

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

ESCUELA DE BIOANALISIS



**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE BIOQUÍMICA
CLÍNICA**

**“Estandarización de ensayos de expresión génica del biomarcador
urinario *CD3e mRNA* en pacientes trasplantados renales”**

MISHELL MORENO SAMANIEGO

DIRECTORA: Ana María Troya Zuleta, M.Sc.

QUITO, 2016

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Mishell Carolina Moreno Samaniego con CI: 060408117-4, autora del trabajo de graduación titulado: “Estandarización de ensayos de expresión génica del biomarcador urinario *CD3e mRNA* en pacientes trasplantados renales”, previa a la obtención del grado académico de Bioquímica Clínica en la Escuela de Bioanálisis.

1. Declaro tener el 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 forma 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 del sitio web de la PUCE el referido trabajo y graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito

Mishell Moreno S.

CI: 060408117-4

Dedico éste trabajo a las personas más importantes en mi vida, mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Ha sido un largo y arduo camino lleno de aprendizaje, una etapa de mi vida llena de sorpresas y pruebas. Pero sin duda, he sido muy afortunada.

Estoy muy agradecida con la vida por brindarme la oportunidad de poder culminar una de las etapas más decisivas de mi vida, en todo el camino recorrido he tenido la oportunidad de conocer personas muy valiosas con las que he compartido penas y alegrías, afianzando lazos de amistad, hermandad, profesionales pero sobretodo familiares.

Ahora que tengo la oportunidad de plasmar mis ideas y conocimientos en éste trabajo tan importante para la culminación de mi carrera, quiero agradecer de todo corazón a todas las personas que estuvieron presentes directa o indirectamente en todo éste proceso.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, mi alma máter que me ha formado integralmente brindándome la oportunidad no sólo de enfocarme en mis estudios sino de desenvolverme en ámbitos culturales gracias a sus programas de arte.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE que hoy la considero mi segunda alma máter, quienes, a pesar de pertenecer a otra institución académica, me abrieron las puertas dándome toda la apertura y confianza para trabajar en sus laboratorios de investigación.

Al laboratorio de Biología Molecular del Hospital Carlos Andrade Marín en nombre de la Master Isabel Baroja, que nos permitió realizar parte del proyecto en sus instalaciones facilitándonos el equipo y las muestras pertinentes.

Al Dr. Marcelo Grijalva, Jefe de los Laboratorios de los Nanomedicina y Nanobiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas, por la ayuda y el apoyo brindado, gracias por confiar en mis capacidades y darme la oportunidad de ser parte de un gran proyecto.

A María José Vallejo, investigadora técnica de los Laboratorios de los Nanomedicina y Nanobiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas, y a todo el personal investigativo que labora en éste establecimiento, que más allá de ser mis compañeros de trabajo se convirtieron en mis amigos, agradezco toda la comprensión y paciencia que me han brindado.

A mi tutora de tesis, Máster Ana María Troya, quien además de ser mi maestra ha sido mi amiga incondicional. Un alma libre, sabia y descomplicada que ha sabido escuchar, aconsejar, apoyar y regañar en los momentos oportunos, mi gratitud infinita.

A mis profesores de la Escuela de Bioanálisis que son la piedra angular de la institución, gracias por brindarnos todo su conocimiento.

A mi familia. Mis padres Telmo y Gladys, mi ejemplo, mis guardianes silenciosos que a pesar de todo pronóstico siempre confiaron en mi trabajo y en mis capacidades, dándome todo el apoyo y las fuerzas necesarias para no dejarme caer en los momentos más difíciles y críticos.

A mis hermanos María Belén y Telmo; y a mi primo Daniel, hombros de apoyo, grandes consejeros que con sus palabras de aliento, su humor y enseñanzas hacen de mi vida una aventura constante.

A mis tías Gladys y Anita, mis segundas madres, que me han abierto las puertas de su casa incondicionalmente, dándome mi segundo hogar.

Y finalmente, pero no por eso menos importante. A mis amigos, mis compañeros de vida. Gracias por estar a mi lado no sólo en las buenas sino en las malas, por darme las palabras de aliento en el momento exacto, por sujetar mi mano cuando estuve cerca de caer por aquellos grandes consejos en esas largas conversaciones seguir a mi lado a pesar de todo.

RESUMEN

El trasplante renal es el tratamiento final para la insuficiencia renal. El costo de la cirugía, la dificultad para encontrar un donante compatible y la corta sobrevida que tiene el aloinjerto, lo convierten en un procedimiento de alta complejidad. El rechazo agudo es la causa principal de fallo del aloinjerto en el paciente. El gold estándar es la biopsia renal, un método invasivo cuyo diagnóstico depende de la experticia del profesional. Actualmente, se ha investigado en varios países, la posibilidad del diagnóstico temprano de rechazo agudo mediante un método no invasivo que emplea biología molecular. Entre los marcadores estudiados se encuentra *CD3e mRNA*, que es un antígeno de membrana que se encuentra en los linfocitos T y en las células NK. Se conoce que en pacientes con trasplante renal existe una alta concentración de linfocitos T reactivos en muestras de orina, mientras que en aquellos que no han presentado ningún tipo de daño renal no se los encuentra. Un posible predictor del rechazo agudo, es la presencia del biomarcador *CD3e mRNA* en la orina. Optimizar ensayos de expresión génica mediante qPCR del biomarcador a partir de muestras de orina en pacientes post trasplante renal fue el principal objetivo de este estudio. Como gen de referencia se usó a *18S rRNA*, por lo cual se optimizaron ambos sistemas. El RNA total fue obtenido de células presentes en el pellet urinario para la optimización del sistema. La muestra fue purificada mediante TURBO DNA-free kit. Posteriormente, se hicieron ensayos para la optimización de la RT-PCR convencional, mediante gradientes de temperaturas para cada gen, siendo la óptima 61°C. La sensibilidad analítica de ambos biomarcadores fue de hasta 7×10^{-3} ng/ul. Para la RT-qPCR la temperatura óptima fue 63°C. La eficiencia de amplificación para *CD3e mRNA* fue del 70% y 76% para *18S rRNA*. Finalmente se realizó una prueba de campo en cinco muestras de orina de pacientes trasplantados y cinco no trasplantados. Donde se comprobó que el

marcador de estudio (*CD3e mRNA*) se expresa solamente en muestras de pacientes con trasplante, mientras que el gen de referencia (*18S rRNA*) se expresó en todos los pacientes pero con mayor intensidad en aquellos que tenían un trasplante renal.

Palabras clave: Rechazo renal agudo, *CD3e mRNA*, *18S rRNA*, RT-PCR, RT-qPCR, Expresión génica.

ABSTRACT

Kidney transplantation is the final treatment for kidney failure. The cost of surgery, the difficulty of finding a compatible donor and the short allograft survival, make it a highly complex process. Acute rejection is the major cause of failure of the allograft into the patient. The gold standard is renal biopsy, an invasive method whose diagnosis depends on the professional expertise. Currently, it has been investigated in several countries the possibility of early diagnosis of acute rejection by a non-invasive method using molecular biology. Among the markers studied is *CD3e mRNA*, which is a membrane antigen found on T and NK cells. It is known that in patients with renal transplantation there is a high concentration of reactive T cells in urine samples, while those that have not submitted any kidney damage we cannot find them. A possible predictor of acute rejection is the presence of the biomarker *CD3e mRNA* in urine. Optimize gene expression assays using qPCR of the biomarker from urine samples in patients after renal transplantation was the primary objective of this study. We use *18S rRNA* as reference gene, so both systems were optimized. The total RNA was obtained from cells present in urine pellet for the systems optimization. The sample was purified by TURBO DNA-free kit. Subsequently, tests for the optimization of conventional RT-PCR were, by temperature gradients for each gene, optimally at 61 ° C. The analytical sensitivity of both biomarkers was up 7×10^{-3} ng / ul. The optimum temperature for RT-qPCR was 63 ° C. The amplification efficiency for *CD3e mRNA* was 70% and 76% for *18S rRNA*. Finally, a field test was conducted in five urine samples from transplant patients and five non-transplanted. It was found that the marker in study (*CD3e mRNA*) is expressed only in samples from transplant patients, whereas the reference gene (*18S rRNA*) was expressed in all patients but more intensely in those who had a kidney transplant.

Keywords: Acute renal rejection, *CD3e mRNA*, *18S rRNA*, RT-PCR, RT-qPCR, gene expression.

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
1.1. JUSTIFICACIÓN	4
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
1.3. OBJETIVOS	6
1.3.1. OBJETIVO GENERAL	6
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
1.4. HIPÓTESIS	6
1.5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	7
CAPÍTULO II	
2. MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL	8
2.1. ANTECEDENTES	8
2.2. MARCO TEÓRICO	9
2.2.1. CAUSAS DE FALLO RENAL	9
2.2.1.1. Rechazo al aloinjerto	9
2.2.1.2. Rechazo hiperagudo	9
2.2.1.3. Rechazo agudo	10
2.2.1.4. Rechazo crónico	11
2.2.2. INMUNOLOGÍA DEL TRANSPLANTE	11
2.2.2.1. Respuesta celular y humoral	11
2.2.2.2. Antígenos histocompatibles	12

2.2.3.	DIAGNÓSTICO DEL RECHAZO AGUDO	13
2.2.4.	TRATAMIENTO DEL RECHAZO AGUDO	14
2.2.4.1.	Terapia de inmunosupresión	14
2.2.5.	INVESTIGACIÓN MOLECULAR Y EXPRESIÓN GÉNICA	14
2.2.5.1.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	15
2.2.5.1.1.	Transcripción inversa o retotranscripción (RT-PCR)	15
2.2.5.1.2.	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	16
2.2.5.2.	Marcadores biológicos	17
2.2.5.2.1.	Marcadores biológicos en el rechazo agudo	17
2.2.5.2.1.1.	Biomarcador CD3e mRNA	17
2.2.5.2.1.2.	Biomarcador 18S rRNA	18
2.3.	MARCO CONCEPTUAL	18
CAPÍTULO III		
3.	MARCO METODOLÓGICO	21
3.1.	METODOLOGÍA	21
3.1.1.	TIPO DE ESTUDIO	21
3.1.2.	TIPO DE MUESTREO	21
3.1.3.	CONTROL DE CALIDAD	21
3.1.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
3.2.	MATERIALES Y PROCESAMIENTO	22
3.2.1.	MATERIALES Y EQUIPOS	22
3.2.2.	REACTIVOS	23
3.2.3.	PROCESAMIENTO	24

3.2.4. FASES	25
3.2.4.1. Diseño de Cebadores y Sondas	25
3.2.4.2. Obtención de Muestra	25
3.2.4.2.1. Extracción de ARN desde sangre total	25
3.2.4.2.2. Extracción de ARN desde orina	26
3.2.4.2.3. Cuantificación de ARN total	27
3.2.4.2.4. Purificación con DNAsas	28
3.2.4.3. Ensamblaje de la RT-PCR convencional	28
3.2.4.4. Visualización y fotodocumentación de productos obtenidos de la RT-PCR	29
3.2.4.5. Ensamblaje de la RT-qPCR	29
CAPÍTULO IV	
4. RESULTADOS	30
4.1. EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN	30
4.1.1. Muestras de sangre	30
4.1.2. Muestras de orina	31
4.2. TRANSCRIPCIÓN INVERSA DE PUNTO FINAL (RT-PCR convencional)	38
4.2.1. Biomarcador <i>CD3e mRNA</i>	38
4.2.2. Biomarcador <i>18S rRNA</i>	40
4.3. TRANSCRIPCIÓN INVERSA TIEMPO REAL (RT-qPCR)	43
4.3.1. Ensayos de optimización de la RT-qPCR con Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit del biomarcador <i>CD3e mRNA</i>	43
4.3.2. Ensayos de RT-qPCR para los biomarcadores <i>CD3e mRNA</i> y <i>18S rRNA</i> con TaqMan® RNA-to-CT 1-Step Kit de Applied Biosystems	49

4.3.3. Ensayos de RT-qPCR en pacientes con trasplante renal de los biomarcadores <i>CD3e mRNA</i> y <i>18S rRNA</i>	51
4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	56
CAPÍTULO V	
5. DISCUSIÓN	63
CAPÍTULO VI	
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	66
6.1. CONCLUSIONES	66
6.2. RECOMENDACIONES	68
BIBLIOGRAFÍA	70
ANEXOS	76

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cuantificación de RNA total obtenido desde muestra de sangre, después de la purificación en el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific)	30
Tabla 2. Cuantificación de RNA total de muestras de pacientes de trasplante renal antes de purificar	32
Tabla 3. Cuantificación de RNA total de muestras de pacientes de trasplante renal después de purificar	34
Tabla 4. Cuantificación de RNA total de muestras de pacientes control después de purificar	36
Tabla 5. Resultados de expresión del biomarcador <i>CD3e mRNA</i> en tripletas por pacientes de cada ensayo	53
Tabla 6. Resultados de expresión del biomarcador <i>18S rRNA</i> en tripletas por pacientes de cada ensayo	56
Tabla 7. Resultados de expresión del biomarcador <i>18S rRNA</i> en tripletas por pacientes de cada ensayo	58
Tabla 8. Cuantificación relativa de la expresión génica en el ensayo #1	59
Tabla 9. Cuantificación relativa de la expresión génica en el ensayo #2	60
Tabla 10. Cuantificación relativa de la expresión génica en el ensayo #3	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Visualización del material genético en cámara de UV en gel de agarosa 0.8%.	31
Figura 2.	Curvas de cuantificación de las muestras de pacientes con trasplante renal antes de la purificación	33
Figura 3.	Curvas de cuantificación de las muestras de pacientes con trasplante renal después de la purificación	35
Figura 4.	Curvas de cuantificación de las muestras control después de la purificación	37
Figura 5.	Visualización del amplicón <i>CD3e mRNA</i> en cámara de UV en gel de agarosa 2%	38
Figura 6.	Visualización de la prueba de eficiencia de <i>CD3e mRNA</i> en cámara de UV en gel de agarosa 2%	39
Figura 7.	Visualización de la prueba de sensibilidad analítica de <i>CD3e mRNA</i> en cámara de UV en gel de agarosa 2%	40
Figura 8.	Visualización del amplicón <i>18S rRNA</i> en cámara de UV en gel de agarosa 2%	41
Figura 9.	Visualización de la prueba de eficiencia de <i>18S rRNA</i> en cámara de UV en gel de agarosa 2%	41
Figura 10.	Visualización de la prueba de sensibilidad analítica de <i>18S rRNA</i> en cámara de UV en gel de agarosa 2%	42
Figura 11.	Curva de disociación obtenida para el ensayo #1 del biomarcador <i>CD3e mRNA</i> con Power SYBR [®] Green RNA-to-CT™ 1-Step kit a 61°C	44
Figura 12.	Curva de amplificación obtenida para el ensayo #1 del biomarcador <i>CD3e mRNA</i> con Power SYBR [®] Green RNA-to-CT™ 1-Step kit a 61°C	45
Figura 13.	Curva de disociación obtenida para el ensayo #2 del biomarcador <i>CD3e mRNA</i> con Power SYBR [®] Green RNA-to-CT™ 1-Step kit a 63°C	46

Figura 14.	Curva de amplificación obtenida para el ensayo #2 del biomarcador <i>CD3e mRNA</i> con Power SYBR [®] Green RNA-to-CT [™] 1-Step kit a 63°C	47
Figura 15.	Curva de disociación obtenida para el ensayo #3 del biomarcador <i>CD3e mRNA</i> con Power SYBR [®] Green RNA-to-CT [™] 1-Step kit a 65°C	48
Figura 16.	Curva de amplificación obtenida para el biomarcador <i>CD3e mRNA</i> con TaqMan [®] RNA-to-CT 1-Step Kit de Applied Biosystems a 63°C	49
Figura 17.	Curva de amplificación obtenida para el biomarcador <i>18S rRNA</i> con TaqMan [®] RNA-to-CT 1-Step Kit de Applied Biosystems a 63°C	50
Figura 18.	Curvas de amplificación obtenidas en el ensayo #1 de los diez pacientes para el biomarcador <i>CD3e mRNA</i> con TaqMan [®] RNA-to-CT 1-Step Kit de Applied Biosystems	51
Figura 19.	Curvas de amplificación obtenidas en el ensayo #2 de los diez pacientes para el biomarcador <i>CD3e mRNA</i> con TaqMan [®] RNA-to-CT 1-Step Kit de Applied Biosystems	52
Figura 20.	Curvas de amplificación obtenidas en el ensayo #3 de los diez pacientes para el biomarcador <i>CD3e mRNA</i> con TaqMan [®] RNA-to-CT 1-Step Kit de Applied Biosystems	52
Figura 21.	Curvas de amplificación obtenidas en el ensayo #1 de los diez pacientes para el biomarcador <i>18S rRNA</i> con TaqMan [®] RNA-to-CT 1-Step Kit de Applied Biosystems	54
Figura 22.	Curvas de amplificación obtenidas en el ensayo #2 de los diez pacientes para el biomarcador <i>18S rRNA</i> con TaqMan [®] RNA-to-CT 1-Step Kit de Applied Biosystems	55
Figura 23.	Curvas de amplificación obtenidas en el ensayo #3 de los diez pacientes para el biomarcador <i>18S rRNA</i> con TaqMan [®] RNA-to-CT 1-Step Kit de Applied Biosystems	55
Figura 24.	Regresión lineal entre los valores CT del biomarcador <i>CD3e mRNA</i> y las concentraciones de las diluciones seriadas (log. base 10 y log. base 2)	57

Figura 25. Regresión lineal entre los valores CT del biomarcador <i>18S rRNA</i> y las concentraciones de las diluciones seriadas (log. base 10 y log. base 2)	58
Figura 26 Distribución de las varianzas por rangos y frecuencias para el ensayo #1 (Prueba de U de Mann-Whitney)	61
Figura 27. Distribución de las varianzas por rangos y frecuencias para el ensayo #2 (Prueba de U de Mann-Whitney)	61
Figura 28. Distribución de las varianzas por rangos y frecuencias para el ensayo #3 (Prueba de U de Mann-Whitney)	62
Figura 29. Cuantificación relativa de la expresión génica de los pacientes por cada ensayo	62

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1.	Tabla de cebadores y sondas para cada gen	77
ANEXO 2.	Protocolo de aislamiento de RNA a partir del pellet urinario con PureLink [®] RNA Mini Kit	78
ANEXO 3.	Protocolo de purificación de RNA con TURBO DNAsa	80
ANEXO 4.	Protocolo de purificación de RNA con TURBO DNA-free [™] Kit	81
ANEXO 5.	Protocolo del sistema SuperScript [®] III One-Step RT-PCR con Platinum [®] Taq DNA Polimerasa	82
ANEXO 6.	Protocolo para TaqMan [®] RNA-to-CT [™] 1-Step Kit de Applied Biosystems	84
ANEXO 7.	Protocolo para Power SYBR [®] Green RNA-to-CT [™] 1-Step Kit	87

LISTA DE SIGLAS

- RNA: Ácido ribonucleico
- cDNA: Ácido desoxiribonucleico complementario
- rRNA: Ácido ribonucleio ribosomal
- mRNA: Ácido ribonucleico mensajero
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- RT-PCR: Retro transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa
- qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
- T_m: Temperatura de melting
- nM: Nano Molar
- μM: Micro Molar
- ng: Nano gramo
- μl: Micro litro
- ml: Mili litro
- Ct: Threshold cycle: Ciclo de corte

INTRODUCCIÓN

Los riñones son órganos que cumplen un sinnúmero de funciones esenciales para el funcionamiento del cuerpo humano; filtran la sangre y eliminan productos de desecho, regulan el equilibrio ácido-base, mantienen la homeostasis y secretan varias hormonas (principalmente la eritropoyetina) (Venado, Moreno, Rodriguez & López, 2009). Cada persona posee dos riñones localizados en la parte posterior de la cavidad peritoneal, tienen forma de fréjol y miden alrededor de 6 cm de ancho y 12 cm de largo (Ross & Wojciech, 2008).

Los riñones, los uréteres (uno por cada riñón), la vejiga y la uretra; forman el aparato urinario que es el encargado de producir, transportar, almacenar y expulsar la orina hacia el exterior. La unidad funcional del riñón es la nefrona que es la encargada de filtrar la sangre, reabsorbiendo agua y electrolitos necesarios, y desechando productos como urea, creatinina y ácido úrico, además de productos que provienen de la degradación de varias sustancias (Ross & Wojciech, 2008).

El fallo renal se da cuando existe una alteración estructural o funcional en el riñón. Si esta disfunción se prolonga por más de tres meses se la denomina insuficiencia renal crónica. Las principales causas de esta patología son vasculares, glomerulares, túbulo intersticiales y uropatías obstructivas. Se requiere de un tratamiento inmediato para la supervivencia del paciente, frecuentemente diálisis o trasplante, debido a que una alteración en el funcionamiento del riñón afecta a todo el organismo ocasionando un colapso sistémico (Venado, Moreno, Rodriguez & López, 2009).

El trasplante renal es un procedimiento quirúrgico aplicado a pacientes que presentan enfermedad renal terminal, consiste en la extracción del órgano de un donante vivo (generalmente con muerte cerebral) o cadavérico que será insertado en el paciente o receptor. Dependiendo de la condición clínica y anatómica del paciente, el injerto es posicionado con mayor tendencia en la zona iliaca posterior a la vía urinaria en caso de que se necesitare una nueva operación (Ortega, Arias, Jampistol, Matesanz & Morales, 2007).

Se han descrito casos con complicaciones posterior al trasplante por diversas causas y pueden ser rotura espontanea del riñón, traumatismo renal, hemorragias, aneurismas, trombosis, edema, hipertensión, etc. (Ortega, Arias, Jampistol, Matesanz & Morales, 2007).

En el trasplante se toman órganos, tejidos o incluso células de un donante para colocarlos en un receptor. Existen dos tipos de trasplante, el ortópico y el heterotópico. El trasplante ortópico es aquel en el que el injerto se posiciona en la zona anatómica usual mientras que en el trasplante heterotópico, el injerto es colocado en un lugar diferente al normal (Abbas, Lichtman & Pober, 2000).

La mayor problemática que trae consigo el trasplante es el rechazo al injerto. Este rechazo se da debido al sistema de defensa que posee nuestro cuerpo para protegernos de organismos externos extraños, este sistema es denominado inmunitario. Nuestro sistema es capaz de actuar frente al virus, bacteria o microorganismo extraño, destruyéndolo para eliminarlo del sistema (Ortega, Arias, Jampistol, Matesanz & Morales, 2007).

La respuesta celular está a cargo de los linfocitos T que reconocen antígenos en la superficie de las células infectadas. Los antígenos son péptidos unidos a una molécula llamada complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Se han descrito dos tipos de linfocitos T; helper (Th1, Th2) CD4+ y citotóxicos CD8+. Cada uno reconoce un tipo

específico de MHC, los linfocitos CD4⁺ reconocen al MHC II y los linfocitos CD8⁺ al MHC I (Abbas, Lichtman & Pober, 2000).

A partir de este contacto se produce una cascada para la producción de un tipo de interleucina (IL-2), importante en la producción clonal de los linfocitos citotóxicos CD8⁺; éstos, junto a las células NK (natural killers) acudirán al injerto y producirán citoquinas citolíticas para eliminar el injerto (Beneyto Castelló & García Matínez, 2006).

La respuesta humoral se encuentra mediada por anticuerpos secretados por linfocitos B y plasmocitos en los órganos linfoides tras una activación de las células B de memoria o linfocitos B vírgenes. Estos anticuerpos se transportan a través de la circulación hacia los sitios de infección para neutralizar y eliminar las células infectadas, toxinas o microorganismos extraños. Existen 5 tipos de anticuerpos, IgG, IgM, IgA, IgE e IgD (Abbas, Lichtman & Pober, 2000).

CAPÍTULO I

1.1. JUSTIFICACIÓN

La insuficiencia renal crónica tiene como único tratamiento definitivo un trasplante orgánico. Este tipo de intervención quirúrgica representa para los hospitales montos elevados además de los riesgos que toda operación conlleva. Adicionalmente, Vázquez Martul & Veiga Barreiro (2002) determinaron en su estudio que el 35% de pacientes trasplantados renales presentaron episodios de rechazo agudo. De este 35%, el 70 - 80% sufrió pérdida definitiva del injerto debido al rechazo del receptor hacia el órgano donado.

