



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS-ESPE  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

**“Expresión de genes B-actina y GAPDH a partir de linfocitos  
del género de *Lama glama*”**

**Trabajo de integración curricular previo a la obtención del título de  
Ingeniera Biotecnóloga**

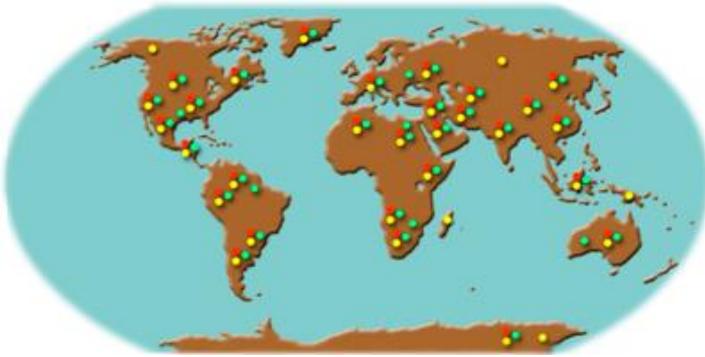
**Benavides Vera Odalys Jelissa**

Directora: Torres Arias, Marbel Ph.D

Sangolquí, Septiembre 2023



1	Introducción	
2	Justificación del problema	
3	Objetivos e Hipótesis	
4	Materiales y métodos	
5	Resultados y discusión	
6	Conclusiones	
7	Recomendaciones	

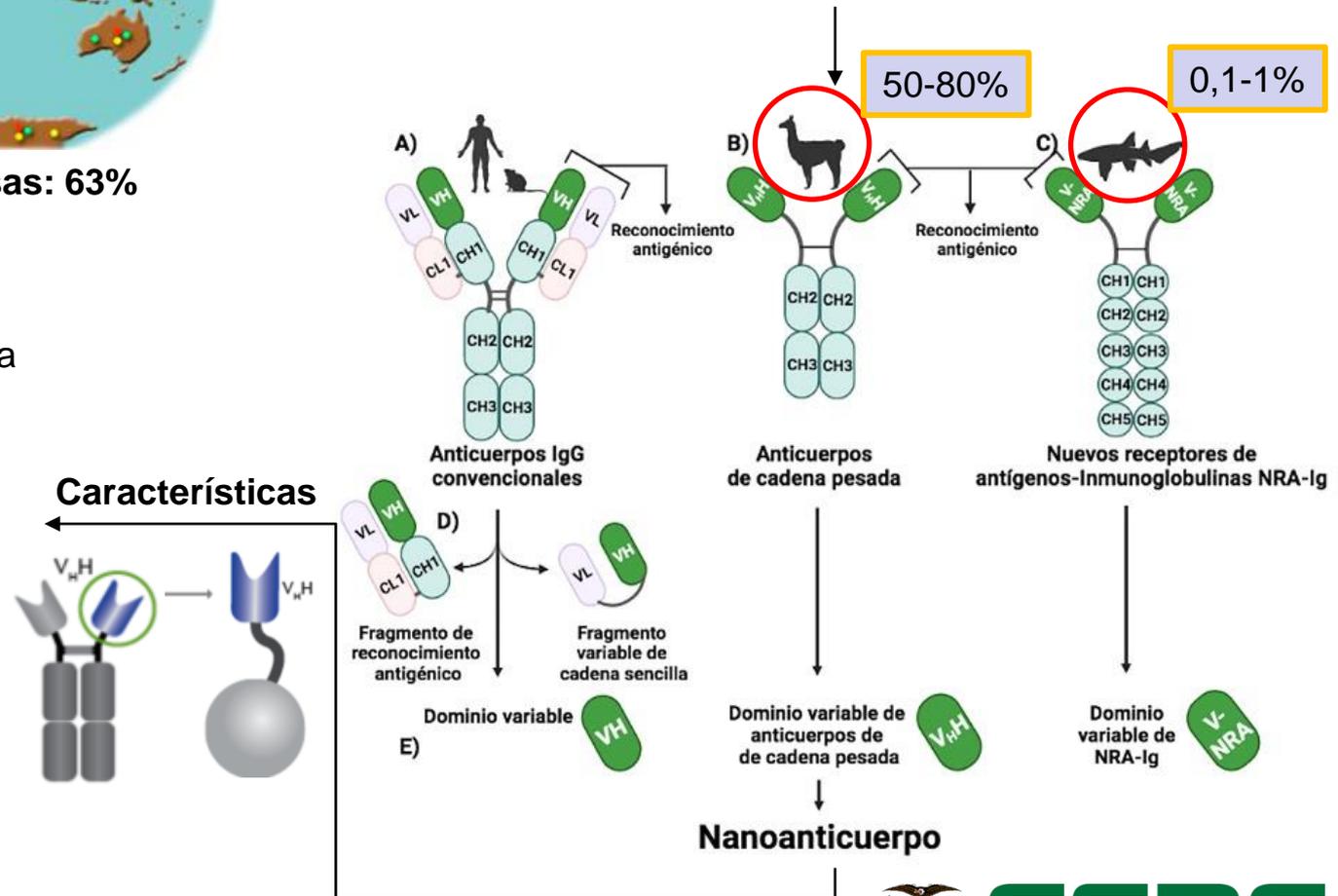


Enfermedades infecciosas: 63%

- ✓ Estructura robusta
- ✓ Peso molecular: 12-15 kDa
- ✓ Estabilidad: alta
- ✓ Especificidad: alta
- ✓ Biodisponibilidad
- ✓ Biocompatibilidad
- ✓ Costo de producción reducido

