras Aumento de apetito y de consumo de agua. Movimientos anormales como temblor y rigidez de la cola disminuidos	Aumento de peso desde la inoculación con ARNi
10	Tercera	Modelo experimental muerto en la dosis de 3-NP utilizado como control	