La mayoría de episodios de rechazo agudo postrasplante renal tienen lugar dentro de la segunda a la cuarta semana post trasplante y muy pocos casos se extienden hasta los seis meses (Vázquez Martul & Veiga Barreiro, 2002). El diagnóstico se da de igual manera en este lapso de tiempo, es decir que se proporciona tratamiento cuando los mecanismos de rechazo pueden haber causado daño en el injerto y la terapéutica inmunosupresora podría no ser ya efectiva (Hartono, Muthukumar & Suthanthiran, 2010).

Varios estudios recientes sugieren la posibilidad de identificar marcadores moleculares de rechazo agudo renal de manera temprana (Ting, Coates, Walker & Mclellan, 2012) (Hartono, Muthukumar & Suthanthiran, 2010). Esta propuesta es bastante reciente y ha sido investigada en centros de Estados Unidos, Canadá, Europa y los Emiratos Árabes (De Serres et al., 2012) (Suthanthiran et al., 2013) (Hartono, Muthukumar & Suthanthiran, 2010) (Shilbayeh, Zmeili & Almardini, 2013).

En nuestro país, no existen estudios acerca de la cuantificación molecular de biomarcadores como herramienta de apoyo para el diagnóstico temprano del rechazo agudo post trasplante. Éste es un estudio pionero y necesario en la población de pacientes trasplantados que será de utilidad en la prevención de pérdida del injerto en pacientes que

presenten rechazo agudo. Como parte de este estudio, el trabajo de tesis propuesto plantea la implementación y optimización de ensayos de biología molecular para el análisis de expresión génica de un biomarcador urinario relacionado con rechazo agudo post trasplante renal, como parte de un panel extenso de biomarcadores que serán evaluados como predictores tempranos de rechazo agudo pos trasplante renal. El proyecto general es un estudio colaborativo entre la Universidad de las Fuerzas armadas – ESPE y el Hospital Carlos Andrade Marín en Quito. El proyecto constituirá también una línea base para iniciativas específicas de diagnóstico, no invasivas, más rápidas, confiables y con menores riesgos (Ting, Coates, Walker & Mclellan, 2012).

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, los criterios para el diagnóstico de rechazo renal agudo en pacientes post trasplante incluyen la biopsia renal, la cual es considerada como la prueba estándar de oro para detectar el rechazo del injerto en pacientes trasplantados (Ortega, Arias, Jampistol, Matesanz & Morales, 2007).

La biopsia es un método invasivo que consiste en obtener un corte histológico aplicando una punción en el injerto para su posterior análisis morfológico (Ortega, Arias, Jampistol, Matesanz & Morales, 2007). Se han desarrollado varios protocolos para la toma de muestras y estudio histopatológico. Sin embargo, factores como la experiencia del histopatólogo, dificultades en la automatización de procedimientos de preparación de muestras, problemas en el tiempo requerido para los reportes, entre otros, añaden subjetividad y relatividad a las técnicas histopatológicas. (Suthanthiran et al., 2013).

Se ha considerado la utilización de metodologías moleculares como apoyo en el diagnóstico temprano de rechazo agudo, por esta razón se han realizado investigaciones en

varios países para la búsqueda de marcadores asociados a la respuesta inmunológica en rechazo agudo renal. Se han evaluado biomarcadores tanto en células sanguíneas como en células del tracto urinario (Shilbayeh, Zmeili & Almardini, 2013) (Anglicheau et al., 2012) (Suthanthiran et al., 2013). Sin embargo, no se han establecido aún biomarcadores completamente específicos para rechazo agudo post trasplante renal. La presencia de factores fisiológicos, ambientales o étnicos podrían ser determinantes en la expresión de determinado biomarcador en individuos y en poblaciones de paciente (Martinez Córdova, Calzadilla Lugo & Artiles Valor, 2009).

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Optimizar ensayos de expresión génica por qPCR del biomarcador *CD3e mRNA* a partir de muestras de orina de pacientes post trasplante renal.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar el protocolo de extracción de RNA total y mensajero a partir de muestras de orina.
- Valorar la expresión del biomarcador *CD3e mRNA* en ensayos de qPCR a partir de RNA (RT-qPCR).

1.4. HIPÓTESIS

La técnica de PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR) permitirá estudiar la expresión del biomarcador urinario *CD3e mRNA* en pacientes post trasplante renal.

1.5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

En relación al proyecto general, una limitación importante es el reducido número de trasplantes anuales en el Hospital Carlos Andrade Marín (HCAM), lo que podría influenciar en el poder estadístico del panel de biomarcadores como predictor de rechazo agudo y requerir del estudio un mayor número de muestras y pacientes.

Otras limitaciones generales son el elevado costo que tienen los reactivos, la instrumentación en el área de biología molecular y el tiempo prolongado que se requiere para una adecuada optimización de los ensayos.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1. ANTECEDENTES

La mayoría de episodios de rechazo agudo tienen lugar entre la segunda a la cuarta semana post trasplante. Pocos casos se presentan hasta los seis meses post trasplante (Vázquez Martul & Veiga Barreiro, 2002). Para el diagnóstico de rechazo agudo se requiere un tiempo prolongado después de la intervención quirúrgica. Mientras el diagnóstico se establece, usualmente se proporciona tratamiento inmunosupresor para evitar el rechazo pero la mayoría de casos presentan ya un deterioro del órgano (Hartono, Muthukumar & Suthanthiran, 2010).

Debido a esto, Ting, Coates, Walker & Mclellan (2012) reunieron literatura de varios estudios con el fin de proponer algunos biomarcadores potenciales para el diagnóstico temprano de rechazo agudo en trasplante renal como por ejemplo *CXCL-10*, *HLA-1*, *18s rRNA*, entre otros. Su expresión es detectada mediante qPCR.

Por otra parte, Suthanthiran et al. (2013) probaron ocho marcadores incluyendo dos genes de referencia (*18s rRNA* y glucosa 6P). Sus resultados fueron significativos, concluyendo que la expresión de tres genes en conjunto, *18s rRNA*, *IP-10* y *CD3e*, tenían un 79% de sensibilidad y un 78% de especificidad, determinando que el uso de biomarcadores es factible en el diagnóstico temprano de rechazo agudo.

Además, en una investigación desarrollada en la Universidad de Harvard con ratones, se comprobó que la expresión de la molécula de daño del riñón (*KIM-1*) promueve el desarrollo de un cuadro de fibrosis renal, por lo cual se la asocia al rechazo agudo y

crónico de un injerto, ocasionando la pérdida de funcionalidad del mismo (Humphreys et al., 2013).

Con el estudio de varios marcadores específicos para la detección temprana de rechazo agudo se ha logrado abrir una nueva posibilidad de tratamiento para evitar la pérdida del órgano y por tanto el deceso del paciente. Desarrollar estudios a nivel local nos podría proporcionar la opción de implementar éste tipo de pruebas en beneficio de los pacientes cuya única opción es el trasplante renal.

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1. CAUSAS DE FALLO RENAL

2.2.1.1. Rechazo al aloinjerto

El reconocimiento de los aloantígenos puede ser directo o indirecto. Es directo cuando los linfocitos T se unen directamente al MHC intacto de una célula del aloinjerto. Es indirecto cuando se unen al MHC del aloantígeno que ha sido procesado por una célula presentadora de antígeno (APC) del receptor o al presentar fragmentos del MHC del donador unido al MHC del receptor (Abbas, Lichtman & Pober, 2000).

El rechazo puede darse en forma celular (linfocitos aloreactivos) o humoral (anticuerpos aloreactivos). Los tipos de rechazo que se han descrito son el rechazo hiperagudo, agudo y crónico (Beneyto Castelló & García Martínez, 2006).

2.2.1.2. Rechazo hiperagudo

Esta reacción tiene lugar inmediatamente posterior al trasplante, después de minutos u horas. El paciente sufre de hemorragia, entre otras complicaciones que conllevan

finalmente a la pérdida del injerto (Beneyto Castelló & García Martínez, 2006). Es causada por anticuerpos preexistentes contra el donante que se encuentran circulando en el receptor y reaccionan contra los antígenos de las células del endotelio del injerto (Abbas, Lichtman & Pober, 2000).

2.2.1.3. Rechazo agudo

Es una reacción de daño vascular y al parénquima, tiene una frecuencia del 20% y se presenta de 3-7 días después de la intervención quirúrgica e incluso puede extenderse hasta los 6 meses (Vélez, Rojas, Borrero & Restrepo, 2003).

Es principalmente una respuesta celular pero también hay desempeño humoral en menor medida. Actúan principalmente los linfocitos T que causan una lisis directa al aloinjerto por la producción de moléculas citotóxicas (Abbas, Lichtman & Pober, 2000).

Se han reportado, histológicamente, dos tipos de rechazo agudo; el túbulo intersticial y el vascular también conocido como rechazo acelerado. El rechazo túbulo-intersticial afecta al túbulo contorneado proximal debido a que se presenta un edema perivascular ocasionando vasculitis, este tipo de rechazo es reversible. Por otro lado, el rechazo vascular es irreversible ya que daña la pared de las arteriolas debido a que se deposita un mucopolisacárido ácido ocasionando trombos y necrosis en la pared (Vélez, Rojas, Borrero & Restrepo, 2003).

Existe un tipo de rechazo agudo en el que no se observan cambios en la función renal pero los hallazgos histológicos muestran la existencia del mismo, el rechazo agudo silente usualmente se presenta al tercer mes post trasplante (Parrilla, Ramírez & Ríos, 2008).

2.2.1.4. Rechazo crónico

Es una reacción a largo plazo que conduce a la pérdida de las funciones del órgano trasplantado. Se da generalmente una arteriosclerosis en el injerto, las lesiones aparecen sin causa aparente. Inicialmente se tienen episodios de rechazo agudo para finalmente ocasionar fibrosis con posterior necrosis celular y pérdida del injerto (Abbas, Lichtman & Pober, 2000).

2.2.2. INMUNOLOGÍA DEL TRANSPLANTE

2.2.2.1. Respuesta celular y humoral

Nuestro organismo posee dos tipos de defensa frente a los microorganismos extraños, la inmunidad innata que es una respuesta inmediata frente al organismo patógeno y la inmunidad adaptativa que es una respuesta un poco más lenta pero con mayor especificidad frente al antígeno. Las células dendríticas que son parte de la inmunidad innata, son productoras de citosinas y al madurar son capaces de activar a los linfocitos T al presentarles sus antígenos, organizando la respuesta posterior de la inmunidad adaptativa de ésta manera; los linfocitos T activados pueden migrar al lugar de inflamación y a su vez estimulan a los linfocitos B para la producción de anticuerpos (Goldman & Schafer, 2013).

La respuesta celular se lleva a cabo cuando hay una migración de células hacia el lugar de lesión, las células adyacentes al lugar afectado liberan una especie de mensajeros químicos como las quimiocinas, éstas moléculas mandan una señal a la membrana celular de los vasos sanguíneos que provoca que se modifique su permeabilidad, permitiendo el paso de las células de defensa al lugar de la lesión para provocar una respuesta inmunológica. Se liberan una serie de factores de crecimiento que contribuyen a la proliferación celular para amplificar la respuesta, uno de ellos el VEGF que es el factor de crecimiento endotelial

vascular que promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos para promover la movilización de los grupos celulares a la zona de lesión tisular (Goldman & Schafer, 2013).

La respuesta humoral está dirigida por los anticuerpos circulantes secretados por células plasmáticas, linfocitos B diferenciados, que interactúan directamente con antígenos del donante o indirectamente son producidos después de que los linfocitos T activan a los linfocitos B para la producción de anticuerpos contra el antígeno (Ortega, Arias, Jampistol, Matesanz, & Morales, 2007).

2.2.2.2. Antígenos histocompatibles

Uno de los principales sistemas de histocompatibilidad en casos de trasplante, es el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), conocido como HLA (antígenos leucocitarios humanos) en células humanas. El complejo HLA presenta un alto porcentaje de polimorfismos, es decir, existe gran variabilidad de un individuo a otro. Este alto porcentaje de polimorfismo se encuentra asociado al proceso de doble selección que pasan los linfocitos T en el timo para especializarse (Goldman & Schafer, 2013).

Además, cada persona presenta seis tipos de HLA y cada uno de ellos presenta alelos diferentes. El HLA se presenta en la membrana celular y tiene una función especial de presentación de antígenos directamente hacia los linfocitos T (Ortega, Arias, Jampistol, Matesanz, & Morales, 2007).

Debido a estos motivos, encontrar donadores compatibles que no posean parentesco con los pacientes que requieran un trasplante es sumamente difícil, es por eso que el complejo

HLA es el principal examen de compatibilidad realizado para evitar el rechazo al aloinjerto (Goldman & Schafer, 2013).

Sin embargo, existen otros antígenos que también pueden provocar graves cuadros de rechazo si no son detectados previos al procedimiento de trasplante, el sistema ABO ampliamente estudiado es un grupo de antígenos de superficie presentes en los glóbulos rojos cuya incompatibilidad podría provocar un rechazo hiperagudo post trasplante. Los antígenos de superficie de los de los vasos endoteliales del injerto son reconocidos por anticuerpos activando de la cascada de coagulación y complemento, provocando isquemia, trombosis y destrucción del aloinjerto en las primeras 24 horas o inmediatamente después del trasplante (Ortega, Arias, Jampistol, Matesanz, & Morales, 2007) (Goldman & Schafer, 2013).

2.2.3. DIAGNÓSTICO DEL RECHAZO AGUDO

El estándar de oro declarado por la OMS para diagnosticar el rechazo agudo y verificar la supervivencia del injerto es la biopsia renal, ésta suele acompañarse con ecografía que controla el proceso. La biopsia renal es un proceso en el cual se obtiene una muestra de tejido mediante punción, la muestra es evaluada histológicamente en busca de rechazo humoral rechazo celular o túbulo intersticial que se puede verificar con pruebas inmunohistoquímicas e inmunohistofluorescentes o mediante la formación de depósitos focales de c4d en capilares peritubulares (Mosquera Reboredo & Vázquez Martul, 2011).

Las posibles complicaciones que conlleva esta metodología son, entre otras, pérdida excesiva de sangre, presencia de fístulas, pérdida del aloinjerto e incluso la muerte del paciente (De Serres et al., 2012).

2.2.4. TRATAMIENTO DEL RECHAZO AGUDO

2.2.4.1. Terapia de inmunosupresión

Después que el paciente ha sido aceptado para ser operado, según su situación, se le administran una serie de inmunosupresores pre o post trasplante para evitar reacciones inmunológicas hacia el aloinjerto, es decir, evitar el rechazo hacia el órgano trasplantado (Shilbayeh, Zmeili & Almardini, 2013).

El protocolo usual para la inmunosupresión según Shilbayeh, Zmeili & Almardini (2013) consiste en la administración de tacrolimus en combinación con micofenolato mofetil (MMF) o azatioprina con corticoesteroides. La ciclosporina ha sido recientemente indicada para evitar el consumo de esteroides (García de Jalón Martínez et al., 2003).

La ciclosporina es un tipo de droga que inhibe la activación de NFAT (factor nuclear de las células T activadas) y la transcripción del gen de IL-2, el MMF es una toxina metabólica que mata las células T proliferadoras y los corticoides son agentes antiinflamatorios que bloquean la secreción de citoquinas (Abbas, Lichtman & Pober, 2000).

2.2.5. INVESTIGACIÓN MOLECULAR Y EXPRESIÓN GÉNICA

Con el avance científico se ha podido incursionar en la investigación molecular cuyo auge empieza a partir del desarrollo de la PCR (polymerase chain reaction, en inglés) creada por Kary Mullis en 1984. Con la ayuda de la investigación molecular se ha podido dar un giro en el diagnóstico clínico de varias enfermedades. Uno de los grandes ejemplos es el proyecto del genoma humano que fue logrado con la ayuda de varios países y muchos científicos alrededor del mundo (Sunnucks, 2000).

2.2.5.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR convencional, creada por Kary Mullis (1984), es un método *in vitro* que usando dos cebadores delimita y amplifica una secuencia específica de DNA a través de varios ciclos.

Los resultados son cualitativos y sólo puede ser observado el producto final en un gel de agarosa por el proceso de electroforesis. La técnica de PCR consta de una denaturación inicial, seguida de una secuencia de ciclos y termina con una extensión final. Cada ciclo de amplificación se da en tres fases: denaturación, alineamiento y extensión. En la denaturación la temperatura de incubación se eleva entre 90-96 °C para separar las hebras, cada hebra servirá como molde para la creación de las siguientes cadenas complementarias. El alineamiento (40-60°C) es la fase en donde los cebadores se unen a cada una de las hebras separadas en el paso previo, a partir de ésta unión, la DNA polimerasa sintetiza una hebra complementaria a la inicial, ésta fase se denomina extensión (70-72°C) (Corvalán, 2002).

2.2.5.1.1. Transcripción inversa (RT-PCR)

Es un proceso catalizado por una enzima llamada transcriptasa inversa, en donde, una molécula de RNA es usada como molde para formar una molécula de DNA complementaria al molde, éste proceso se llama transcripción inversa o retrotranscripción.

Toma el nombre de retrotranscripción debido a que ciertos virus usan éste recurso como método de supervivencia ya que no poseen DNA sino RNA para la transmisión genética a su progenie, estos virus se llaman retrovirus y la enzima encargada de éste proceso es la retrotranscriptasa (Roca, Oliver, & Rodriguez, 2003).

2.2.5.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

La PCR de tiempo real, a diferencia de la convencional, detecta la presencia de ácidos nucleicos, lo amplifica y determina cuantitativamente lo amplificado en el momento que se da la reacción. La qPCR funciona solamente a partir de DNA, en el caso de tener RNA como punto de partida se realiza previamente una retro transcripción o transcripción inversa para obtener una cadena de DNA complementaria (cDNA) al RNA inicial, de éste modo se puede detectar la expresión génica a partir de DNA y RNA (Pierce , 2009).

La reacción de la PCR en tiempo real se da en 4 fases: la inicial linear donde la fluorescencia expresa la línea de base, la fase exponencial temprana donde la fluorescencia llega a la línea del umbral, la fase logarítmica cuando la fluorescencia cruza el umbral, en ésta fase los datos son recolectados y la fase *plateau* donde los productos de la PCR escasean (Wong & Medrano, Real-Time PCR for mRNA quantitation, 2005).

Existen diferentes tipos de kits empleados en qPCR, entre ellos tenemos a TaqMan® y SYBR® Green empleados en sistemas de un solo paso. SYBR® Green utiliza como fluoróforo SYBR® Green I que se une al DNA de cadena doble para emitir fluorescencia, cuando se da la denaturación la fluorescencia desciende ya que el fluorocromo se libera, al formarse el producto de PCR el fluorocromo se une al amplicon de doble cadena generando una fluorescencia que es detectada por el equipo. TaqMan a diferencia de SYBR Green, utiliza una sonda marcada fluorogénicamente; en el extremo 5' y 3' está marcada por un fluoróforo diferente denominados reportero y quencher respectivamente. Al unirse la sonda marcada a la hebra molde, el reportero se libera emitiendo fluorescencia. La acumulación de fluorescencia es lo que permite la visualización de cada fase en el momento en que ocurre, estos datos se recopilan en un sistema computarizado (Applied, 2010).

2.2.5.2. Marcadores biológicos

Actualmente se realizan varias investigaciones que han podido determinar un sinnúmero de marcadores genéticos y biológicos en cantidades apropiadas que se expresan en ciertas poblaciones o enfermedades específicas (Sunnucks, 2000).

Los marcadores biológicos son biomoléculas que aparecen, cambian o se alteran en procesos específicos y pueden ser proteínas, citoquinas, DNA, DNA mitocondrial y RNA mensajero, ribosomal o de transferencia. Dichos marcadores pueden ser detectables mediante diversas metodologías como la PCR en tiempo real además de variar de población a población (Sunnucks, 2000).

2.2.5.2.1. Marcadores biológicos en el rechazo agudo

En el rechazo agudo post trasplante renal se producen una serie de alteraciones en el sistema inmunológico del paciente que lo lleva a la producción de varias moléculas que son candidatas perfectas para su uso como marcadores biológicos para el apoyo diagnóstico de rechazo. Varios estudios recientes han estudiado una gran variedad de biomarcadores como predictores tempranos de rechazo agudo. Los de mayor mención son *FOXP3*, *KIM-1*, *IP-10 mRNA*, *NGAL*, *CD3e mRNA* y *18S rRNA* (Ting, Coates, Walker & Mclellan, 2012) (Suthanthiran et al., 2013) (Muthukumar et al., 2005) el biomarcador que se implementará en el presente trabajo de tesis es *CD3e mRNA*.

2.2.5.2.1.1. Biomarcador *CD3e mRNA*

Las células T poseen un receptor de antígenos de membrana (TCR) que consiste en una glicoproteína heterodímera unida no covalentemente a cinco polipéptidos invariables que

son *CD3 gamma, delta, épsilon, zeta y beta*. El complejo TCR/CD3 se encuentra en el citoplasma celular y para su expresión en membrana se requiere una expresión coordinada de las seis proteínas (Hall, et al., 1991).

La molécula CD3 de cadena épsilon es una glicoproteína que se encuentra en la membrana de las células T. Forma parte de un complejo llamado TCR que cumple funciones de reconocimiento antigénico y por lo tanto interviene en la respuesta celular del sistema inmune (Sommers et al., 2000).

2.2.5.2.1.2. Biomarcador 18S rRNA

Los ribosomas son estructuras encargadas de ensamblar proteínas de acuerdo a la información genética. La unidad ribosomal 80S está conformada por dos subunidades, la mayor 60S y la menor 40S. La subunidad menor tiene alrededor de 33 proteínas y una molécula de RNA 18S. Solo está presente en células eucariotas (Jiménez & Merchant, 2003).

Su expresión normal en células mononucleares de sangre periférica es 9.21×10^9 copias de *18S rRNA* por microgramo de RNA (Suthanthiran et al., 2013). La secuencia de este gen es utilizada como gen de referencia en múltiples estudios.

2.3. MARCO CONCEPTUAL

- Aloantígenos: Antígenos procedentes de individuos diferentes genéticamente pero de la misma especie (Staff, 2005).
- Aloreactivo: Que reacciona ante individuos diferentes genéticamente pero de la misma especie (Staff, 2005).

- Aneurisma: Dilatación de una pequeña porción de un vaso sanguíneo que al romperse puede ocasionar hemorragia (Staff, 2005).
- RNA mensajero: Tipo de ácido ribonucleico monocatenario sintetizado a partir de una cadena de DNA que servirá como molde en la traducción para la síntesis de proteínas que se lleva a cabo en el citoplasma (Lewis, 1996).
- Biomarcadores: Alteración bioquímica o fisiológica, cuya magnitud puede ser medible en el organismo estudiado (FAO/OMS, 2004).
- Citoquinas citolíticas: Sustancia que causa ruptura en la célula blanco (Bennington, 2000).
- Complejo mayor de histocompatibilidad: Grupo de antígenos que se localizan en la membrana celular, difieren según la etnia debido a la variación en los haplotipos, dependiendo del tipo, interactúan con linfocitos CD4+, CD8+ o forman parte del sistema de complemento. En los trasplantes, su compatibilidad es fundamental caso contrario se desencadena una reacción inmunológica en contra del injerto (Paris & Garcia, 1989).
- DNA mitocondrial: Presente en las mitocondrias que son organelas de las células humanas. El DNA mitocondrial es la información genética que se encuentra dentro de las mitocondrias (Müller, 2008).
- Fibrosis: Aumento de tejido conjuntivo fibroso que se forma producto de un traumatismo (Kent, 2003).
- Homeostasis: Equilibrio del metabolismo que se mantiene gracias a sistemas de control (Dorland, 2005).
- Injerto: Se llama injerto a un tejido u órgano que se ha extirpado para colocarlo en un ente diferente (Dorland, 2005).

- Inmunosupresión: Disminución de la respuesta inmunológica de un individuo mediante la administración de fármacos (Dorland, 2005).
- Necrosis celular: Muerte de las células que componen un tejido (Kent, 2003).
- Plasmocitos: Linfocito B activado que secreta anticuerpos (Delves, Martin, Burton, & Roitt, 2006).
- Primers: Secuencias de DNA entre 19 y 25 nucleótidos usados en la PCR para hibridar a DNA (Freifelder, 2003).
- Expansión clonal: Activación y proliferación de linfocitos B después de la unión de los anticuerpos de linfocitos B con su epítotope (Tortora, Funke & Case, 2007).
- Toxina: Sustancia venenosa producida por un ser vivo o elaborada farmacológicamente (Hernández, 2003).
- Trombosis: Agregación plaquetaria adherida a la pared de los vasos sanguíneas causando émbolos y provocando bajo flujo sanguíneo (Guillermo, 2009).
- PCR: Proceso mediante el cual se amplifica exponencialmente cantidades mínimas de material genético (Zabala Castro, 2005).
- RT-PCR: Tipo de PCR que usa la retrotranscripción como paso previo a la PCR convencional ya que se parte de RNA (Freifelder, 2003).
- RT-qPCR: Tipo de PCR en la cual se usa la retrotranscripción como paso previo a la PCR y los resultados son detectados en el momento de la reacción (Freifelder, 2003).