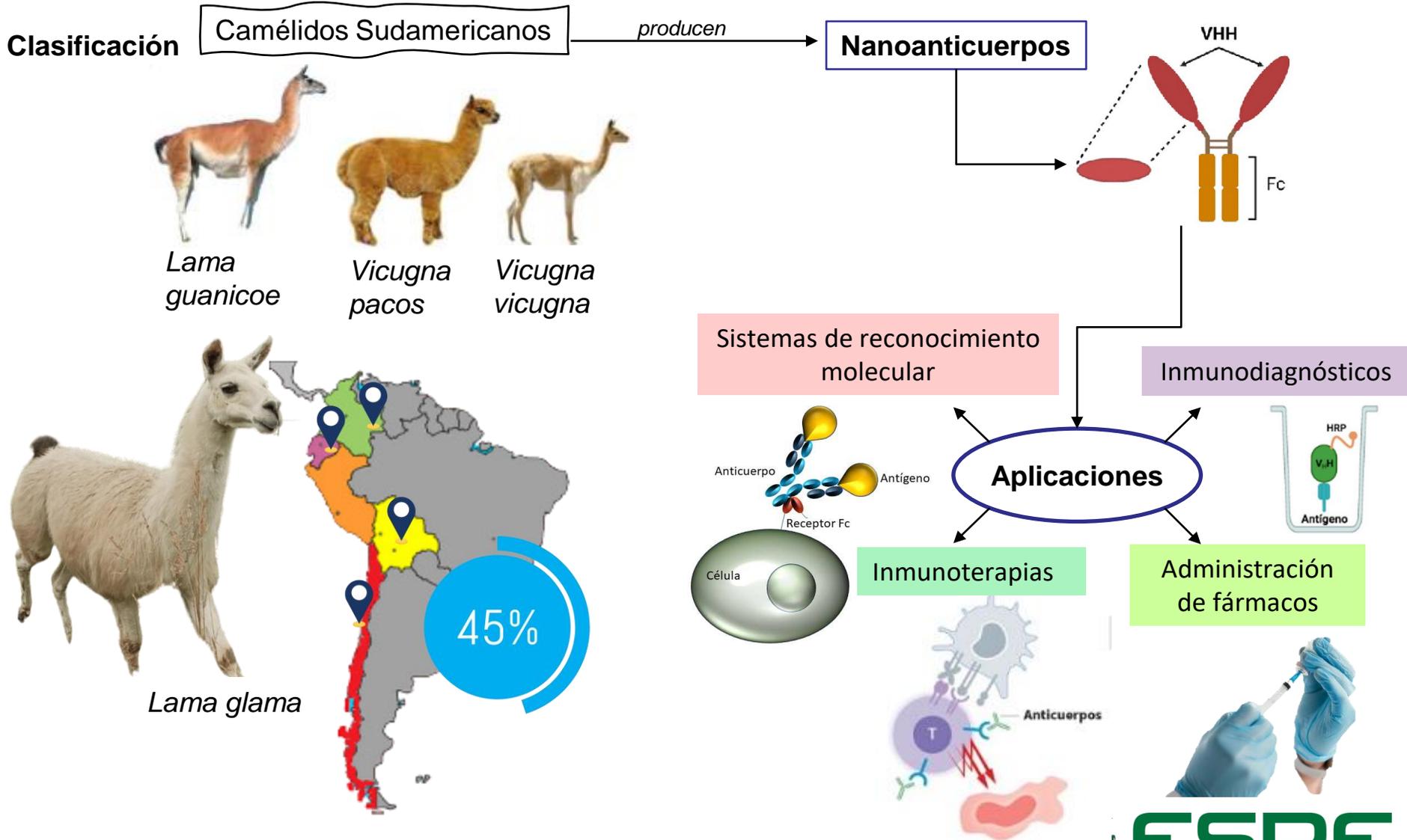
Estrategia terapéutica

Producción de nanoanticuerpos



# Lama glama y aplicación de nanoanticuerpos

## Introducción



## Estudios clínicos

→ **Enfermedad genética: Cáncer**

✓ **Detección**

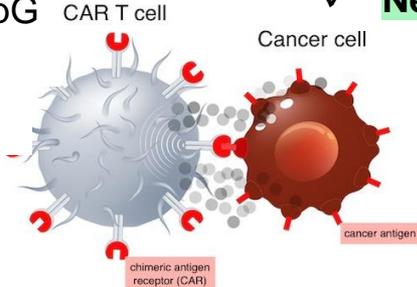
VHH contra AFP

✓ **Impedimento de su propagación**

CAPNb2/CapG

✓ **Reducir su frecuencia**

CAR-T



→ **Enfermedad por virus: Hepatitis C**

✓ **Inhibición de la replicación**

Serina proteasa VHH

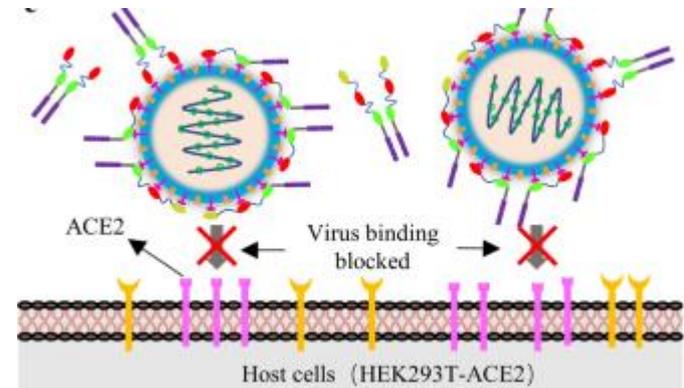
→ **Covid-19**

✓ **Neutralización del virus**

VHH afines a la proteína S del SARS-CoV-2

→ **Problema por bacteria: Diarrea causada por *Escherichia coli***

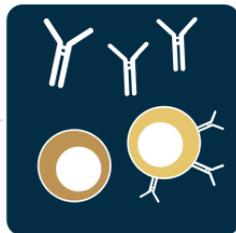
✓ **Vacuna anti-CfaE**



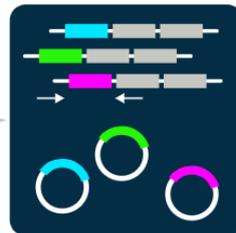
## Producción de nanoanticuerpos



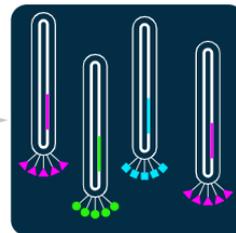
Immunizar a un camello



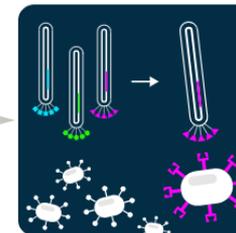
Extraer glóbulos blancos