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. METODOLOGÍA

3.1.1. TIPO DE ESTUDIO

El presente estudio es de tipo exploratorio descriptivo ya que pretende determinar las condiciones para asegurar la eficiencia óptima de un ensayo cuantitativo de expresión génica.

3.1.2. TIPO DE MUESTREO

No se realizará muestreo. El ensayo será optimizado mediante las repeticiones de la cuantificación de una muestra con diagnóstico de rechazo agudo y sin él. Posteriormente, el marcador (en el proyecto general), será probado en campo en un número limitado de muestras de pacientes positivos para rechazo agudo y pacientes control.

3.1.3. CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad se lo lleva a cabo durante todo el procedimiento del estudio. Como control de calidad en la cuantificación relativa de RNA se toma la expresión del biomarcador *18S rRNA* que es un gen de referencia cuya expresión es conocida en humanos. Además, por cada ensayo se tiene un control negativo para evitar contaminaciones externas de cualquier tipo.

3.1.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las características de sensibilidad y especificidad analíticas, repetitividad y variabilidad analítica intra ensayo fueron definidas en base a recomendaciones generalmente aceptadas para análisis de datos para qPCR. Adicionalmente, se realizaron análisis de eficiencia de amplificación y cuantificación relativa de la expresión génica mediante el modelo de Pfaffl (Pfaffl , 2004), el cual toma en cuenta los valores de eficiencia para calcular el radio de expresión (Wong & Medrano, 2005). Se utilizaron las pruebas no paramétricas de U de Mann-Whitney y Friedman, para comprobar si las diferencias observadas entre la expresión génica de los ensayos eran estadísticamente significativas, mediante el paquete estadístico SPSS v.22.

3.2. MATERIALES Y PROCESAMIENTO

3.2.1. MATERIALES Y EQUIPOS

A continuación se detallan los diferentes materiales y equipos que se utilizaron para la realización de este estudio.

Materiales:

- Tubos de 0.6, 1.5 y 2 ml
- Tubos para PCR
- Puntas de 0.5-10, 10-100, 20-200 y 100-1000 μ l
- Gradillas de almacenamiento y transporte
- Gradillas congeladas
- Guantes de nitrilo
- Frascos para muestra de orina
- Tubos Falcon 50ml

- Guardianes

Equipos:

- Centrífuga refrigerada
- Micro centrífuga
- Vórtex
- Incubadora
- Cabinas de flujo laminar
- Micropipetas calibradas
- Cámaras de electroforesis
- Transiluminador UV
- Ultracongelador
- Termociclador de gradiente
- Applied Biosystems StepOne™ Real-time PCR
- MagPurix
- LightCycler® Nano Instrument - ROCHE

3.2.2. REACTIVOS

En el estudio se utilizaron diferentes reactivos, kits, cebadores y sondas, a continuación se los detalla.

Reactivos:

- 2-mercaptoethanol
- Etanol 70%
- Etanol 100%
- Agua grado biología molecular

- Agua DEPC
- Agua destilada
- Suero fisiológico
- Fenol/ cloroformo 1:1
- Acetato de sodio 3M
- Turbo DNAsa Invitrogen
- Buffer turbo DNAsa Invitrogen 10X
- Agarosa grado molecular
- SYBR[®] Safe

Kits:

- PureLink[®] RNA Mini Kit
- TURBO DNA-free Kit
- SuperScript III One-Step RT-PCR
- Power SYBR[®] Green RNA-to-Ct[™] 1-Step Kit
- TaqMan[®] RNA-to-Ct[™] 1-Step Kit

Cebadores y sondas

- *CD3e mRNA*: para la secuencia cebadora y su respectiva sonda ver tabla 1.
- *18S rRNA*: para la secuencia cebadora y su respectiva sonda ver tabla 1.

3.2.3. PROCESAMIENTO

Para la realización de este estudio se efectuaron diferentes procesos, como son:

- Extracción y purificación de ácido ribonucleico:** para la obtención de RNA total se utilizaron dos tipos de fluidos corporales como muestras (sangre y orina). Se conoce

que los biomarcadores objetivo se expresan en muestras sanguíneas de humanos, motivo por el que se utilizó muestras de sangre para la optimización de los ensayos, debido a la poca cantidad de RNA total que se puede obtener a partir de pellet urinario.

b) Técnicas moleculares: se utilizaron dos técnicas para la amplificación de los biomarcadores *CD3e mRNA* y *18S rRNA* (i) Transcripción inversa o retrotranscripción (RT-PCR), y (ii) Transcripción inversa en tiempo real (RT-qPCR). Al comprobar la funcionalidad de los ensayos, se procedió a aplicarlos en muestras de orina de pacientes trasplantados y normales.

c) Electroforesis y fotodocumentación: para la visualización de los productos obtenidos de la purificación y de la RT-PCR, se realizaron corridas electroforéticas en geles de agarosa al 0.8% y al 2% respectivamente.

3.2.4. FASES

3.2.4.1. Diseños de cebadores y sondas.

Las secuencias de las sondas y los cebadores de los biomarcadores tanto *18S rRNA* como *CD3e mRNA* fueron obtenidos del artículo “*Urinary-cell mRNA profile and acute cellular rejection in kidney allografts*” (Suthanthiran et al., 2013) (Anexo 1).

3.2.4.2. Obtención de Muestras

3.2.4.2.1. Extracción de RNA desde sangre total

El material genético se extrajo a partir de 5 ml de sangre total, es decir, la sangre fue mezclada con EDTA que es un anticoagulante para evitar la coagulación de la misma. La

muestra fue tomada mediante los métodos de venopunción universales en un tubo de tapa lila que contiene EDTA.

Los protocolos de extracción y purificación de la muestra empleados en éste trabajo se detallan en el anexo 2. El material obtenido se cuantificó y se procedió a estandarizar la RT-PCR convencional y la RT-qPCR.

3.2.4.2.2. Extracción de RNA desde orina

Para la toma de muestra de orina se siguieron los siguientes pasos:

- Recolectar la primera orina de la mañana descartando el primer chorro, en un frasco estéril para recolección de orina.
- Mantener la muestra a una temperatura de 4°C hasta su procesamiento.

Para la obtención del pellet urinario se realizaron los siguientes pasos:

- Centrifugar a 2500-3000 RPM por 30 minutos
- Eliminar el sobrenadante
- Resuspender el pellet
- Realizar extracción de RNA

Obtenido el pellet urinario se procedió con los pasos detallados a continuación:

- Transferir la muestra de orina a tubos estériles para centrífuga de 15 ml.
- Centrifugar los tubos a 3500 RPM a 4°C por 10 minutos, no utilizar los frenos.
- Desechar el sobrenadante sin perturbar el sedimento.
- Añadir 1.5 ml de tampón fosfato salino (PBS 1X) frío al sedimento. Resuspender el pellet mediante pipeteo. El PBS debe ser libre de cloruro de magnesio y calcio.
- Transferir la suspensión a un solo tubo cónico de 15 ml.

- Centrifugar a 3500 RPM durante 10 minutos a temperatura ambiente sin utilizar los frenos.
- Desechar el sobrenadante sin perturbar el sedimento y resuspenderlo en 1 ml de PBS mediante pipeteo.
- Transferir el pellet resuspendido a un tubo de 1.5 ml para microcentrífuga.
- Centrifugar a 2000 RPM por 10 minutos a temperatura ambiente sin utilizar los frenos.
- Descartar el sobrenadante.
- Conservar a -80°C.

El material nucleico fue extraído a partir del pellet obtenido de la muestra de orina mediante dos métodos: uno manual con la aplicación del kit comercial PureLink[®] RNA Mini Kit (Ambion, PureLink[®] RNA Mini Kit, 2012), que fue modificado en el proceso como se describe en el anexo 3; y uno automatizado en el robot de perlas magnéticas MagPurix (CORP., 2014).

3.2.4.2.3. Cuantificación de RNA total

Para conocer la cantidad de RNA total obtenido a partir de todas las muestras, se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Este permite la cuantificación de ácidos nucleicos a una longitud de onda de 260 nm.

Para un correcto procedimiento se debe encerar el equipo con 2 µl del mismo buffer en el cual se resuspendió el material a cuantificar. Una vez encerado se limpió con papel para lentes (ligero y sin pelusas), se colocó 2 µl de la muestra a cuantificar. Se realizó la medición y se vuelve a limpiar. Para cada muestra se realiza el mismo procedimiento.

3.2.4.2.4. Purificación con DNAsas

Una vez obtenido el RNA tanto de orina como de sangre, se procede a la purificación del mismo con DNAsas (ver anexos 4 y 5). Se validó el ensayo con dos métodos de purificación: TURBO DNAsa de Ambion® con la aplicación del protocolo fenol/cloroformo (1:1) como se especifica en el anexo 4 y el kit TURBO DNA-free (ver anexo 5).

Primero se aplicó la purificación mediante TURBO DNA-free kit y luego la purificación con TURBO DNAsa (Ambion®) con la aplicación del protocolo modificado fenol/cloroformo (1:1).

3.2.4.3. Ensamblaje de la RT-PCR convencional

Para la PCR de retrotranscripción se usó el kit comercial SuperScript III One-Step RT-PCR siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial (ver anexo 6).

Para la elección de la Temperatura de melting (T_m) se realizó un ensayo de gradiente de temperaturas tomando como base la temperatura teórica de los primers tanto de *CD3e mRNA* como de *18S rRNA*, obtenida mediante la siguiente fórmula:

$$T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$$

A partir de la cual se realizó para *CD3e mRNA* un rango de cinco temperaturas (61- 69), y tres para *18S rRNA* (61-65).

Con la temperatura adecuada para cada biomarcador, se efectuó un ensayo de sensibilidad analítica para determinar la concentración mínima de RNA necesario para que el sistema sea detectable. Finalmente, se corrieron ensayos con dos controles negativos para verificar la ausencia de contaminación tanto de DNA como de otros factores.

3.2.4.4. Visualización y fotodocumentación de productos obtenidos de la RT-PCR

Para la visualización de los productos de PCR obtenidos en la fase anterior se utilizó un gel de agarosa al 1.5%, donde se corrió la muestra junto a un marcador molecular de 100bp de la casa comercial Invitrogen por 1 hora a 100 voltios. El volumen cargado para la electroforesis fue de 10 μ l tanto para la muestra problema como para el marcador molecular. Se visualizaron los fragmentos con la ayuda de un transiluminador UV (UVP BioDoc-ItTM System), donde se comprobó que las bandas obtenidas pertenecían al fragmento esperado midiendo su tamaño con la ayuda del marcador molecular. El tamaño del fragmento se lo obtuvo con la ayuda del software Primer Blast de NCBI.

3.2.4.5. Ensamblaje de la RT-qPCR

Para la optimización de la PCR en tiempo real se usó el kit comercial TaqMan[®] RNA-to-CtTM 1-Step Kit con el equipo de Applied Biosystems StepOneTM Real-time PCR (ver anexo 7). Se hicieron pruebas preliminares de temperatura con el kit comercial Power SYBR[®] Green RNA-to-CtTM 1-Step Kit para comprobar el funcionamiento del sistema y el tamaño del fragmento.

Posteriormente, se puso a prueba el sistema final con TaqMan[®] RNA-to-CtTM 1-Step Kit realizándose una prueba de campo con muestras de pacientes trasplantados y pacientes normales.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS

4.1. EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN

4.1.1. Muestras de sangre

Con los dos protocolos utilizados para la extracción y purificación de RNA total, a partir de muestras de sangre (Anexo 2), se obtuvo material con purezas viables para poder ser utilizados posteriormente en técnicas moleculares (RT-PCR y RT-qPCR) (Tabla 1).

Tabla 1. Cuantificación de RNA total obtenido desde muestra de sangre, después de la purificación en el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

PURIFICACIÓN	CONCENTRACIÓN	PUREZA*	
	ng/ μ l	260/280	260/230
TURBO DNAsa Fenol/Cloroformo (1:1)	33.9	1.78	1.91
Kit TURBO DNA-free	77.9	2.04	0.82

* Razón 260/280 valores cercanos 1.8 indican alta pureza. Razón 260/230 valores cercanos a 2 indican alta pureza.

Dentro de las diferencias encontradas entre ambos métodos podemos mencionar la pérdida de concentración al utilizar TURBO DNAsa Fenol/Cloroformo (1:1), mientras que con el kit TURBO DNA-free la concentración se mantiene casi igual (Figura 1). Sin embargo al utilizar el primero podemos ver que los ratios-razón de pureza (260/280 y 260/230) son mayores en este (Tabla 1). Por otro lado, al evaluar el tiempo necesario para el proceso de extracción se observó una diferencia de dos horas, siendo tres horas para el TURBO

DNAsa Fenol/Cloroformo (1:1), mientras que para el kit Turbo DNA-free (Ambion®) se requiere una hora.

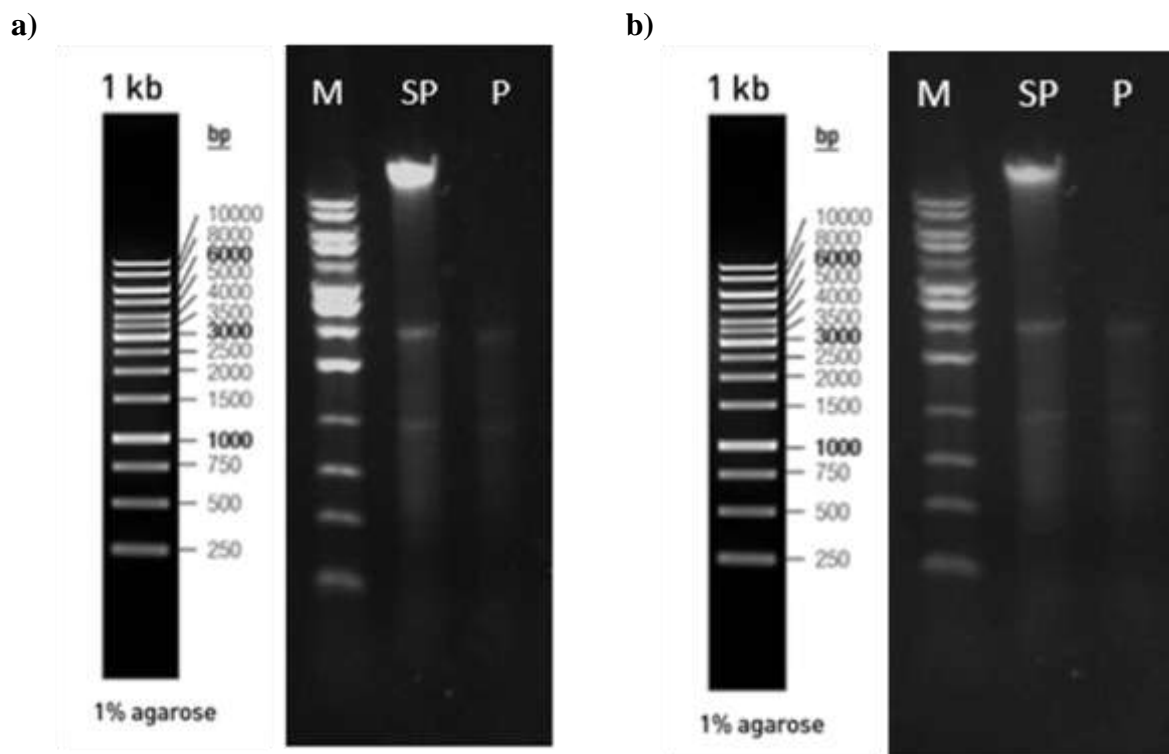


Figura 1. Visualización de RNA total en cámara de UV en gel de agarosa 0.8%. **a)** Extracción con TURBO DNAsa con Fenol/Cloroformo (1:1) y **b)** Extracción con TURBO DNA-free kit. (**M:** Marcador, **SP:** RNA sin purificar, **P:** RNA purificado).

4.1.2. Muestras de orina

Para la extracción de RNA total a partir de muestras de orina, de pacientes con trasplante renal, se utilizó el método automatizado con el robot de perlas magnéticas MagPurix, luego se procedió con la purificación.

No se realizó corrida electroforética, ya que la concentración obtenida de RNA es muy pequeña para ser visualizada en geles de agarosa. Se cuantificó mediante espectrofotometría (NanoDrop 1000 - Thermo Scientific) antes y después de la purificación de las muestras de pacientes con trasplante renal.

Las concentraciones obtenidas antes de la purificación varían entre 0.4 y 29 ng/μl, mientras que los valores de la razón de pureza no alcanzaron los valores mínimos requeridos. Como se pudo observar en las curvas (Figura 2), se tiene una contaminación bastante notoria a 230. Esta contaminación impide la correcta cuantificación a 260 que corresponde a ARN. Por lo tanto, los valores de cuantificación no son reales (Tabla 2).

Tabla 2. Cuantificación de RNA total de muestras de pacientes de trasplante renal antes de purificar.

PACIENTE	POR ENSAYO			PROMEDIOS POR PACIENTE		
	Concentración	PUREZA*		Concentración	PUREZA*	
	ng/μl	260/280	260/230	ng/μl	260/280	260/230
1	7.2	1.04	0.02			
1	7	1	0.02	7.27	1.02	0.02
1	7.6	1.03	0.02			
2	29	1.5	0.06			
2	28.3	1.55	0.07	27.07	1.54	0.07
2	23.9	1.57	0.07			
3	8.9	1.13	0.03			
3	8.2	1.09	0.02	8.53	1.10	0.03
3	8.5	1.07	0.03			
4	14.9	1.33	0.04			
4	15.5	1.34	0.04	15.20	1.34	0.04
4	15.2	1.35	0.04			
5	1.4	0.49	0.01			
5	1.8	0.56	0	1.20	0.42	0.01
5	0.4	0.22	0.01			

* Razón 260/280 valores cercanos 1.8 indican alta pureza. Razón 260/230 valores cercanos a 2 indican alta pureza.

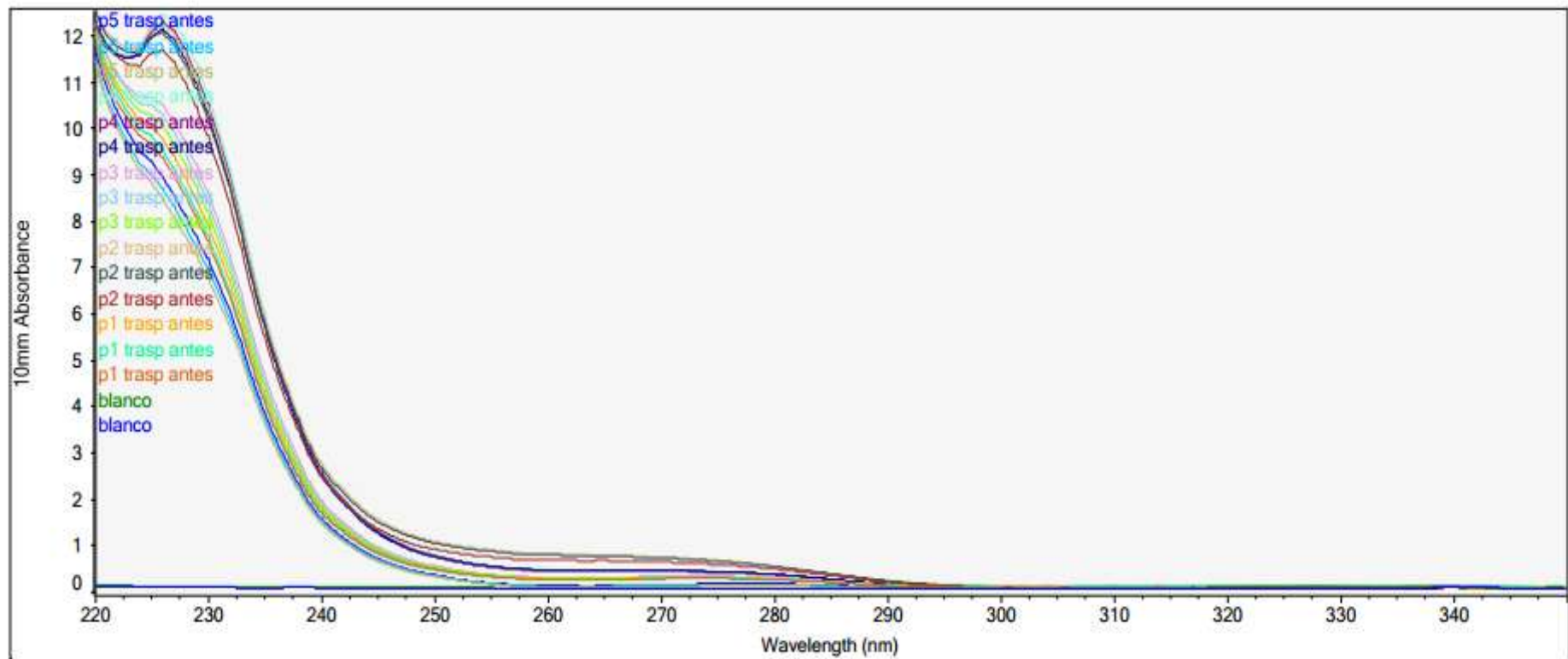


Figura 2. Curvas de cuantificación de las muestras de pacientes con trasplante renal antes de la purificación.

Al emplear los protocolos de purificación en este tipo de muestras, se pudo observar que ninguno de los métodos eliminaban el DNA contaminante por completo, ni se obtenía una pureza viable. Por este motivo se aplicaron ambos métodos de purificación, uno seguido del otro, obteniendo así purezas fiables para ser usadas en la RT-qPCR.

Después de aplicar el método de purificación especificado anteriormente, se observó tanto en las curvas (Figura 3), como los valores de la razón de pureza mejoran, desaparece la contaminación en 230 y se puede ver los valores reales de concentración de las muestras (Tabla 3).

Tabla 3. Cuantificación de RNA total de muestras de pacientes de trasplante renal después de purificar.

PACIENTE	POR ENSAYO			PROMEDIO POR PACIENTE		
	Concentración	PUREZA*		Concentración	PUREZA*	
	ng/ul	260/280	260/230	ng/ul	260/280	260/230
1	12.9	1.53	1.41			
1	13.4	1.47	1.3	13.27	1.49	1.31
1	13.5	1.48	1.22			
2	16	1.53	1.53			
2	16.2	1.49	1.51	16.13	1.52	1.49
2	16.2	1.53	1.44			
3	10.3	1.13	3.24			
3	10.5	1.46	3.18	10.37	1.35	3.12
3	10.3	1.46	2.95			
4	8.3	1.39	1.95			
4	8.4	1.49	1.96	8.37	1.47	1.89
4	8.4	1.52	1.77			
5	8.2	1.49	2.74			
5	8.6	1.41	2.36	8.47	1.46	2.52
5	8.6	1.49	2.45			

* Razón 260/280 valores cercanos 1.8 indican alta pureza. Razón 260/230 valores cercanos a 2 indican alta pureza.

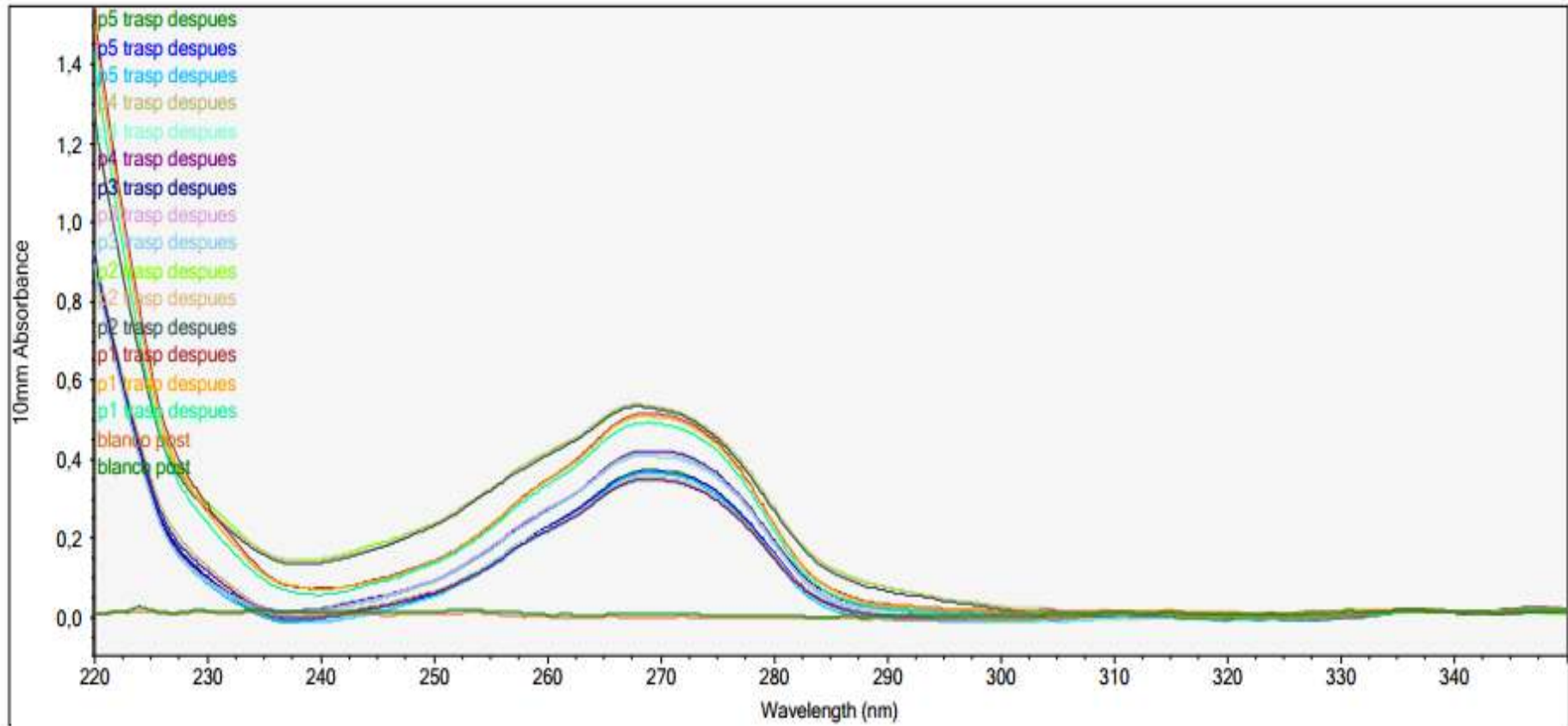


Figura 3. Curvas de cuantificación de las muestras de pacientes con trasplante renal después de la purificación.

Como se mencionó anteriormente, a las muestras control sólo se les realizó la cuantificación después de ser purificadas. Se puede observar en los valores de la razón de pureza y en las curvas de cuantificación que no existe contaminación a 230 y las purezas son adecuadas para emplearlas en la RT-qPCR (Tabla 4 y Figura 4).

Tabla 4. Cuantificación de RNA total de muestras de pacientes control después de purificar.

MUESTRA	POR ENSAYO			PROMEDIO POR PACIENTE		
	Concentración	PUREZA		Concentración	PUREZA	
	ng/ul	260/280	260/230	ng/ul	260/280	260/230
1	16.3	1.64	1.57			
1	15.9	1.66	1.61	16.00	1.65	1.57
1	15.8	1.64	1.54			
2	3.1	1.53	1.49			
2	3.4	1.61	1.45	3.30	1.61	1.39
2	3.4	1.68	1.24			
3	17.8	1.5	1.01			
3	17	1.52	0.99	19.67	1.51	0.92
3	24.2	1.52	0.77			
4	18.27	1.73	1.12			
4	18.29	1.72	1.13	18.24	1.72	1.13
4	18.16	1.7	1.15			
5	12.88	1.74	1.42			
5	12.05	1.74	1.38	26.23	1.74	1.39
5	12.75	1.73	1.36			

* Razón 260/280 valores cercanos 1.8 indican alta pureza. Razón 260/230 valores cercanos a 2 indican alta pureza.

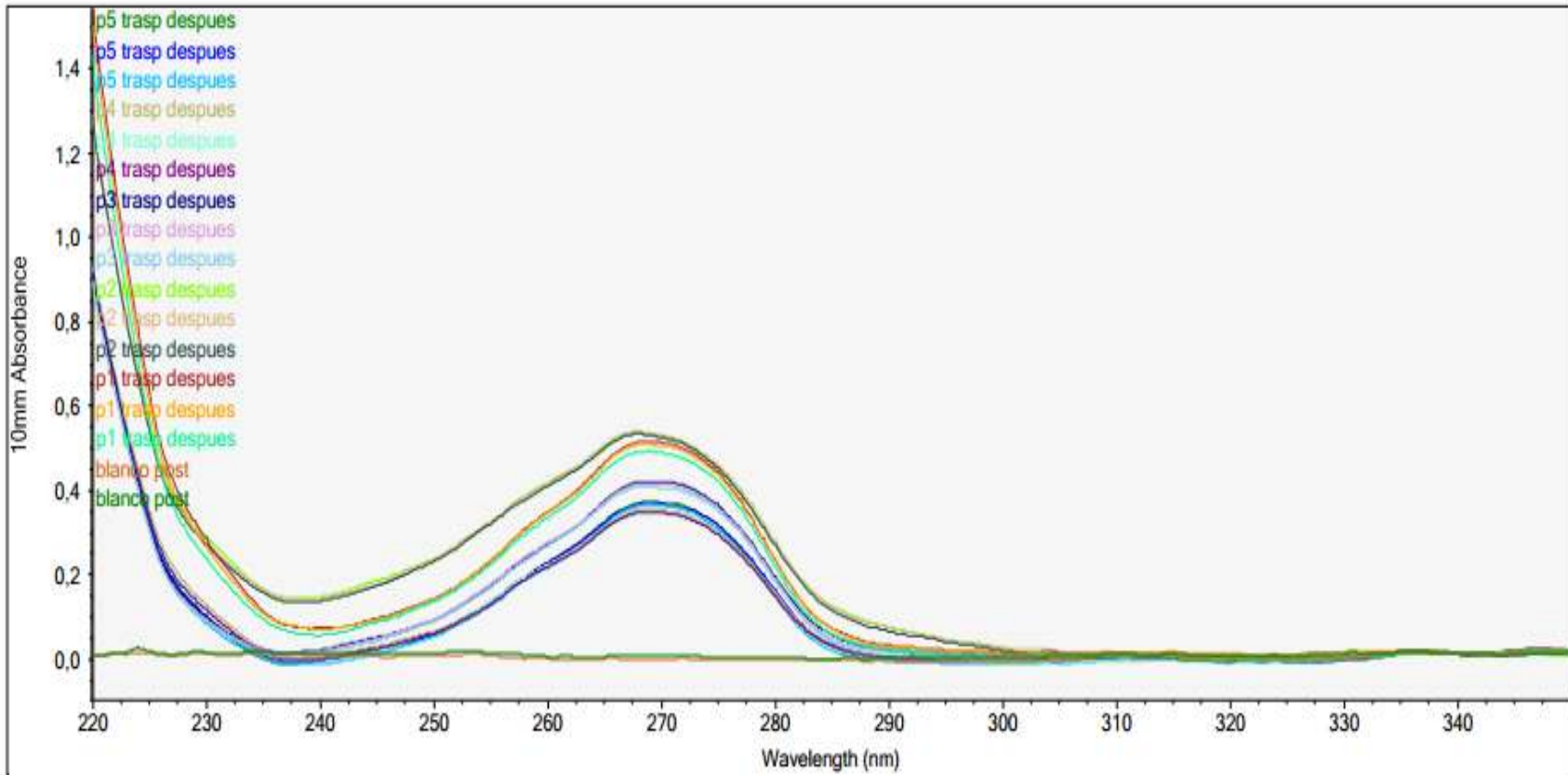


Figura 4. Curvas de cuantificación de las muestras control después de la purificación.

4.2. TRANSCRIPCIÓN INVERSA DE PUNTO FINAL (RT-PCR convencional)

4.2.1. Biomarcador *CD3e mRNA*

Para la optimización de la RT-PCR de punto final del biomarcador *CD3e mRNA*, se realizó un gradiente de temperatura (61-69°C), con intervalos de 2°C entre temperaturas, utilizando SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum[®] Taq. Donde se pudo observar que a 61°C se obtiene una mejor intensidad de banda, además de no presentar productos inespecíficos. Al aumentar la temperatura la intensidad de la banda disminuye y aparecen productos inespecíficos, mientras que a 69°C no se evidenció producto de amplificación (Figura 5).

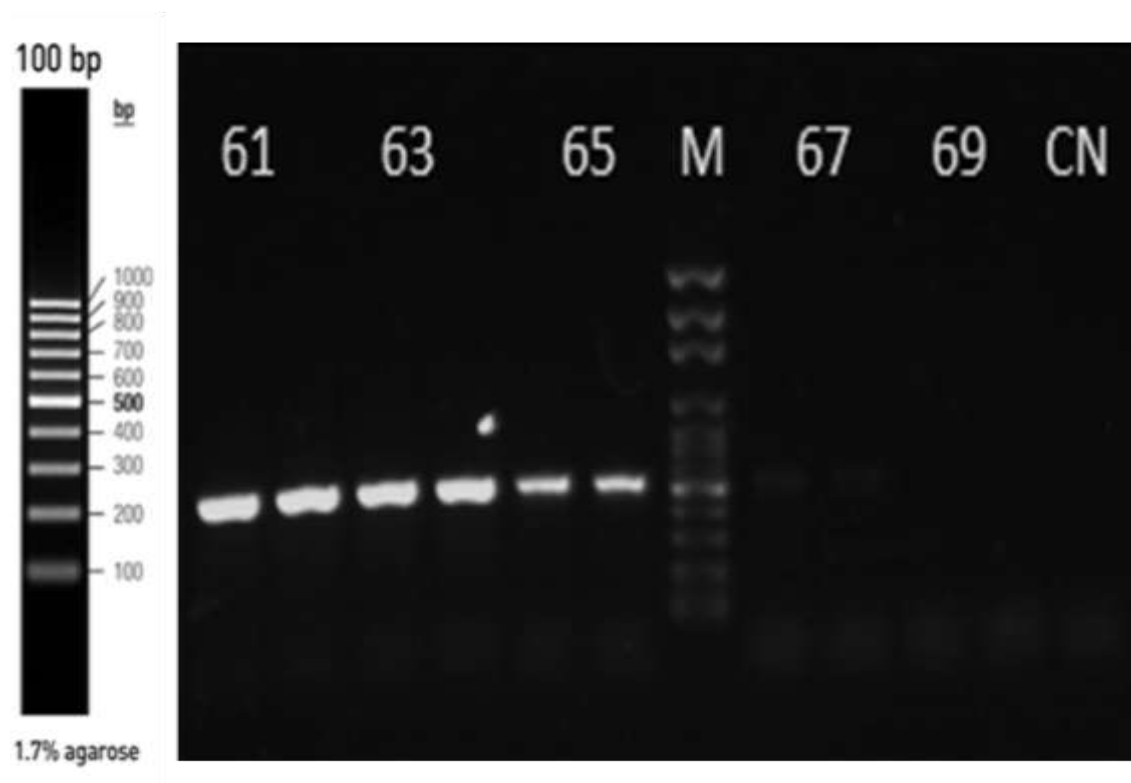


Figura 5. Visualización del amplicón *CD3e mRNA* en cámara de UV en gel de agarosa 2%. (M: Marcador de 100bp; CN: Control negativo; 61 - 69 temperaturas utilizadas en el gradiente).

Para comprobar que la temperatura elegida (61°C) es la correcta, se realizó un ensayo de eficiencia de amplificación con controles positivos y negativos. Donde se evidenció una única banda del producto de amplificación para los controles positivos, lo que nos indica que no existieron productos inespecíficos. También se pudo observar que no existe contaminación en los controles negativos (Figura 6).

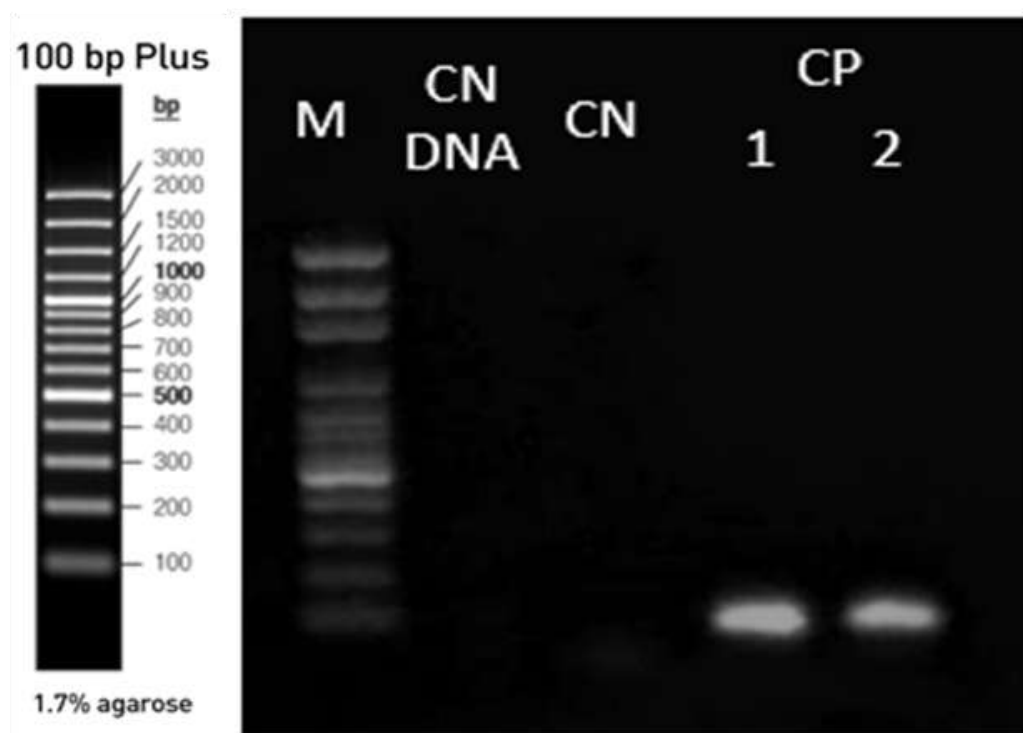


Figura 6. Visualización de la prueba de eficiencia de *CD3e mRNA* en cámara de UV en gel de agarosa 2%. (M: Marcador de 100bp; CN DNA: Control negativo para DNA; CN: Control negativo; CP: Controles positivos).

Posterior a la prueba de eficiencia se realizó un ensayo de sensibilidad analítica para el biomarcador con el objetivo de verificar la concentración mínima de RNA necesaria para que los marcadores sean detectados. Para este análisis se realizaron seis diluciones seriadas de 1:5. Donde se pudo evidenciar que la cantidad mínima requerida para que se funcione la técnica de RT-PCR es de 7×10^{-3} ng/ μ l (Figura 7).

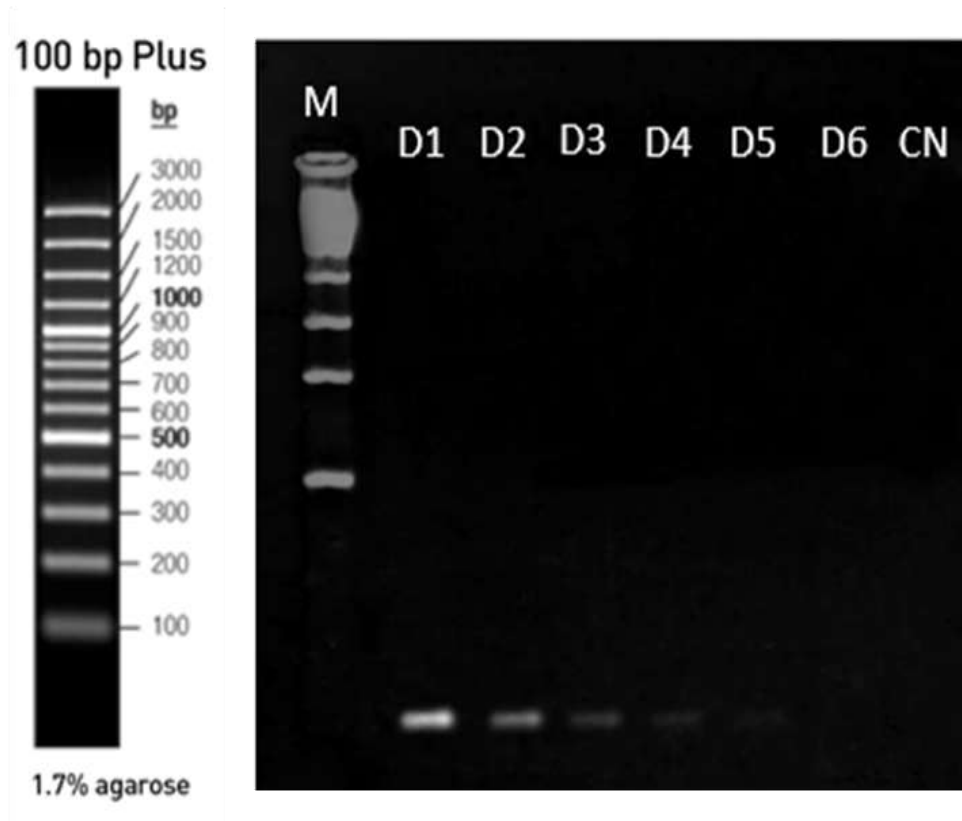


Figura 7. Visualización de la prueba de sensibilidad analítica de *CD3e mRNA* en cámara de UV en gel de agarosa 2%. (**M:** marcador de 100bp; **D1:** 70ng/μl; **D2:** 7ng/μl; **D3:** 0.7ng/μl; **D4:** 7×10^{-2} ng/μl; **D5:** 7×10^{-3} ng/μl; **D6:** 7×10^{-4} ng/μl; **CN:** Control Negativo).

4.2.2. Biomarcador *18S rRNA*

La optimización del biomarcador *18S rRNA* fue realizada con un gradiente de temperaturas desde 61°C hasta 65°C con intervalos de 2°C entre temperaturas. En éste caso el rango de temperaturas es más pequeño debido a que *18S rRNA* es un gen constitutivo, que tiene un amplio rango de temperaturas de amplificación, y ya que el objetivo final es emplear un panel de varios biomarcadores, se trata de manejar la misma o similares temperaturas entre marcadores, por éste motivo también se trabajó con 61°C (Figura 8).

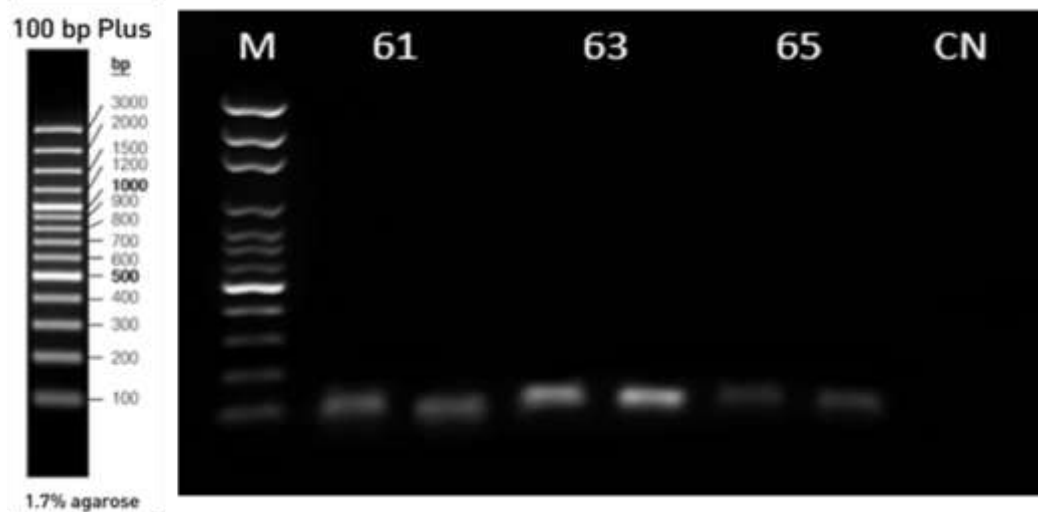


Figura 8. Visualización del amplicón *18S rRNA* en cámara de UV en gel de agarosa 2%. (M: Marcador de 100bp; CN: Control negativo; 61 - 65 temperaturas utilizadas en el gradiente).

Para el análisis de eficiencia del biomarcador *18S rRNA* se realizó un ensayo a 61°C con controles tanto positivos como negativos. En éste se pudo evidenciar que los dos controles positivos amplificaron una única banda, demostrando que no hay productos inespecíficos. En los controles negativos no se observó amplificación como se espera (Figura 9).

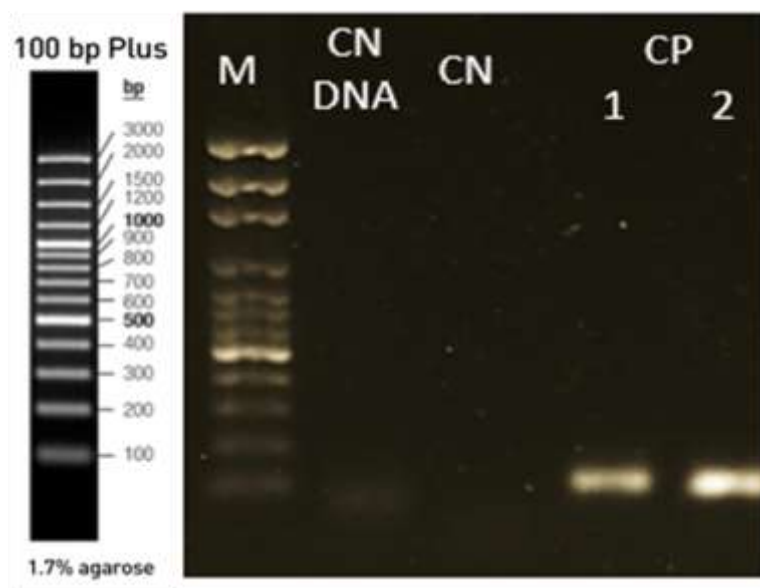


Figura 9. Visualización de la prueba de eficiencia de *18S rRNA* en cámara de UV en gel de agarosa 2%. (M: Marcador de 100bp; CN DNA: Control negativo para DNA; CN: Control negativo; CP: Controles positivos).

Para el análisis de sensibilidad analítica se utilizaron seis diluciones seriadas de 1:10. Este ensayo nos permitió evidenciar que 7×10^{-3} ng/ μ l, es la cantidad mínima requerida de RNA total para que sea detectado el biomarcador *18S rRNA*.

Posterior a la prueba de eficiencia se realizó un ensayo de sensibilidad analítica para cada marcador con el objetivo de verificar la concentración mínima de RNA necesaria para que los marcadores sean detectados (Figura 10).

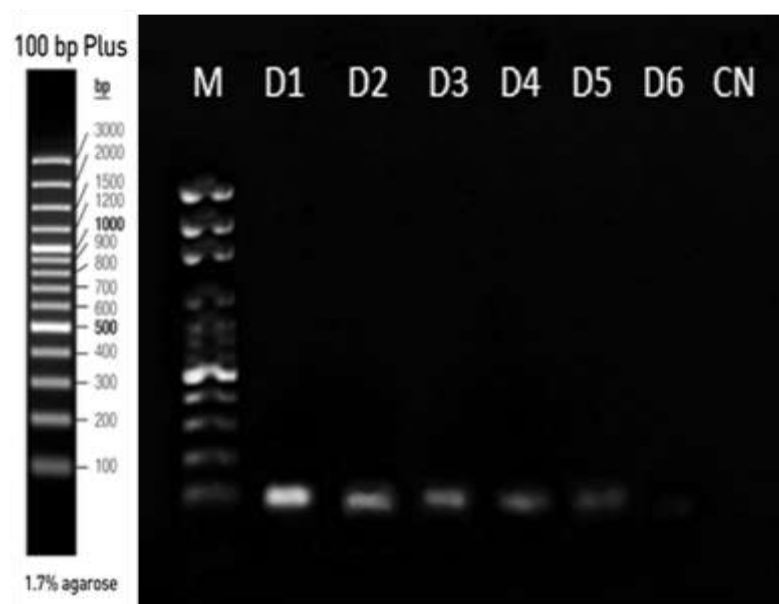


Figura 10. Visualización de la prueba de sensibilidad analítica de *18S rRNA* en cámara de UV en gel de agarosa 2%. (M: marcador de 100bp; D1: 70ng/ μ l; D2: 7ng/ μ l; D3: 0.7ng/ μ l; D4: 7×10^{-2} ng/ μ l; D5: 7×10^{-3} ng/ μ l; D6: 7×10^{-4} ng/ μ l; CN: Control Negativo).

4.3. TRANSCRIPCIÓN INVERSA TIEMPO REAL (RT-qPCR)

La optimización del método RT-qPCR se realizó mediante ensayos con muestras controles tanto positivas como negativas. Para el biomarcador *CD3e mRNA* se utilizó el Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-step Kit, así como TaqMan® RNA-to-CT 1-Step Kit de Applied Biosystems (Biosystems A. , 2010). Para el biomarcador *18S rRNA* sólo se realizó ensayos con TaqMan® RNA-to-CT 1-Step Kit de Applied Biosystems.

Una vez optimizados los procesos de las RT-qPCR, se procedió a analizar ambos biomarcadores con muestras de pacientes con y sin trasplante renal.

4.3.1. Ensayos de optimización de la RT-qPCR con Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit del biomarcador *CD3e mRNA*

En la optimización del sistema en tiempo real para el biomarcador *CD3e mRNA*, se realizaron tres ensayos de temperaturas con el kit de Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit (Biosystems A. A., 2010) y posteriormente se aplicó el kit TaqMan® RNA-to-CT 1-Step Kit de Applied Biosystems (Biosystems A. , 2010).

En el ensayo #1 del biomarcador se utilizaron dupletas de la muestra control (CP1 y CP2) y un control negativo para cada muestra. La temperatura de alineamiento probada fue de 61°C, con el método PCR tiempo Real (qPCR), y se utilizó el kit Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step (Biosystems A. A., 2010).

En la curva de disociación se pudo observar que la muestra CP2 se encuentra al mismo nivel que el control negativo, lo que nos demostró que no hubo amplificación de la misma (Figura 11).

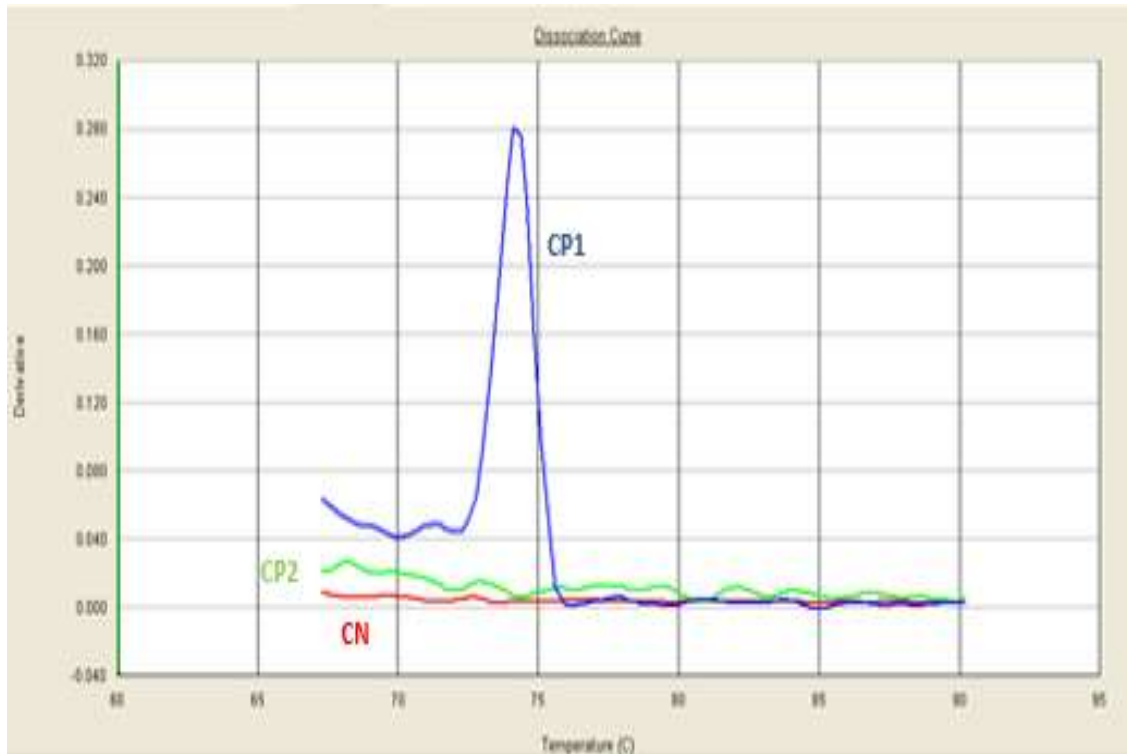


Figura 11. Curva de disociación obtenida para el ensayo #1 del biomarcador *CD3e mRNA* con Power SYBR[®] Green RNA-to-CT[™] 1-Step kit a 61°C. (CP1: Control positivo 1; CP2: Control positivo 2; CN: Control negativo).

Por otro lado, la curva de amplificación nos muestra que ambos controles positivos están amplificando pero no son dupletas. También se observó que el control negativo, si bien no interfiere con los controles positivos, se puede ver una tendencia de amplificación probablemente causada por una contaminación externa (Figura 12).

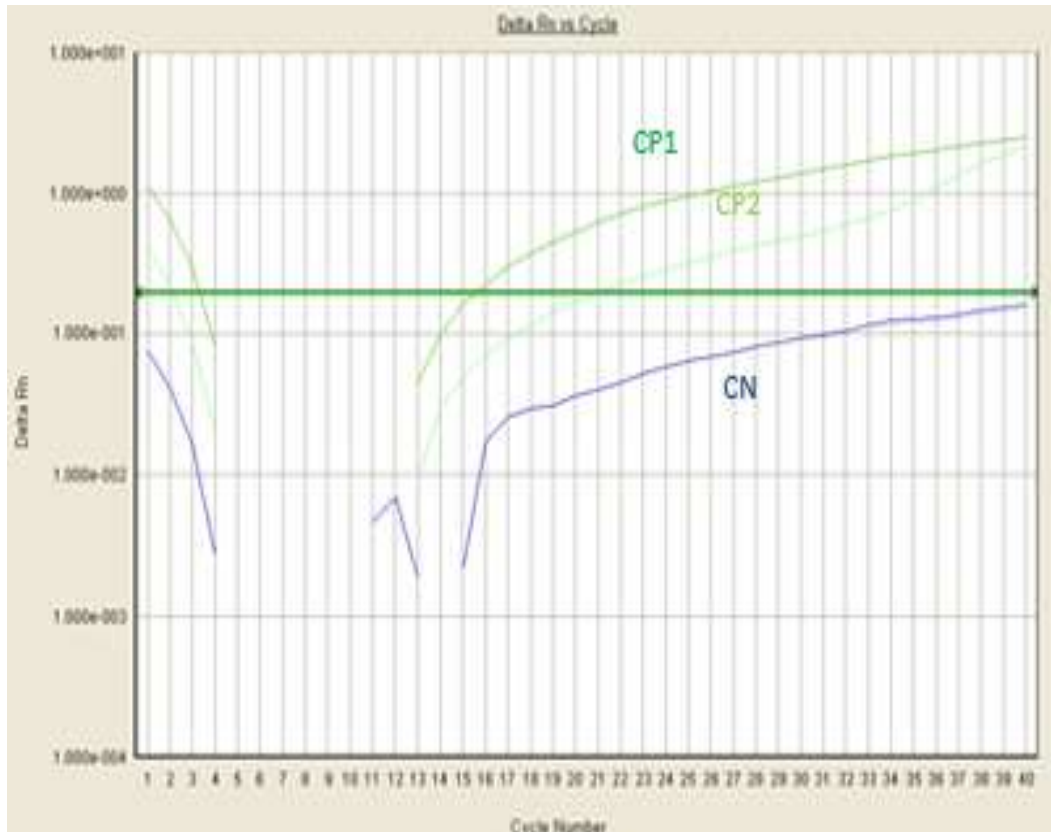


Figura 12. Curva de amplificación obtenida para el ensayo #1 del biomarcador *CD3e mRNA* con Power SYBR[®] Green RNA-to-CT[™] 1-Step kit a 61°C. (CP1: Control positivo 1; CP2: Control positivo 2; CN: Control negativo)

El ensayo #2 se realizó igualmente con dupletas de la muestra control (CP1 y CP2) y un control negativo para cada muestra. La temperatura de alineamiento probada fue de 63°C, y se utilizó el kit Power SYBR[®] Green RNA-to-CT[™] 1-Step (Biosystems A. A., 2010).

En la curva de disociación de este ensayo, se pudo observar que ambos controles positivos amplificaron, aunque parecerían no ser dupletas, esto puede deberse a una mala distribución del material genético. Cabe recalcar que el control negativo no amplificó en este ensayo (Figura 13).

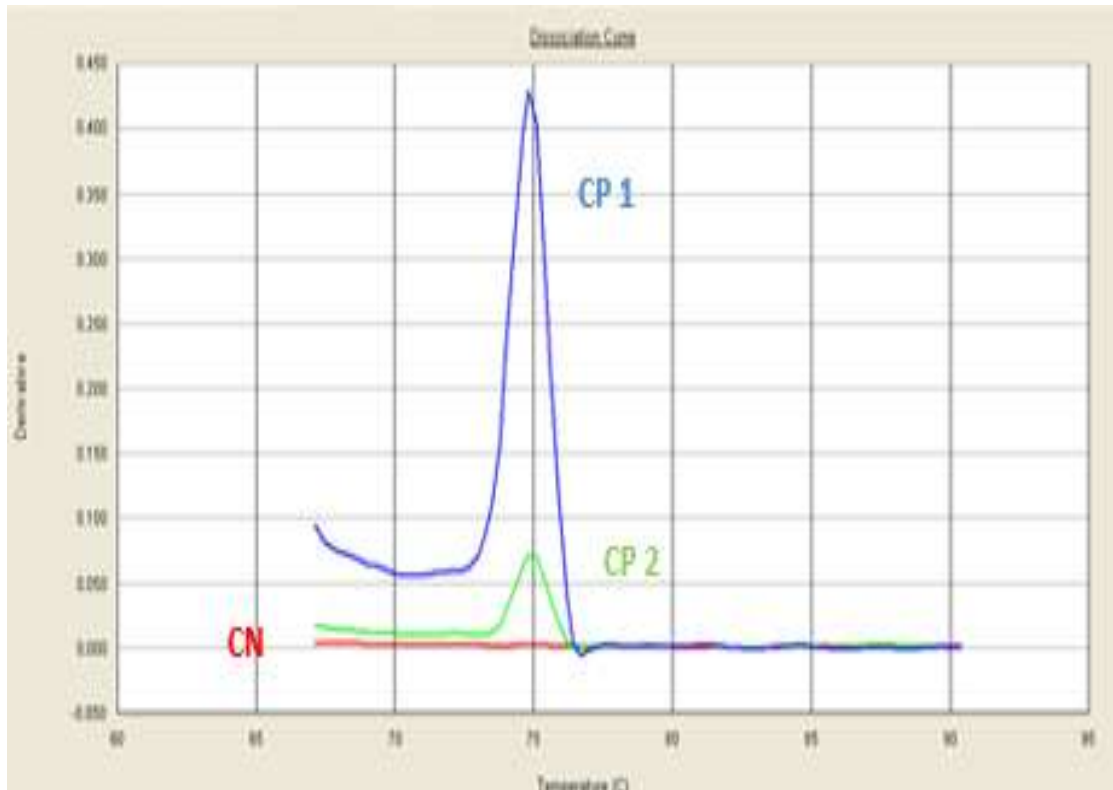


Figura 13. Curva de disociación obtenida para el ensayo #2 del biomarcador *CD3e mRNA* con Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step kit a 63°C. (CP1: Control positivo 1; CP2: Control positivo 2; CN: Control negativo)

La curva de amplificación del segundo ensayo nos mostró la amplificación de ambos controles positivos. Aunque no se observan como dupletas, se comportan de la misma manera. El control negativo presentó un creciente pico de fluorescencia en el ciclo 31, que puede deberse a la presencia de dímeros, que son el producto resultante de la unión de cebadores (Figura 14).

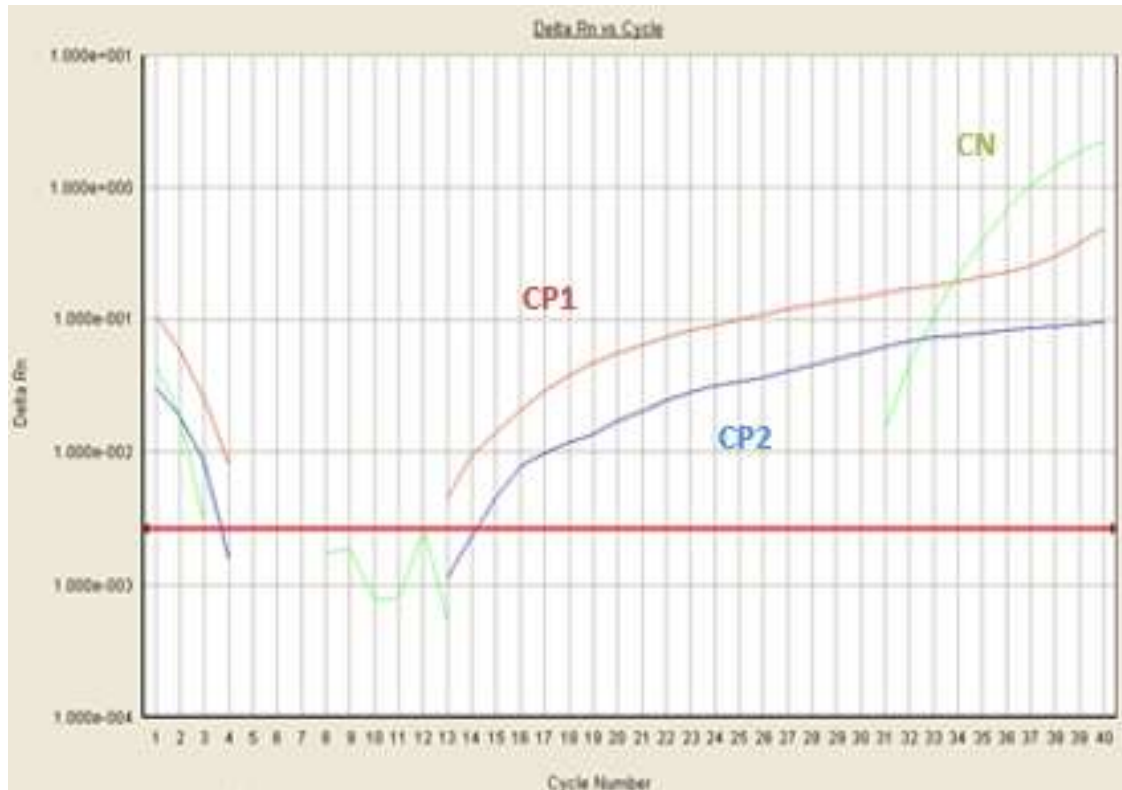


Figura 14. Curva de amplificación obtenida para el ensayo #2 del biomarcador *CD3e mRNA* con Power SYBR[®] Green RNA-to-CT[™] 1-Step kit a 63°C. (CP1: Control positivo 1; CP2: Control positivo 2; CN: Control negativo)

En el tercer ensayo de temperaturas, se emplearon dupletas de la misma muestra (CP1 y CP2) y un control negativo por cada muestra. La temperatura de alineamiento probada fue de 65°C, y se utilizó el kit Power SYBR[®] Green RNA-to-CT[™] 1-Step (Biosystems A. A., 2010). No se observó amplificación tanto en los controles positivos como en el control negativo, además de la presencia de ruido de fondo (Figura 15).

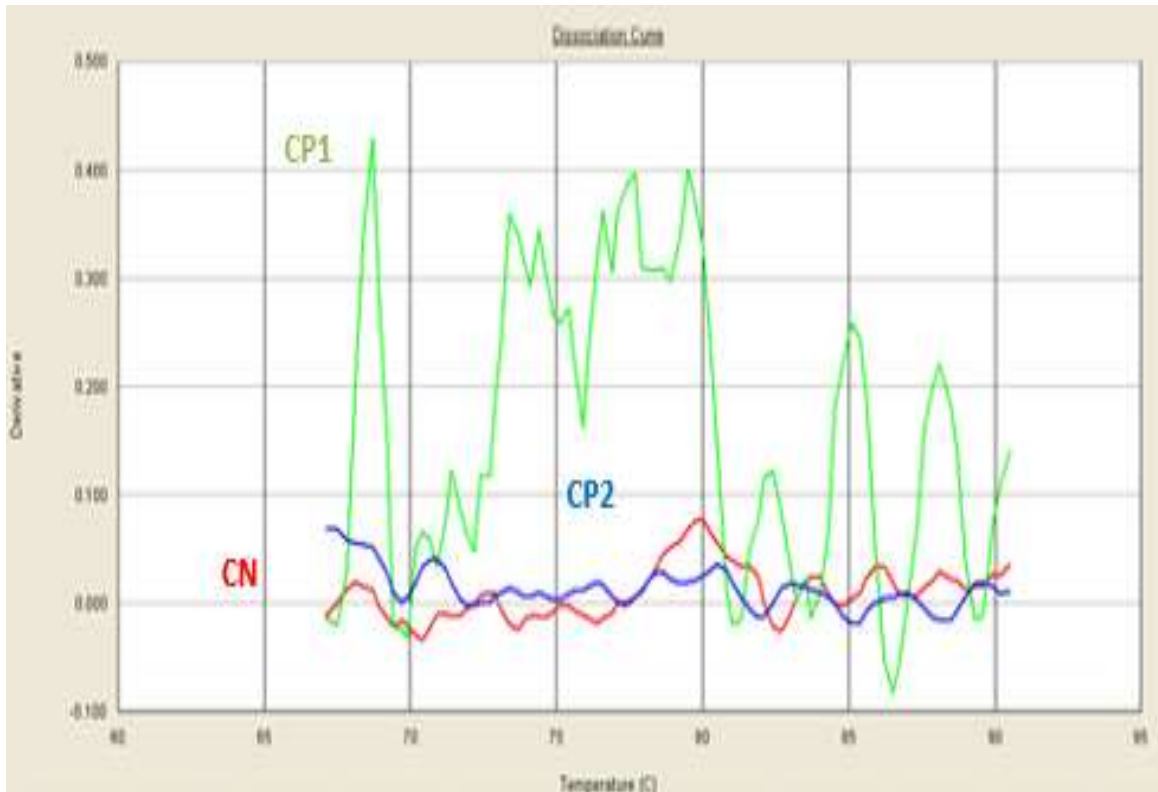


Figura 15. Curva de disociación obtenida para el ensayo #3 del biomarcador *CD3e mRNA* con Power SYBR[®] Green RNA-to-CT[™] 1-Step kit a 65°C. (CP1: Control positivo 1; CP2: Control positivo 2; CN: Control negativo)

La curva de amplificación del tercer ensayo no se presenta, debido a que en la curva de disociación el resultado obtenido fue ruido de fondo. Este ruido podría deberse al fluoróforo de base (ROX), y/o a una amplificación inespecífica.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos para el biomarcador *CD3e mRNA* (RT-qPCR), se observó como temperatura ideal 63°C. Debido a que en ésta se presentó la mejor amplificación en las dupletas de los controles positivos, y la amplificación del control negativo fue en ciclos tardíos que no afectan al ensayo.

Definido esto, se procedió a la realización del ensayo en ambos biomarcadores (*CD3e mRNA* y *18S rRNA*) con el kit TaqMan[®] RNA-to-CT[™] 1-Step Kit de Applied Biosystems (Biosystems A. , 2010).

4.3.2. Ensayos de RT-qPCR para los biomarcadores *CD3e mRNA* y *18S rRNA* con TaqMan® RNA-to-CT 1-Step Kit de Applied Biosystems

Se realizó la RT-qPCR del biomarcador *CD3e mRNA* a 63°C de temperatura de alineamiento (Aenxo 5), con TaqMan® RNA-to-CT 1-Step Kit (Biosystems A. , 2010). Siguiendo las recomendación del fabricante, se realizaron tripletas de la muestra y un control negativo por corrida. Donde se pudo observar que las tripletas además de amplificar se comportaban de la misma manera, mientras que el control negativo no amplificó (Figura 16).

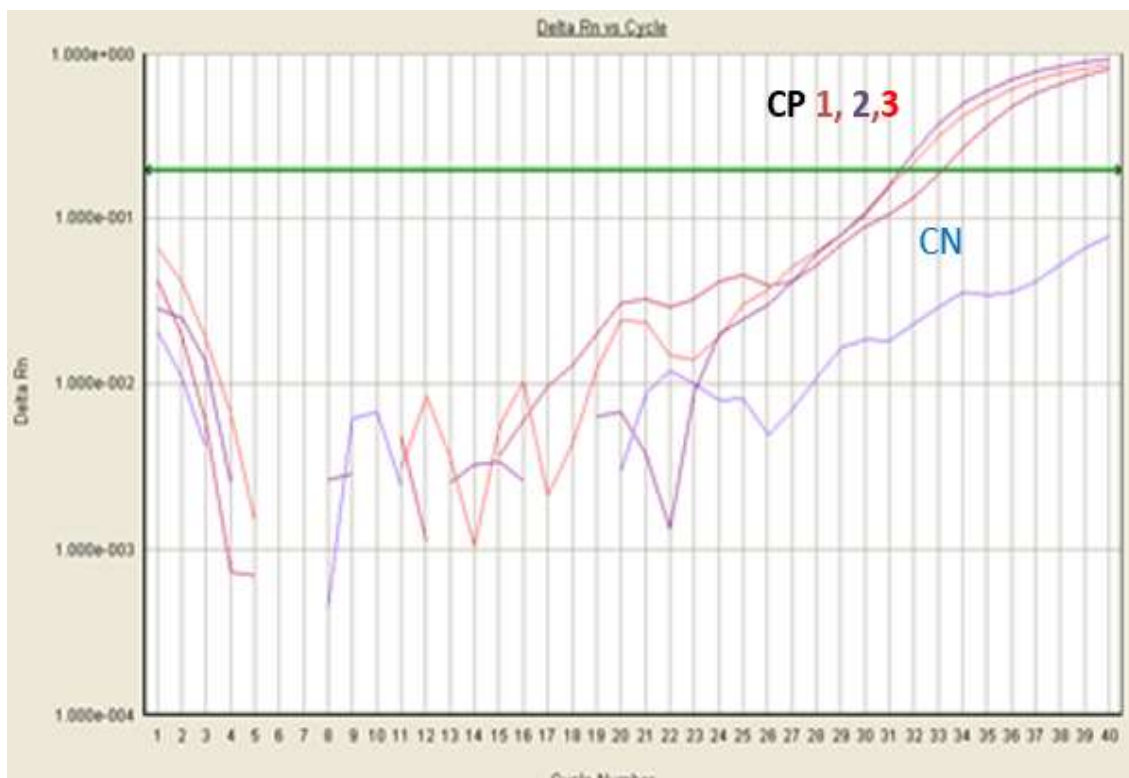


Figura 16. Curva de amplificación obtenida para el biomarcador *CD3e mRNA* con TaqMan® RNA-to-CT 1-Step Kit de Applied Biosystems a 63°C. (CP1: Control positivo 1; CP2: Control positivo 2; CP3: Control positivo 3; CN: Control negativo)

Para el biomarcador *18S rRNA* se realizó un ensayo con el kit TaqMan® RNA-to-CT 1-Step Kit de Applied Biosystems (Biosystems A. , 2010). Donde se evidenció que el control negativo no amplificó, mientras que las tripletas del control positivo amplificaron y presentaron un comportamiento similar (Figura 17).

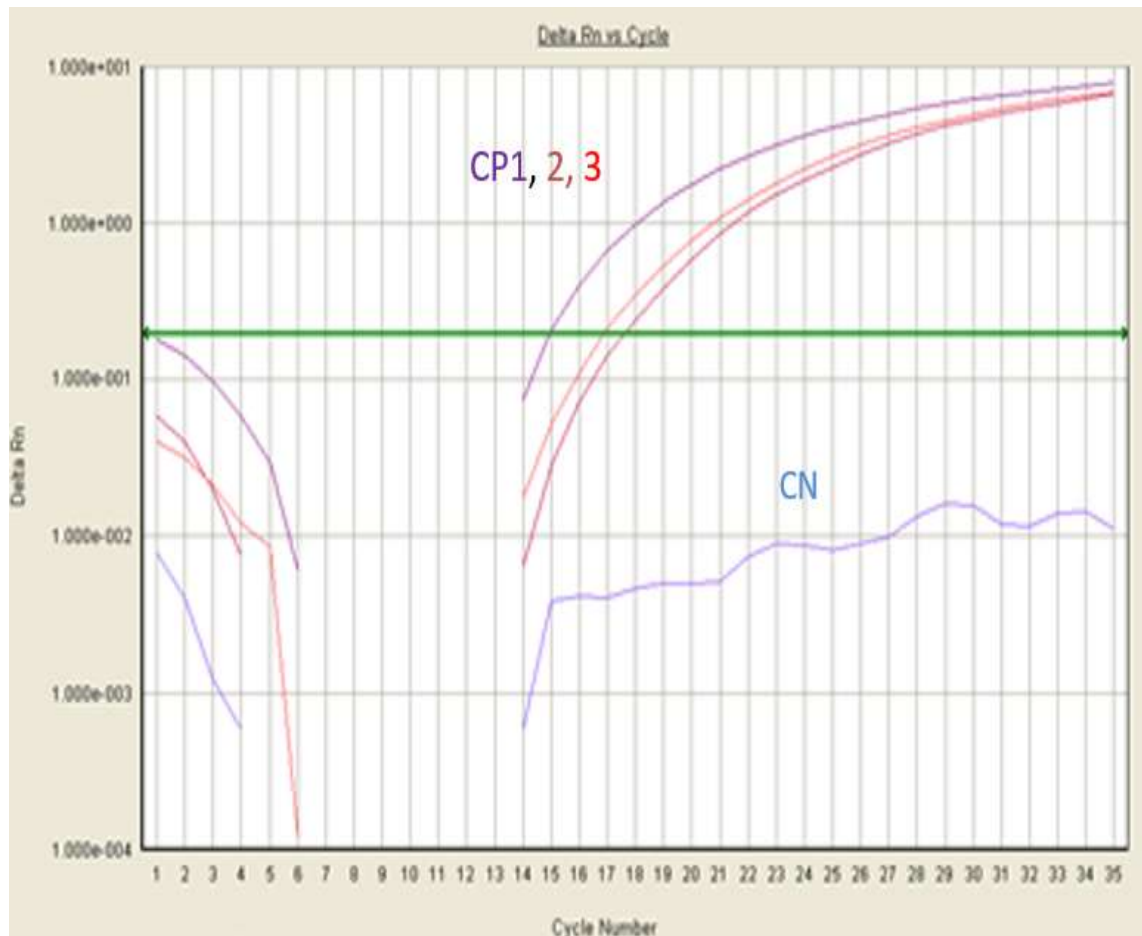


Figura 17. Curva de amplificación obtenida para el biomarcador *18S rRNA* con TaqMan® RNA-to-CT 1-Step Kit de Applied Biosystems a 63°C. (CP1: Control positivo 1; CP2: Control positivo 2; CP3: Control positivo 3; CN: Control negativo)

4.3.3. Ensayos de RT-qPCR en pacientes con trasplante renal de los biomarcadores *CD3e mRNA* y *18S rRNA*

Para validar los sistemas se realizó una prueba de campo con cinco pacientes con trasplante renal, tres ambulatorios y dos hospitalizados. Para tener un grupo control, se incluyó en el ensayo a cinco personas que no han sufrido ningún tipo de cirugía. Se realizaron tres ensayos con los mismos pacientes en diferentes días. Cada ensayo incluía las muestras de los diez pacientes mencionados (cinco de trasplante y cinco normales), se hizo una triplete por cada paciente. Además de un control negativo y un positivo por cada ensayo.

En los ensayos realizados con el biomarcador *CD3e mRNA* se pudo observar que el control positivo al igual que las muestras de los pacientes que han recibido trasplante renal amplificaron, mientras que el control negativo y los pacientes normales no presentaron ninguna amplificación (Figuras 18-20 y Tabla 5).

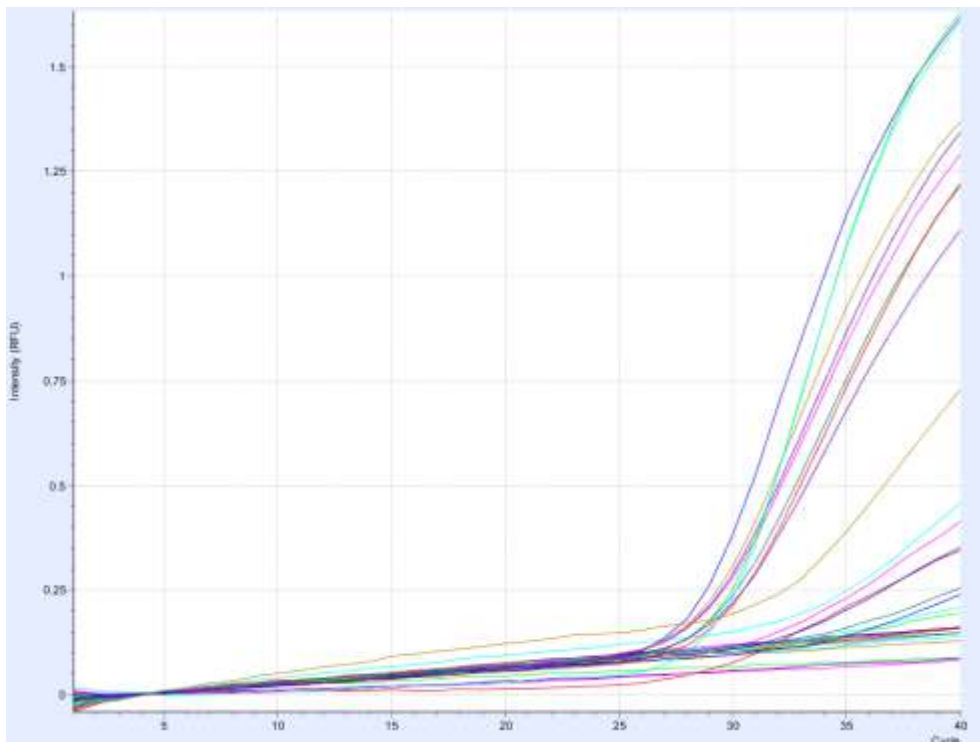


Figura 18. Curvas de amplificación obtenidas en el ensayo #1 de los diez pacientes para el biomarcador *CD3e mRNA* con TaqMan[®] RNA-to-CT 1-Step Kit de Applied Biosystems.

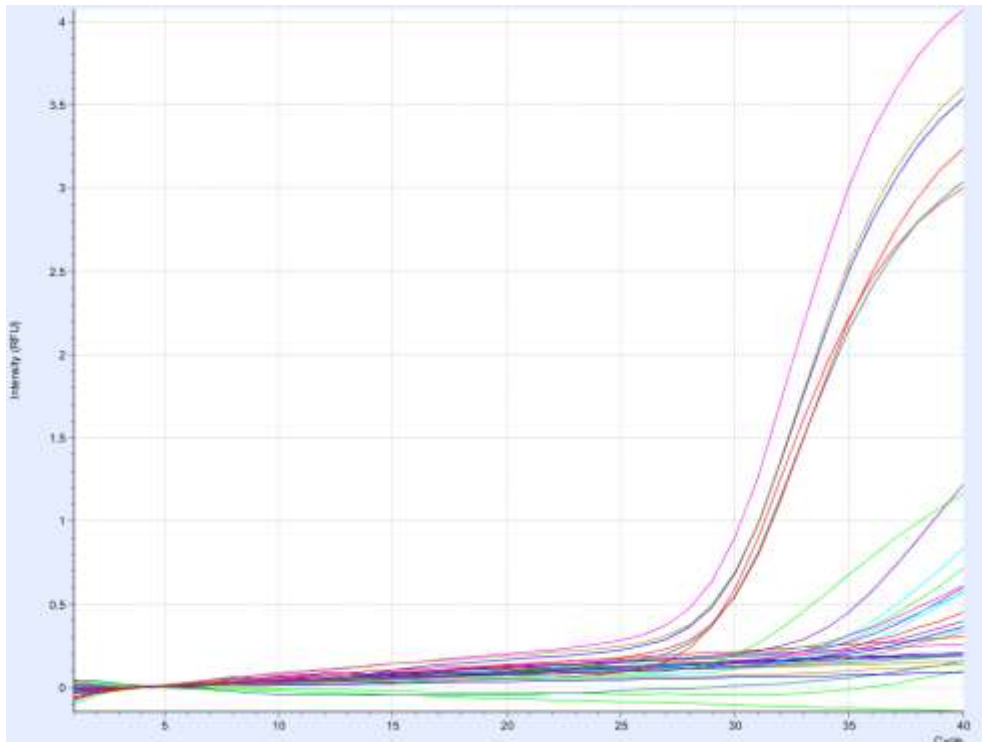


Figura 19. Curvas de amplificación obtenidas en el ensayo #2 de los diez pacientes para el biomarcador *CD3e mRNA* con TaqMan® RNA-to-CT 1-Step Kit de Applied Biosystems.

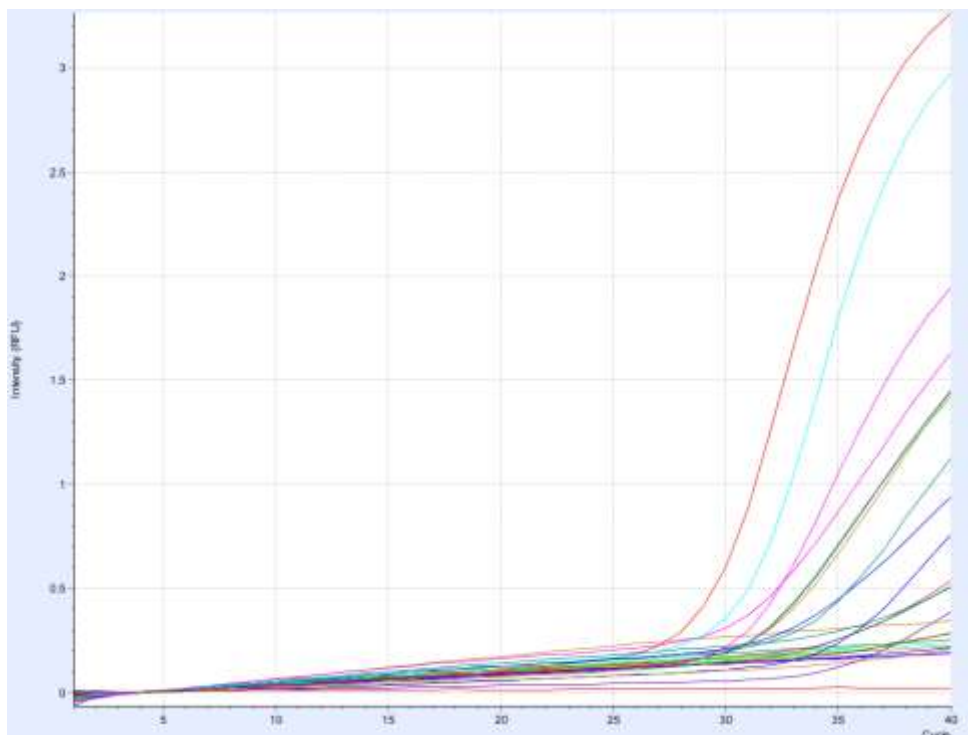


Figura 20. Curvas de amplificación obtenidas en el ensayo #3 de los diez pacientes para el biomarcador *CD3e mRNA* con TaqMan® RNA-to-CT 1-Step Kit de Applied Biosystems.

Tabla 5. Resultados de expresión del biomarcador *CD3e mRNA* en triplas por pacientes de cada ensayo.

ENSAYO	CT	PACIENTES NORMALES					PACIENTES DE TRANSPLANTE					CONTROL	
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	POSITIVO	NEGATIVO
#1	CT1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	33,15	28,20	28,07	28,91	36,47	28,961	0
	CT2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	31,54	28,26	28,66	28,71	35,96		
	CT3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	34,66	27,57	28,88	28,84	32,93		
	PROMEDIO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	33,12	28,01	28,54	28,82	35,12		
	EXPRESIÓN*	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	++		
#2	CT1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	33,60	28,20	28,44	32,88	15,54	27,96	0,00
	CT2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	33,79	28,49	28,76	32,50	13,31		
	CT3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	33,40	28,60	29,18	32,13	16,68		
	PROMEDIO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	33,60	28,43	28,80	32,50	15,18		
	EXPRESIÓN*	-	-	-	-	-	++	+++	+++	++	++		
#3	CT1	0	0	0	0	0	33,4	30,8	28,3	30	34,1	28,443	0
	CT2	0	0	0	0	0	32,7	33,4	28,7	31,1	33,7		
	CT3	0	0	0	0	0	34	31,6	30,6	30,2	33,3		
	PROMEDIO	0	0	0	0	0	33,4	31,9	29,2	30,4	33,7		
	EXPRESIÓN*	-	-	-	-	-	++	++	+++	++	++		

* EXPRESIÓN: (-) Negativo; (+) Reacción pobre; (++) Positivo; (+++) Positivo fuerte.

En los ensayos realizados con el biomarcador *18S rRNA* se pudo observar que el control negativo fue la única muestra que no amplificó. Dentro de las muestras que si amplificaron se pudo observar que los CT promedios totales de los tres ensayos fueron de 21.46 y 14.42, para los pacientes normales y con trasplante renal respectivamente. Al evaluar por ensayos se pudo observar que en el ensayo #1 los pacientes normales presentaron un CT promedio de 22.91, mientras que los pacientes que han recibido trasplante renal su CT promedio fue de 17.36. En el ensayo #2 se observó de igual manera, que el CT promedio fue de 21.02 y 14.52, en pacientes normales y pacientes con trasplante respectivamente. En el ensayo #3 los CT promedios fueron para los pacientes sin trasplante de 20.44, mientras que para los pacientes con trasplante renal fue de 14.42 (Figuras 21-23 y Tabla 6).

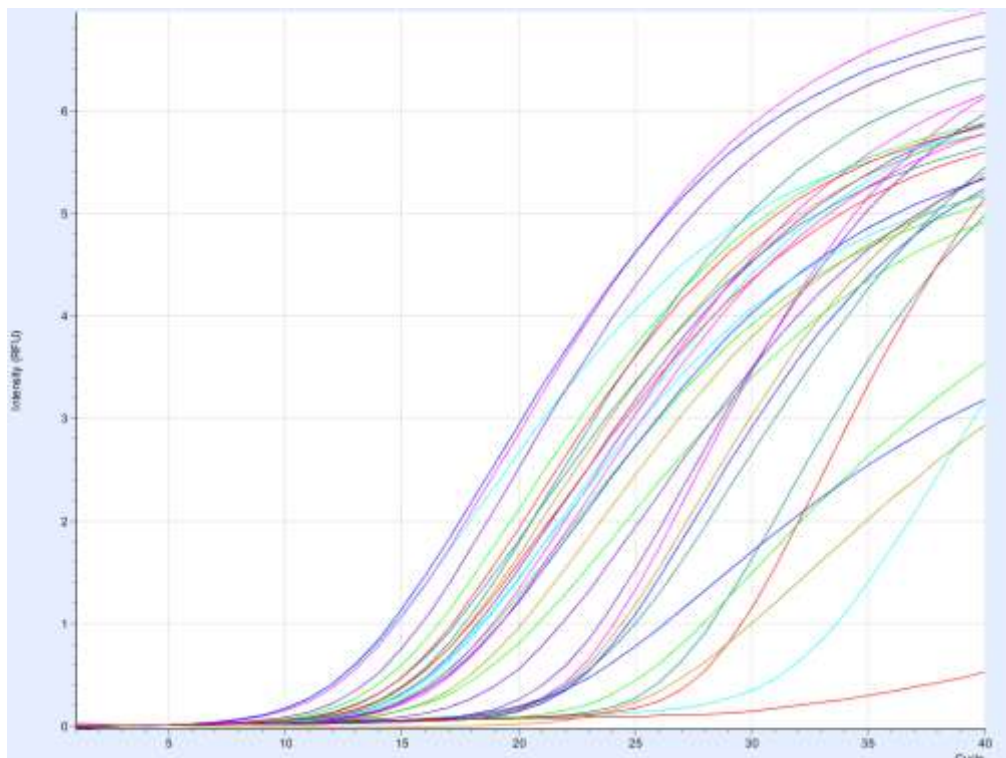


Figura 21. Curvas de amplificación obtenidas en el ensayo #1 de los diez pacientes para el biomarcador *18S rRNA* con TaqMan[®] RNA-to-CT 1-Step Kit de Applied Biosystems.

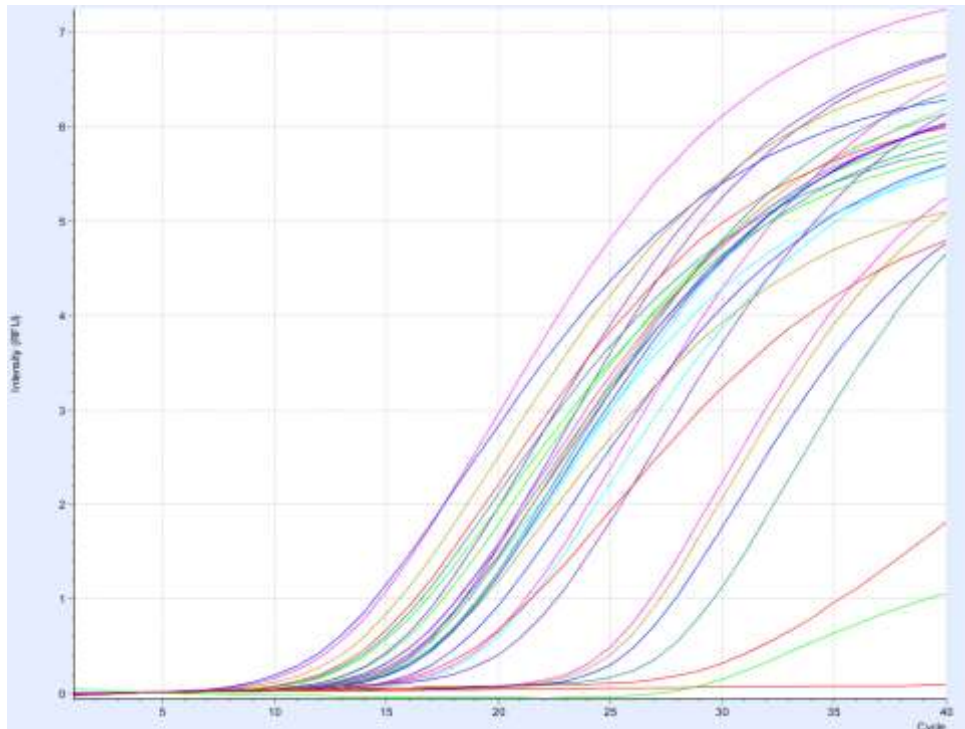


Figura 22. Curvas de amplificación obtenidas en el ensayo #2 de los diez pacientes para el biomarcador *18S rRNA* con TaqMan[®] RNA-to-CT 1-Step Kit de Applied Biosystems.

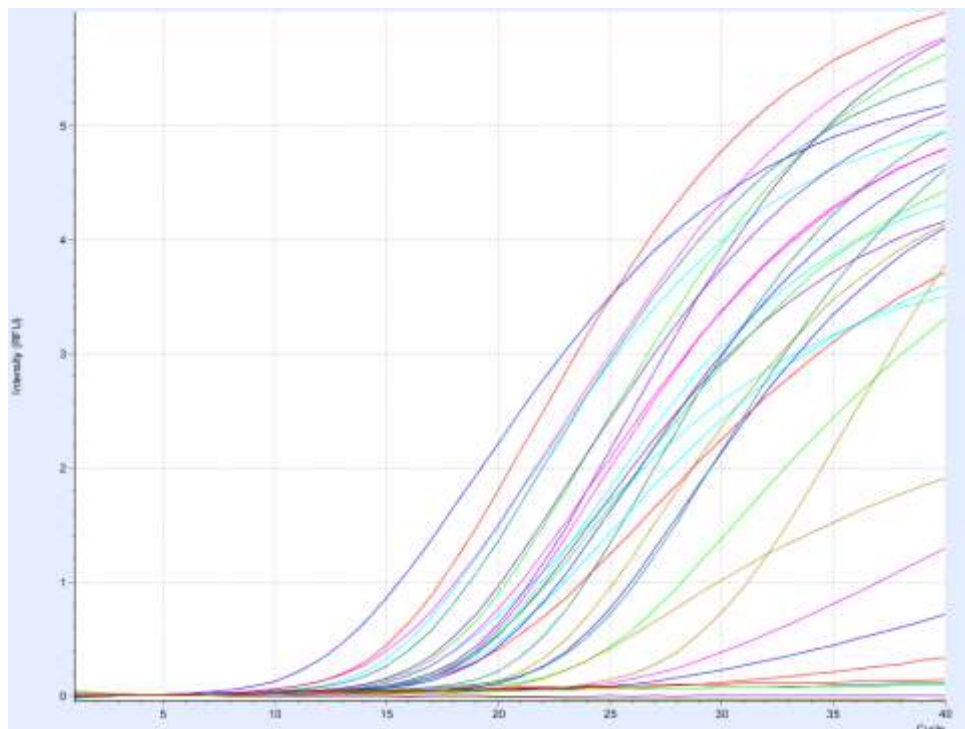


Figura 23. Curvas de amplificación obtenidas en el ensayo #3 de los diez pacientes para el biomarcador *18S rRNA* con TaqMan[®] RNA-to-CT 1-Step Kit de Applied Biosystems.

Tabla 6. Resultados de expresión del biomarcador *18S rRNA* en triplas por pacientes de cada ensayo.

ENSAYO	CT	PACIENTES NORMALES					PACIENTES DE TRANSPLANTE					CONTROL	
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	POSITIVO	NEGATIVO
#1	CT1	23,85	27,79	29,85	18,08	22,28	17,38	14,93	15,55	18,16	19,24	19,07	0,00
	CT2	16,46	28,21	29,45	18,15	21,51	14,66	11,82	14,49	16,74	21,18		
	CT3	20,16	21,53	27,33	18,21	20,80	18,66	18,65	18,41	17,43	23,11		
	Promedio	20,16	25,84	28,88	18,15	21,53	16,90	15,14	16,15	17,44	21,18		
	Expresión	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
#2	CT1	21,75	24,20	27,12	18,60	17,22	14,55	12,22	13,42	15,40	16,47	17,87	0,00
	CT2	15,36	25,14	27,41	20,24	15,85	16,46	11,44	13,26	15,63	15,97		
	CT3	16,02	24,58	27,70	18,85	15,23	14,76	12,83	13,58	15,27	16,52		
	Promedio	17,71	24,64	27,41	19,23	16,10	15,26	12,16	13,42	15,43	16,32		
	Expresión	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
#3	CT1	19,66	23,57	28,49	15,58	19,33	13,69	10,94	12,29	15,37	15,68	15,03	0,00
	CT2	14,27	24,88	28,43	15,44	18,80	11,97	9,03	11,05	13,59	17,08		
	CT3	16,96	20,56	27,51	15,47	17,62	14,70	23,50	14,83	14,16	18,48		
	Promedio	16,96	23,00	28,14	15,50	18,58	13,45	14,49	12,72	14,37	17,08		
	Expresión	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		

* EXPRESIÓN: (-) Negativo; (+) Reacción pobre; (++) Positivo; (+++) Positivo fuerte.

4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con los resultados obtenidos en las técnicas moleculares utilizadas, transcripción inversa de punto final (RT-PCR convencional) y transcripción inversa en tiempo real (RT-qPCR), se pudo valorar la sensibilidad y especificidad de los biomarcadores.

Se evaluó la eficiencia de amplificación de forma independiente de cada marcador mediante una regresión lineal, utilizando los logaritmos base 10 y base 2 de los valores de las concentraciones obtenidas a partir de las diluciones seriadas (1:5), en contraste con los productos de la amplificación (valores CT) (Figuras 24-25). Donde se evidenció que la eficiencia de amplificación fue del 70.28% ($R^2 = 0.9513$) para *CD3e mRNA* y del 76.71% ($R^2 = 0.996$) para *18S rRNA* (Tabla 7).

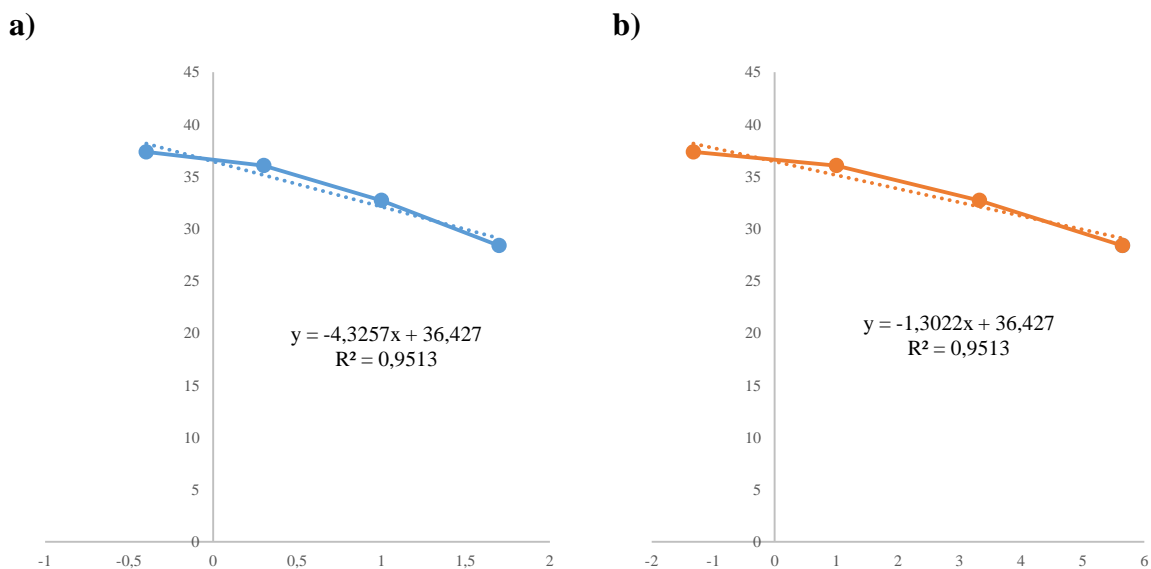


Figura 24. Regresión lineal entre los valores CT del biomarcador *CD3e mRNA* y las concentraciones de las diluciones seriadas (log. base 10 y log. base 2). **a)** log base 10 y **b)** log base 2.

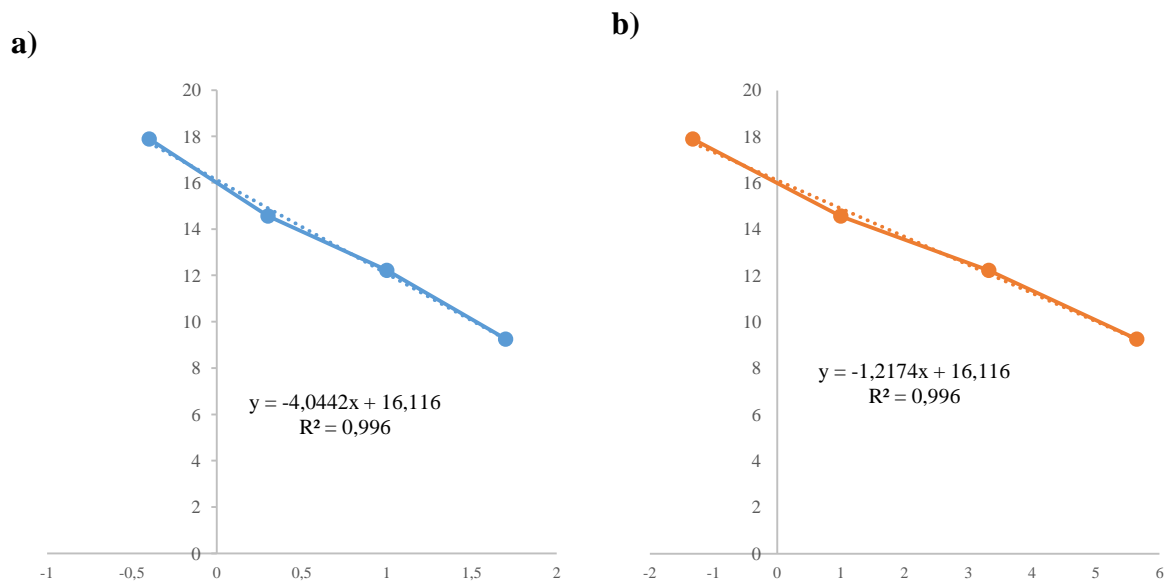


Figura 25. Regresión lineal entre los valores CT del biomarcador *18S rRNA* y las concentraciones de las diluciones seriadas (log. base 10 y log. base 2). **a)** log base 10 y **b)** log base 2.

Tabla 7. Resultados de expresión del biomarcador *18S rRNA* en tripletas por pacientes de cada ensayo.

Biomarcador	Concentración	CT*		PCT**	Log base 10	Log base 2
	RNA (ng/ul)	CT1	CT2			
CD3e	50	27,58	29,17	28,38	1,70	5,64
	10	32,46	32,94	32,70	1,00	3,32
	2	37,59	34,49	36,04	0,30	1,00
	0,4	37,15	37,53	37,34	-0,40	-1,32
18S	50	9,13	9,38	9,25	1,70	5,64
	10	12,10	12,35	12,22	1,00	3,32
	2	14,57	14,57	14,57	0,30	1,00
	0,4	18,22	17,57	17,90	-0,40	-1,32

* CT: Número de ciclos necesarios para que la fluorescencia emitida cruce el umbral. ** PCT: Promedio de CT

El *ratio de expresión* corresponde a la cuantificación relativa de la expresión génica, el cual nos permite evaluar las diferencias entre las eficiencias de la PCR del gen en estudio (*CD3e mRNA*) y el de referencia (*18S rRNA*). Dando como resultado la normalización del gen en estudio en función del gen de referencia. Dentro de los ensayos se pudo evidenciar que existen diferencias entre las muestras de los pacientes normales con los que fueron sometidos a un trasplante. En otras palabras los pacientes sometidos a trasplante presentaron expresión del biomarcador de estudio, mientras que en los controles (pacientes normales) la expresión fue nula (Tablas 8-10).

Tabla 8. Cuantificación relativa de la expresión génica en el ensayo #1.

PACIENTES	Promedio	EA target	EA ref	ΔCt target	ΔCt ref	Ratio
N1	0,00	0,70	0,77	28,96	-1,09	$2,75^{-5}$
N2	0,00	0,70	0,77	28,96	-6,78	$6,09^{-6}$
N3	0,00	0,70	0,77	28,96	-9,81	$2,73^{-6}$
N4	0,00	0,70	0,77	28,96	0,92	$4,69^{-5}$
N5	0,00	0,70	0,77	28,96	-2,46	$1,91^{-5}$
T1	33,12	0,70	0,77	-4,16	2,17	7,70
T2	28,01	0,70	0,77	0,95	3,93	2,03
T3	28,54	0,70	0,77	0,42	2,92	1,87
T4	28,82	0,70	0,77	0,14	1,62	1,46
T5	35,12	0,70	0,77	-6,16	-2,11	5,01

Target: *CD3e mRNA*; **Ref:** *18S rRNA*; **EA:** Eficiencia de amplificación; **ΔCt:** (Control - muestra)

Tabla 9. Cuantificación relativa de la expresión génica en el ensayo #2.

PACIENTES	Promedio	EA target	EA ref	ΔCt target	ΔCt ref	Ratio
N1	0,00	0,70	0,77	27,96	0,16	$5,46^{-5}$
N2	0,00	0,70	0,77	27,96	-6,77	$8,69^{-6}$
N3	0,00	0,70	0,77	27,96	-9,54	$4,18^{-6}$
N4	0,00	0,70	0,77	27,96	-1,36	$3,65^{-5}$
N5	0,00	0,70	0,77	27,96	1,77	$8,37^{-5}$
T1	33,60	0,70	0,77	-5,64	2,62	14,60
T2	28,43	0,70	0,77	-0,47	5,71	5,36
T3	28,80	0,70	0,77	-0,84	4,46	4,38
T4	32,50	0,70	0,77	-4,55	2,44	9,49
T5	34,42	0,70	0,77	-6,46	1,55	14,71

Target: *CD3e mRNA*; **Ref:** *18S rRNA*; **EA:** Eficiencia de amplificación; **Δ Ct:** (Control - muestra)

Tabla 10. Cuantificación relativa de la expresión génica en el ensayo #3.

PACIENTES	Promedio	EA target	EA ref	ΔCt target	ΔCt ref	Ratio
N1	0,00	0,70	0,77	28,44	-1,93	$2,64^{-5}$
N2	0,00	0,70	0,77	28,44	-7,97	$5,33^{-6}$
N3	0,00	0,70	0,77	28,44	-13,11	$1,36^{-6}$
N4	0,00	0,70	0,77	28,44	-0,47	$3,90^{-5}$
N5	0,00	0,70	0,77	28,44	-3,55	$1,72^{-5}$
T1	33,36	0,70	0,77	-4,91	1,58	8,60
T2	31,91	0,70	0,77	-3,47	0,54	3,92
T3	29,20	0,70	0,77	-0,75	2,31	2,40
T4	30,43	0,70	0,77	-1,99	0,66	2,40
T5	33,71	0,70	0,77	-5,27	-2,04	3,73

Target: *CD3e mRNA*; **Ref:** *18S rRNA*; **EA:** Eficiencia de amplificación; **Δ Ct:** (Control - muestra)

Para evaluar la variabilidad intra-ensayos se utilizó la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney, que nos permitió evidenciar si las diferencias de distribución entre los pacientes con y sin trasplante. Para todos los ensayos se pudo observar que la distribución no es la misma ($p = 0.008^{**}$; para todos los ensayos) (Figuras 26-28). Esto se evidencia al encontrar diferentes rangos, en cada ensayo, para los pacientes con trasplante: 0-2, 2-4, 4-6 y 6-8 para el ensayo 1 (Figura 26); 3-5, 5-7, 7-9 y 13-15 para el ensayo 2 (Figura 27); 2-4 y 8-10 para el ensayo 3 (Figura 28). Estas variaciones de los rangos podrían deberse a diferentes estadios de rechazo agudo del trasplante. A diferencia en los pacientes que no han sufrido dicho procedimiento se observó únicamente un rango, en los tres ensayos, por no existir expresión génica.

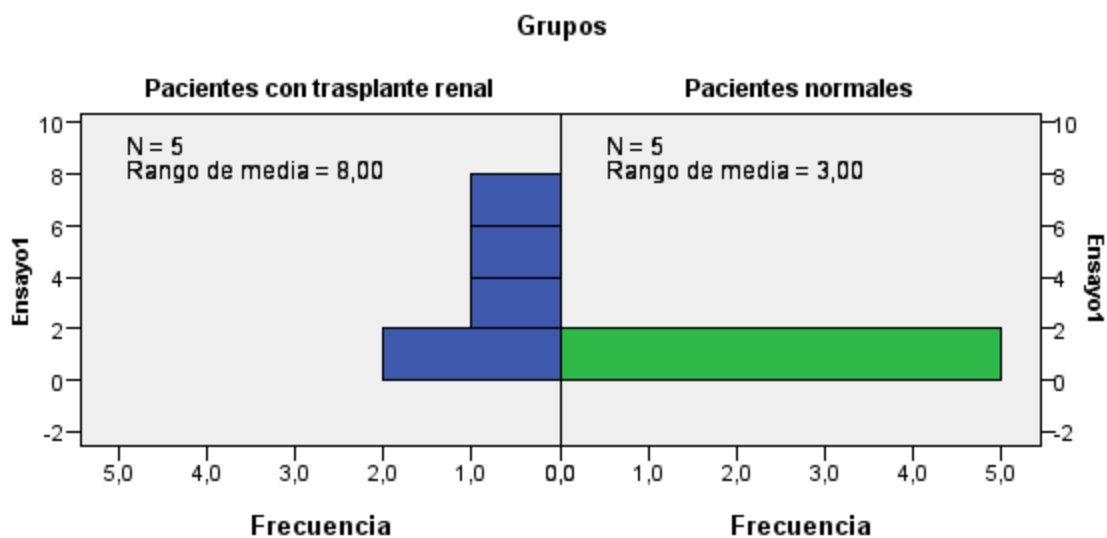


Figura 26. Distribución de las varianzas por rangos y frecuencias para el ensayo #1 (Prueba de U de Mann-Whitney).

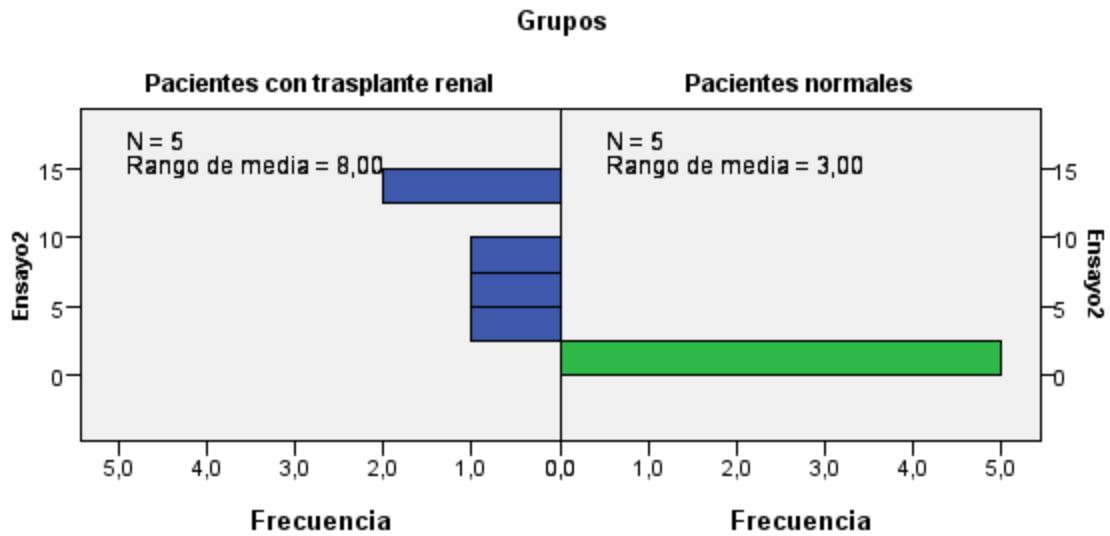


Figura 27. Distribución de las varianzas por rangos y frecuencias para el ensayo #2 (Prueba de U de Mann-Whitney).

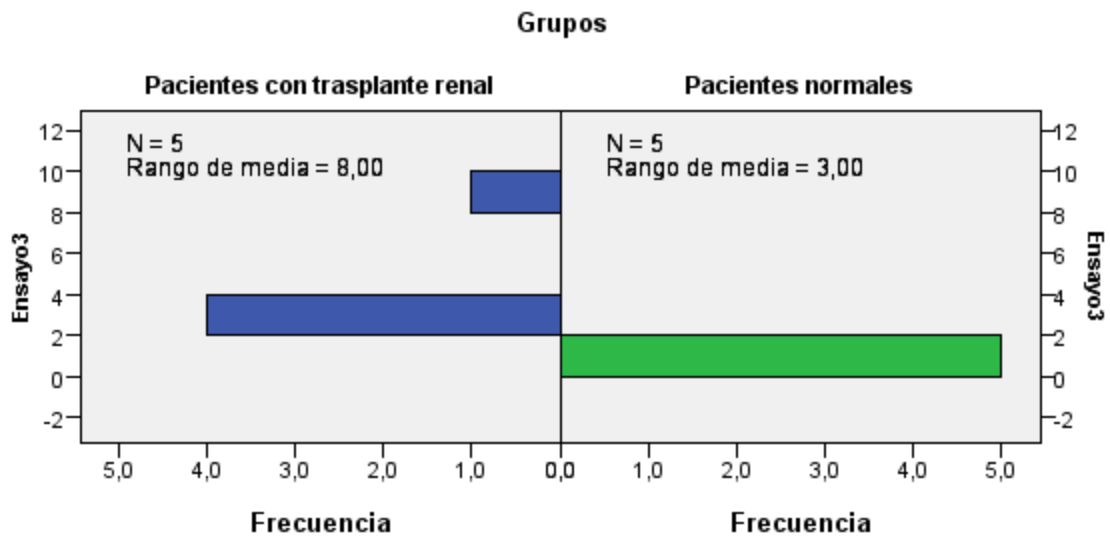


Figura 28. Distribución de las varianzas por rangos y frecuencias para el ensayo #3 (Prueba de U de Mann-Whitney).

Para analizar la varianza inter-ensayos utilizamos la prueba de Friedman, que nos permitió visualizar que las distribuciones entre ensayos no son las mismas ($p = 0.007$) (Figura 29).

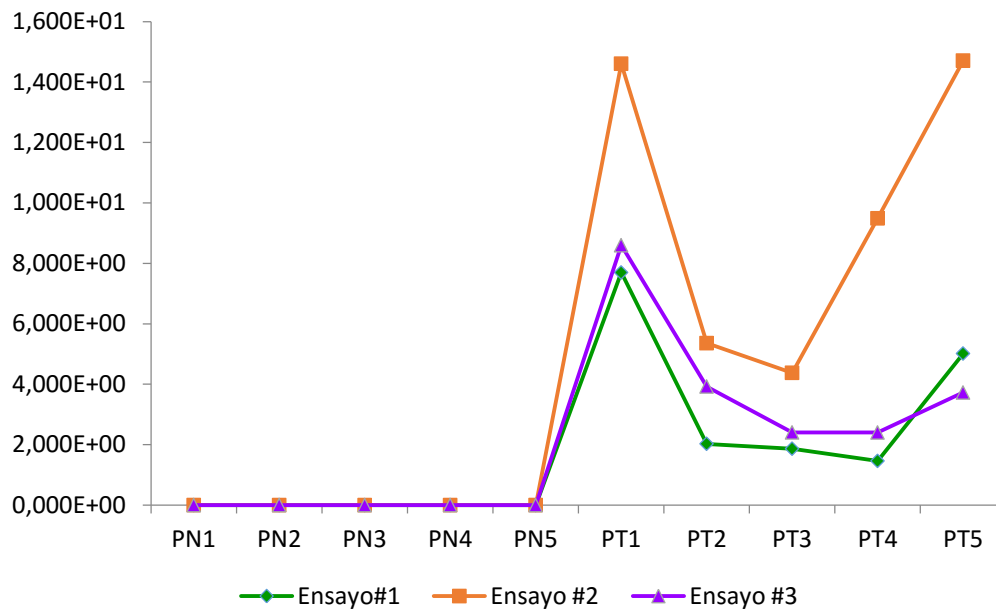


Figura 29. Cuantificación relativa de la expresión génica de los pacientes por cada ensayo.

CAPÍTULO V

5. DISCUSIÓN

Según las especificaciones del fabricante, el equipo MagPurix, extrae tanto DNA como RNA de los grupos celulares presentes en la muestra, de los cuales solo el 10% representa el RNA total. A pesar de toda la información descrita en los manuales de (ZINEXTS LIFE SCIENCE CORP., 2016) para el equipo MagPurix y del bajo porcentaje de extracción que ofrece el protocolo, la cantidad de RNA extraído fue la adecuada para su aplicación en los sistemas.

A pesar de las purezas obtenidas con el método de purificación de RNA, TURBO DNAsa con fenol/cloroformo (1:1), el protocolo tiene una duración promedio de 3 horas en comparación con la TURBO DNAsa-free kit, con duración de una hora, al igual que se compararon métodos similares en el trabajo de Fanson y colaboradores (2000), se recomienda el uso del kit comercial. Además, para aplicar el protocolo de una manera adecuada, es necesario que la persona que realice el método (personal técnico) posea experiencia ya que el procedimiento es complejo y los reactivos usados tienen un grado medio de toxicidad.

En el estudio realizado por Suthanthiran y colaboradores (2013) concluyeron que un panel con los biomarcadores *18S rRNA*, *CD3e mRNA* e *IP10 mRNA* serviría como método de pronóstico temprano para detectar rechazo agudo en pacientes con trasplante renal. En éste trabajo se verificó que los pacientes de trasplante expresan en mayor medida el biomarcador *18S rRNA* en comparación con los que no habían sido trasplantados. En el biomarcador *CD3e mRNA* se ve claramente que la expresión se sesga únicamente a

los pacientes de trasplante mientras que en los normales no existe expresión como se observó en las figuras 16 y 17.

El marcador *18S rRNA* además de ser un biomarcador de referencia, podría ser utilizado como un biomarcador de diagnóstico, ya que la expresión de *18S rRNA* es menor cuando la muestra posee gran cantidad de células diferenciadas, como son las células renales tubulares cuya presencia se evidencia en muestras normales. Pero aumenta cuando los grupos celulares presentes son de linfocitos T reactivos como se demuestra en el estudio de Suthanthiran y colaboradores (2013) y en el presente trabajo. La presencia de linfocitos T reactivos se da en procesos inflamatorios.

Como se pudo observar en las tablas 5 y 6, los datos de los Ct promedios de los pacientes tanto normales como de trasplante en el biomarcador *18S rRNA* tienen una tendencia descendente del primer ensayo al tercero. Esto se podría deber a que las muestras al ser descongeladas sufren pérdida de eluyente por evaporación, lo que quiere decir que el material genético se concentra, por eso la expresión se da en ciclos más tempranos en los ensayos 2 y 3.

Sin embargo, para el marcador *CD3e mRNA* la tendencia es diferente. En el segundo ensayo se verifica que los Ct promedios descienden tanto en los pacientes con trasplante y sin él, lo que quiere decir, que con respecto al ensayo 1, se expresan en ciclos más tempranos. Se esperaba que en el ensayo 3, al igual que para el biomarcador *18S rRNA* en el ensayo 3, la amplificación sea en ciclos más tempranos en comparación a los dos primeros ensayos. Pero lo que se obtuvo en su lugar fue que la amplificación se dio en ciclos más tardíos, es decir, el promedio de los Ct aumentaron cuando esperábamos que disminuyeran. Éste resultado se podría deber a un sobrecalentamiento del equipo utilizado para la RT-qPCR en pacientes, ya que los tres ensayos se realizaron el mismo día.

Para el cálculo de las eficiencias de amplificación de los biomarcadores, se empleó una regresión lineal para cada uno. Dónde se calculó la ecuación de la recta, para obtener la pendiente de cada gráfico (Figuras 24-25), dato con el cual se calcula la eficiencia expresada en porcentaje. Para obtener una eficiencia del 100%, la pendiente debe ser igual a -3.33. Los valores obtenidos para la pendiente de *18S rRNA* y *CD3e mRNA* fueron -4.044 y -4.32 respectivamente. Según Applied Biosystems (2008), cuando los valores de pendiente son más negativos, como sucedió en éste estudio, significa que existe una pérdida de especificidad con el incremento de la masa de RNA. A medida que se aleja del valor, la eficiencia de amplificación baja; el resultado de amplificación obtenido se podría deber a este motivo.

Para evaluar la variabilidad intra ensayos se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney, que es un método estadístico no paramétrico. Como podemos ver en las figuras 26, 27 y 28, existen diferencias significativas entre los datos de pacientes con y sin trasplante. De igual forma se puede observar que en los ensayos 1, 2 y 3; dentro del grupo de los pacientes de trasplante se establecen rangos agrupados y rangos separados. En la figura 26 que corresponde al ensayo #1, se ven cuatro rangos agrupados; mientras que en la figura 27 correspondiente al ensayo #2, se observan cuatro rangos, tres agrupados y uno separado. Por otro lado, en la figura 28 que corresponde al ensayo #3, se observaron dos rangos separados. Por lo tanto, la distribución de los ensayos no es la misma a pesar de que las muestras si lo son. La adherencia o separación de estos rangos se debe a la separación que existe de un dato a otro (Figura 29). La diferencia entre el ensayo #1 y el ensayo #2 se podría deber a que se homogenizó mejor las muestras, mientras que las diferencias entre el ensayo #2 y el ensayo #3 se debió principalmente a la degradación de las muestras.

CAPÍTULO VI

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. CONCLUSIONES

- Se demostró que el biomarcador de estudio (*CD3e mRNA*) se expresa en pacientes que han tenido cirugía de trasplante renal mas no en pacientes que no han sido trasplantados. Mientras que el biomarcador de referencia usado en éste estudio se expresa tanto en pacientes trasplantados como en pacientes sin trasplante.

- Gracias a la versatilidad del biomarcador *18S rRNA* usado como marcador de referencia en éste estudio, se pudo optimizar ambos marcadores bajo las mismas condiciones. Se usó el mismo programa de termociclado y las mismas concentraciones en los componentes de reacción.

- Se observó que la temperatura influye en la aparición de productos inespecíficos y contaminación. En el proceso de termociclado para tiempo real se modificó la temperatura optimizada en la PCR convencional subiéndole 2°C a cada biomarcador evitando así que el control negativo amplifique en ciclos tempranos debido a que la RT-qPCR es un método más sensible.

- Para obtener resultados óptimos, la muestra debe ser necesariamente la primera orina de la mañana, descartando el primer chorro para evitar contaminación bacteriana, ya que éstas se encuentran concentradas. Si se toma la muestra en otro

momento, se corre el riesgo de que se encuentren muy diluidas y no se pueda obtener suficiente cantidad de material genético.

- Los protocolos para la extracción y purificación de RNA de sangre y orina tienen modificaciones para cada uno respectivamente debido a que ambos aunque son fluidos corporales, poseen diferente composición tanto química como biológica y requieren tratamientos diferentes.
- El proceso elegido para extraer RNA de muestras de orina de pacientes fue el automatizado con el equipo MagPurix ya que de éste modo, aunque se diseñó un método manual, se evita el error técnico en ésta fase. Además, el tiempo empleado gracias al equipo es menor y la cantidad de material genético obtenida es mayor.
- El uso del tiempo real como método diagnóstico para la expresión génica nos brinda mayor rango de detección en los ensayos y la visualización de resultados es más práctica y rápida que la PCR convencional.
- El RNA se conserva a -80°C , al ser descongelado se pierde gradualmente material genético y según el número de descongelaciones, se degrada. Por esto, las muestras de pacientes deben ser usadas inmediatamente o conservadas a -80°C sin sufrir más de dos descongelaciones.

- De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo de campo realizado, se comprobó que en el programa de termociclado utilizado, el número de ciclos no puede alterarse debido a que algunas muestras amplifican en ciclos superiores al 30, si el número de ciclos se disminuye, el sistema se vuelve menos sensible.

6.2. RECOMENDACIONES

- Se recomienda limpiar las cámaras de PCR con hipoclorito al 0.1%, sablón, alcohol 70%, deconex e irradiar de la cámara de flujo laminar con luz UV durante 15 minutos antes y después de usar la cámara para trabajar con los biomarcadores, especialmente con 18S rRNA ya que al ser un gen constitutivo existen varias fuentes de contaminación.
- Se recomienda, para el proyecto, optimizar todos los biomarcadores a la misma temperatura, ya que el objetivo es desarrollar una RT-qPCR multiplex y para esto es necesario que todos los biomarcadores funcionen a la misma temperatura.
- Se recomienda que en el proyecto, cuando se haga el estudio del panel de biomarcadores, se realice un seguimiento constante por un año a todos los pacientes post trasplante renal. Se debería tomar varias muestras de orina del mismo paciente en diferente tiempo para los ensayos y determinar los diferentes estadios de rechazo. Posterior a esto se debería establecer un control positivo para cada estadio del rechazo.

- Se recomienda optimizar los biomarcadores restantes que se usarán en el proyecto, en sangre total y probarlo posteriormente en orina con pacientes normales y de trasplante renal.

- Para el desarrollo del proyecto de un panel de biomarcadores, se recomienda buscar alternativas para el protocolo de purificación de RNA extraído de orina con el objetivo de que dure menos y se pueda optimizar el tiempo en el manejo de las muestras de pacientes de trasplante.

- En la fase del manejo de las muestras de orina, se recomienda procesarlas máximo 2 horas después de haber sido tomadas y, en la medida de lo posible, conservarlas a 4°C durante éste tiempo de espera.

- Se recomienda manejar por separado los controles negativos, prepararlos primero y luego de tenerlos preparados, cerrarlos y no volverlos a abrir para evitar contaminaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- A. B. (2010). Experimentos de cuantificación relativa y CT comparativos. *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System* .
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pober, J. S. (2000). *Cellular and Molecular immunology*. Philadelphia: W.B. SAUNDERS COMPANY.
- Ambion. (2012). *PureLink® RNA Mini Kit*. Life technologies.
- Ambion. (2012). *TURBO DNA-free™ Kit*. Life Technologies.
- Anglicheau, D., Muthukumar, T., Hummel, A., Ding, R., Sharma, V. K., Dadhania, D., . . . Suthanthiran, M. (2012). Discovery and Validation of a Molecular Signature for the Noninvasive Diagnosis of Human Renal Allograft Fibrosis. *Trasplantation*, 1136-1143.
- Applied Biosystems. (2008). *Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR*. California: Applied Biosystems AB.
- Applied Biosystems AB. (2010). *Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit*. Life Technologies.
- Beneito Castelló, I., & García Matínez, J. (2006). Diagnóstico del tratamiento y tratamiento del rechazo agudo en trasplante renal. En R. Vicente, & R. Montero, *Tratado de trasplantes de órganos* (Vol. 1). Madrid: ARÁN ediciones.
- Bennington, J. (2000). *Diccionario enciclopédico del laboratorio clínico*. Madrid: Medica Panamericana.
- Biosystems, A. (2010). *TaqMan® RNA-to-CT™ 1-Step*. Life Technologies.
- Biosystems, A. A. (2010). *Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit*. Life Technologies.
- CORP., Z. L. (2014). *MagPurix Extraction Kit Handbook*. London: Welkang Limited.
- Corvalán, A. (2002). Biología molecular en Infectología Parte I: Desarrollo y metodologías. *Revista chilena de infectología*, 0716-1018.

- De Serres, S. A., Mfarrej, B. G., Grafals, M., Riella, L. V., Magee, C. N., Yeung, M. Y., . . . Najafian, N. (2012). Derivation and Validation of a Cytokine-Based Assay to Screen for Acute Rejection in Renal Transplant Recipients. *Clin J Am Soc Nephrol*, 1018-1025.
- Delves, P., Martin, S., Burton, D., & Roitt, I. (2006). *Inmunología. Fundamentos*. Madrid: Medica Panamericana.
- Dorland, B. (2005). *Dorland Diccionario Enciclopédico Ilustrado de Medicina*. Madrid: Elsevier.
- Fanson, B., Osmack, P., & Di Bisceglie, A. (2000). A comparison between the phenol-chloroform method of RNA extraction and the QIAamp viral RNA kit in the extraction of hepatitis C and GB virus-C/hepatitis G viral RNA from serum. *J Virol Methods*, 23-27.
- FAO/OMS. (2004). *Caracterización de peligros de patógenos en los alimentos y el agua: directrices*. Roma: Organización mundial de la salud.
- Freifelder, D. (2003). *Técnicas de bioquímica y biología molecular*. Barcelona: Reverté.
- García de Jalón Martínez, Á., Pascual Regueiro, D., Trávez Boned, M., Sancho Serrano, C., Mallén Mateo, E., Gil Martínez, P., . . . Rioja Sanz, L. (2003). TRANSPLANTE RENAL. TÉCNICA Y COMPLICACIONES. *Actas Urológicas Españolas*, 622-677.
- Goldman, L., & Schafer, A. (2013). *Tratado de medicina interna* (24 ed., Vol. 1). Barcelona, España: ELSEVIER.
- Guillermo, R. (2009). *Fundamentos De Hematología*. Mexico: Medica Panamericana.
- Hall, C., Berkhout, B., Alarcon, B., Sancho, J., Wileman, T., & Terhorst, C. (1991). Requirements for cell surface expression of the human TCR/CD3 complex in non-T cells. *Int Immunol*, 359-68.
- Hall, C., Berkhout, B., Alarcon, B., Sancho, J., Wileman, T., & Terhorst, C. (1991). Requirements for cell surface expression of the human TCR/CD3 complex in non-T cells. *Int Immunol*, 359-68.

- Hartono, C., Muthukumar, T., & Suthanthiran, M. (2010). Noninvasive Diagnosis of Acute Rejection of Renal Allografts. *Current opinion in organ trasplantation*, 35-41.
- Hernández, C. (2003). *Respuesta de la salud pública a las armas biológicas y químicas. Guia de la OMS*. Ginebra: Organización mundial de la salud.
- Humphreys, B. D., Xu, F., Sabbiseti, V., Grgic, I., Movahedi Naini, S., Wang, N., . . . Andrew P. McMahon, V. (2013). Chronic epithelial kidney injury molecule-1 expression causes murine kidney fibrosis. *Andrew P. McMahon,2,9,10,11 Vijay K. Kuchroo,6 and Joseph V. Bonventre1, 123(9)*.
- Invitrogen. (2011). *SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq*. Life technologies.
- Jimenez, F., & Merchant, H. (2003). *Biologia Celular Y Molecular*. Mexico: PEARSON EDUCACION.
- Kent, M. (2003). *DICCIONARIO OXFORD DE MEDICINA Y CIENCIAS DEL DEPORTE*. Barcelona: Editorial Paidotribo.
- Lewis, B. (1996). *GENES* (2da. Edición ed., Vol. I). Barcelona: EDITORIAL REVERTE, S.A.
- Martinez Córdova, Z., Calzadilla Lugo, F., & Artiles Valor, A. (2009). Papel de los polimorfismos genéticos de los receptores de peaje (Toll- R) en la enfermedad y en el trasplante. *Bioquimia*, 83-94.
- Merrikhi, A., Gheissari, A., & Mousazadeh, H. (2014). Urine and serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin cut-off point for the prediction of acute kidney injury. *Advanced biomedical research*, 66.
- Mosquera Reboredo, J., & Vázquez Martul, E. (2011). Criterios diagnósticos de rechazo mediado por anticuerpos en el trasplante renal. *Nefrologia*, 382-391.
- Müller, W. (2008). *Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida*. Barcelona: Reverté.

- Muthukumar, T., Dadhania, D., Ding, R., Snopkowski, C., Naqvi, R., Lee, J. B., . . . Suthanthiran, M. (2005). *Messenger RNA for FOXP3 in the Urine of Renal-Allograft Recipients*. Massachusetts: The New England Journal of Medicine.
- Ortega, F., Arias, M., Jampistol, J., Matesanz, R., & Morales, J. (2007). *Trasplante renal*. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana.
- Paris, S., & Garcia, L. (1989). El complejo mayor de histocompatibilidad humano. Sistema HLA. *IATREIA*, 137-155.
- Parrilla, P., Ramírez, P., & Ríos, A. (2008). *Manual sobre donación y trasplante de órganos*. Madrid: ARÁN ediciones.
- Pfaffl, M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. *International University Line (IUL)*, 87 - 112.
- Pierce, B. A. (2009). *GENETICS: A CONCEPTUAL APPROACH*. New York: W.H. FREEMAN AND COMPANY.
- Roca, P., Oliver, J., & Rodriguez, A. M. (2003). *Bioquímica técnicas y métodos*. España: Hélice.
- Ross, M. H., & Wojciech, P. (2008). *Histologia*. Buenos Aires: Medica Panamericana.
- Shilbayeh, S., Zmeili, R., & Almardini, R. I. (2013). The impact of CYP3A5 and MDR1 Polymorphisms on Tacrolimus Dosage Requirements and Trough Concentrations in Pediatric Renal Transplant Recipients. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*, 1125-1136.
- Sommers, C., Dejarnette, J., Kun, H., Jan, L., El-Khoury, D., Shores, E., & Lovea, P. (2000). Function of Cd3ε-Mediated Signals in T Cell Development. *J Exp Med*, 913-920.
- Staff, M. (2005). *Diccionario Mosby pocket de medicina, enfermería y ciencias de la salud*. Madrid: Elsevier.
- Sunnucks, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Elsevier Science Ltd.*, 15(9).

- Suthanthiran, M., Schwartz, J. E., Ding, R., Abecassis, M., Dadhania, D., Samstein, B., . . . Shaked, A. (2013). Urinary-cell mRNA profile and acute cellular rejection in kidney allografts. *N Engl J Med*, 20-31.
- Suthanthiran, M., Schwartz, J. E., Ding, R., Abecassis, M., Dadhania, D., Samstein, B., . . . Hoang, C. (2013). Urinary-Cell mRNA Profile and Acute Cellular Rejection in Kidney Allografts. *The new Journal of medicine*, 20-31.
- Ting, Y.-T., Coates, T., Walker, R. J., & Mclellan, A. D. (2012). Urinary tubular biomarkers as potential early predictors of renal allograft rejection. *NEPHROLOGY*, 11-16.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*. Buenos Aires: Medica panamericana.
- Vázquez Martul, E., & Veiga Barreiro, J. (2002). Patología del trasplante renal Importancia de la biopsia en la correlación clinico-patológica. *Revista española de Patología*, 279-294.
- Vélez, H., Rojas, W., Borrero, J., & Restrepo, J. (2003). *Nefrología*. Medellín: CIB.
- Venado, A., Moreno, J. A., Rodriguez, M., & López, M. (2009). *INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA*. Mexico: UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
- Wein, I. J., Kavoussi, L. R., Novick, A. C., & Partin, A. W. (2008). *Campbell-Walsh Urologia*. Buenos Aires: Medica Panamericana.
- Wong, M., & Medrano, J. (2005). Real-Time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 75-85.
- Zabala Castro, J. (2005). *Manual de técnicas básicas de biología molecular*. Mérida: Universidad Autónoma de Yucatán.
- ZINEXTS LIFE SCIENCE CORP. (2016). *MagPurix Extraction Kit Handbook*. Londres: Welkang Limited .

ANEXOS

ANEXO 1

Tabla de cebadores y sondas para cada gen

RNA	Secuencia	Concentración	Locación
18S rRNA	Forward: 5'-GCCCCGAAGCGTTTACTTTGA-3'	50um	929-948
	Reverse: 5'-TCCATTATTCCTAGCTGCGGTATC-3'		1009-986
	Sonda: 5'-FAM-AAAGCAGGCCCGAGCCGCC-TAMRA-3'		965-983
CD3e mRNA	Forward: 5'-AAGAAATGGGTGGTATTACACAGACA-3'	50um	131-156
	Reverse: 5'-TGCCATAGTATTTTCAGATCCAGGAT-3'		233-209
	Sonda: 5'-FAM-CCATCTCTGGAACCCACAGTAATATTGACATGCC-TAMRA-3'		170-202

ANEXO 2

Protocolo de aislamiento de RNA a partir del pellet urinario con PureLink® RNA

Mini Kit

(Modificado en los laboratorios de Investigación de Biotecnología Humana de la
Universidad de las Fuerzas Armadas del Ecuador)

Lisis y Homogenización

- 1) Añadir 300 uL de Buffer de Lisis
- 2) Dar vortex a máxima velocidad hasta que la solución se encuentre homogénea
- 3) Homogenizar por pipeteo

Unión, lavado y elución

- 1) Añadir 300 ul de alcohol 70%
- 2) Mezclar mediante vortex
- 3) Transferir 700ul de la solución a la columna
- 4) Centrifugar a 14500 RPM por 30 segundos a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante y reinsertar la columna en el mismo tubo colector.
- 5) Añadir 650ul de Buffer de Lavado I a la columna y centrifugar a 14500 RPM por 15 segundos a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante y coloque la columna en un nuevo tubo colector.
- 6) Añadir 500ul de Buffer de Lavado II a la columna y centrifugar a 14500 RPM por 15 segundos. Descartar el sobrenadante.
- 7) Repetir el paso anterior.
- 8) Centrifugar a 14500 RPM por 2 minutos para secar la membrana. Descartar el sobrenadante y el tubo colector. Transferir la columna a un tubo de recuperación.

- 9) Añadir 30 ul de agua DEPC libre de RNAsas a la columna.
- 10) Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
- 11) Centrifugar a 14500 RPM a temperatura ambiente por 2 minutos.
- 12) Almacenar a -80°C

Importante: Es esencial mantener una cadena de frío durante todo el proceso.

ANEXO 3

Protocolo de purificación de RNA con TURBO DNAsa

1. Añadir el Buffer de turbo DNAsa 10X hasta llegar a una concentración 1X
2. Añadir 1ul de turbo DNAsa por cada 10ug de RNA en 50ul de reacción e incubar a 37°C por 30 minutos
3. Extraer el RNA por extracción Fenol/Cloroformo
4. Añadir 1:1 Fenol/Cloroformo en volumen igual al de la solución de RNA
5. Invertir varias veces e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos
6. Transferir la fase acuosa a nuevos tubos
7. Añadir 3M de Acetato de sodio en volumen 1/10 a la muestra de RNA
8. Añadir 2.5 volúmenes de etanol al 100%
9. Incubar a -20°C por 1h30
10. Centrifugar a máxima velocidad por 15 minutos a 4°C
11. Eliminar el sobrenadante y lavar 2 veces el pellet con etanol frío al 70% , centrifugar por 5 minutos a 7500 RPM
12. Secar el pellet
13. Re suspender el pellet en agua libre de RNAsas por 10 minutos a 60°C
14. Almacenar a -80°C

ANEXO 4

Protocolo de purificación de RNA con TURBO DNA-free™ Kit

(Ambion, TURBO DNA-free™ Kit, 2012)

1. Añadir el Buffer de TURBO DNAsa 10X en un volumen 0.1 y 1 uL de TURBO DNAsa
2. Incubar de 20-30 minutos a 37°C
3. Añadir el reactivo de inactivación a un volumen 0.1
4. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente
5. Centrifugar a 12500 RPM por 1.5 minutos y transferir a un nuevo tubo

ANEXO 5

Protocolo del sistema SuperScript[®] III One-Step RT-PCR con Platinum[®] Taq DNA Polymerasa

(Invitrogen, 2011)

Preparación del mix de reacción para la RT-PCR de punto final:

El siguiente cuadro, son los valores recomendados del kit para un volumen final de reacción de 50ul:

Component	Volume
2X Reaction Mix	25 µL
Template RNA (0.01 pg-1 µg)	x µL
Sense primer (10 µM)	1 µL
Anti-sense primer (10 µM)	1 µL
SuperScript [®] III RT/ Platinum [®] Taq Mix*	2 µL
Autoclaved distilled water	to 50 µL

Se modificaron los valores obteniéndose los siguientes valores para una reacción final de 12.5ul:

Componente	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen por reacción
Mix de reacción	2X	1X	25 uL
Primer forward	30uM	0.4 uM	0.156 uL
Primer reverse	30uM	0.4 uM	0.156 uL
SuperScript Taq RT/Platinum	---	---	0.5 uL
RNA	34 ng/uL		1 uL
Agua libre de RNAsas	---	...	4.41 uL
			12.5 uL

Programa de ciclado recomendado por la casa comercial para la RT-PCR:

Ciclado	Temperatura	Tiempo
Síntesis de cDNA		
1 ciclo	45-60°C	15-30 minutos
Denaturación		
1 ciclo	94°C	2 minutos
Amplificación de la PCR		
40 ciclos	94°C	15 segundos
	55-65°C	30 segundos
	68°C	1 minuto
Extensión final		
1 ciclo	68°C	5 minutos

Programa de ciclado modificado:

Ciclado	Temperatura	Tiempo
Síntesis de cDNA		
1 ciclo	55°C	5 minutos
Denaturación		
1 ciclo	94°C	4 minutos
Amplificación de la PCR		
40 ciclos	94°C	30 segundos
	61°C	1 minuto
	72°C	30 segundos
Extensión final		
1 ciclo	72°C	5 minutos

NOTA: Este protocolo fue aplicado tanto para CD3e mRNA como para 18S rRNA.

ANEXO 6

Protocolo para TaqMan® RNA-to-CT™ 1-Step Kit de Applied Biosystems

(Biosystems A. , 2010)

PASO 1:

Preparar el mix de reacción para la RT-PCR.

- a) Mezclar previamente los reactivos del kit. No crear burbujas.
- b) Centrifugar rápidamente el tubo TaqMan® RT Enzyme Mix (40X)
- c) Calcular el volumen de cada componente basado en el número de reacciones y el tipo de plato a usar.
- d) Después de que el mix esté listo, dar vortex rápidamente para mezclar las soluciones
- e) Centrifugar los tubos para tener el contenido al fondo y eliminar burbujas existentes en las soluciones

TABLA A

Componente	Volumen/reacción		
	384 platos	96 platos rápidos	96 platos estándar
TaqMan® RT-PCR Mix (2X)	0.25UI	0.5	1.25
TaqMan® RT Enzima Mix (40X)	5 uL	10	25
TaqMan® Ensayo de expresión génica	0.5	1	2.5
Template	Variable	Variable	Variable
Agua libre de RNAsas	Variable	Variable	Variable
Volumen total (uL)	10	20	50

- Volúmenes recomendados por el kit comercial

TABLA B

Componentes	Concentración inicial	Concentración final	Reacción 1 X
TaqMan® RT-PCR Mix	2X	1X	5uL
Primer Forward	10000nM	900nM	0.9uL
Primer Reverse	10000nM	900nM	0.9uL
SONDA	2000nM	200nM	1uL
TaqMan® RT Enzyme Mix	40X	4X	0.25uL
RNA	35ng/uL	3.5ng/uL	1uL
H2O	---	---	0.95uL
			10uL

- Mix de reacción usado en el presente trabajo.

PASO 2

Preparar el plato de reacción para la RT-PCR

- a) Transferir el volumen adecuado del mix de reacción a cada posillo

PASO 3

Programación de la RT-PCR

- a) Seleccionar el modo estándar
- b) Confirmar las condiciones de termo ciclado especificadas en la siguiente tabla:

TABLA C

Instrumento	Paso	Temperatura	Duración	Ciclos
StepOne™ StepOnePlus™ 7300 7500-7500 fast 7900	Paso de retrotranscripción (RT)	48	15 minutos	Contener
	Activación de la enzima	95	10 minutos	Contener
	Denaturación	95	15 segundos	40
	Alineamiento/ Extensión	60	1 minuto	

- Programa recomendado por el kit

TABLA D

Instrumento	Paso	Temperatura	Duración	Ciclos
AB Applied Biosystems	Paso de retrotranscripción (RT)	48	15 minutos	1
	Activación de la enzima	95	10 minutos	1
	Denaturación	94	30 segundos	40
	Alineamiento	63	1 minuto	
	Extensión	72	30 segundos	

- Programa usado en el presente trabajo

- c) En el documento seleccione la programación estándar y coloque el volumen de muestra correcto (10ul to 50ul)

PASO 4

- a) Analizar los resultados. El análisis de los datos varía dependiendo del instrumento.

Revise el manual de usuario de su instrumento.

ANEXO 7

Protocolo para Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit

(Biosystems A. A., 2010)

Preparación de las reacciones para la RT-PCR

1. Calcular el volumen necesario del componente basado en el volumen de reacción y el número de reacciones

TABLA A

Componente	Volumen para una reacción		
	10ul	20ul	50ul
Power SYBR® Green RT-PCR Mix (2X)	5ul	10ul	25ul
Primer forward	Variable	Variable	Variable
Primer reverse	Variable	Variable	Variable
Mix de enzima RT (125X)	0.08	0.16	0.4
RNA	Variable	Variable	Variable
Agua libre de RNAsas	Hasta 10 ul	Hasta 20 ul	Hasta 50 ul
Volumen total	10ul	20ul	50ul

- Volúmenes recomendados por el kit comercial

TABLA B

Componentes	Concentración inicial	Concentración final	Reacción 1 X
Power SYBR® Green RT-PCR Mix	2X	1X	5uL
Primer Forward	10000nM	900nM	0.9uL
Primer Reverse	10000nM	900nM	0.9uL
Mix de enzima RT	125X	3X	0.25uL
RNA	35ng/uL	3.5ng/uL	1uL
H2O	---	---	1.95uL
			10uL

- Mix de reacción usado en el presente trabajo.

2. Correr las reacciones para RT-PCR:

- Colocar el software en modo estándar
- Volumen de reacción: 10, 20 y 50 ul
- Condiciones del termociclador

TABLA C

Paso	Temperatura	Duración	Ciclos
Paso de retrotranscripción (RT)	48	30 minutos	1
Activación de la enzima	95	10 minutos	1
Denaturación	95	15 segundos	40
Alineamiento/Extensión	60	1 minuto	
Denaturación	95	15 segundos	Curva de melting
Alineamiento	60	15 segundos	
Denaturación	95	15 segundos	

- Programa recomendado por el kit

TABLA D

Paso	Temperatura	Duración	Ciclos
Paso de retrotranscripción (RT)	48	15 minutos	1
Activación de la enzima	95	10 minutos	1
Denaturación	94	30 segundos	40
Alineamiento/Extensión	63	1 minuto	
Extensión	72	30 segundos	
Denaturación	94	30 segundos	Curva de melting
Alineamiento	63	30 segundos	
Denaturación	94	30 segundos	

- Programa usado en el presente trabajo

Evaluación de los resultados:

El análisis de los datos varía dependiendo del instrumento. Revise el manual de usuario de su instrumento.