Copiar genes para nanoanticuerpos, insertarlos en fagos



Generar fagos que expresen nanoanticuerpos

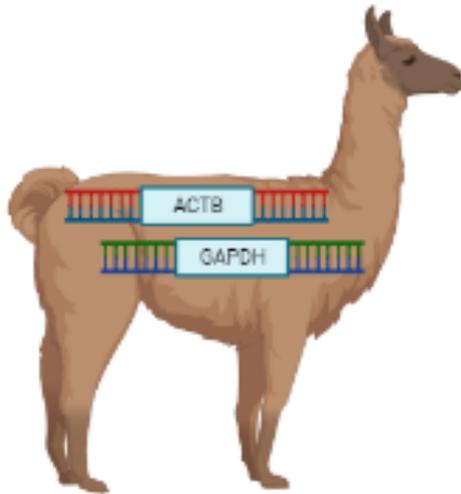


Tamizar en busca de los nanoanticuerpos deseados

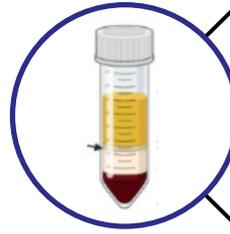


## Objetivo general

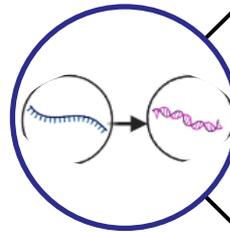
Expresar de forma génica a B-actina y GAPDH por el método de reacción de cadena de polimerasa cuantitativa (qPCR) a partir de linfocitos de *Lama glama* para el análisis de los niveles de expresión de los genes de interés.



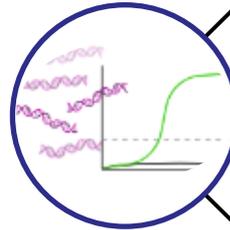
## Objetivo específicos



Obtener linfocitos mediante una diferenciación celular con el gradiente de densidad a partir de sangre periférica de *Lama glama* con el fin de obtener posteriormente ARNm codificador de los genes de interés.



Transformar ARN a ADNc mediante el proceso de transcripción reversa con la enzima “M-MLV Reverse Transcriptase” para usarse como plantilla de la amplificación por qPCR.

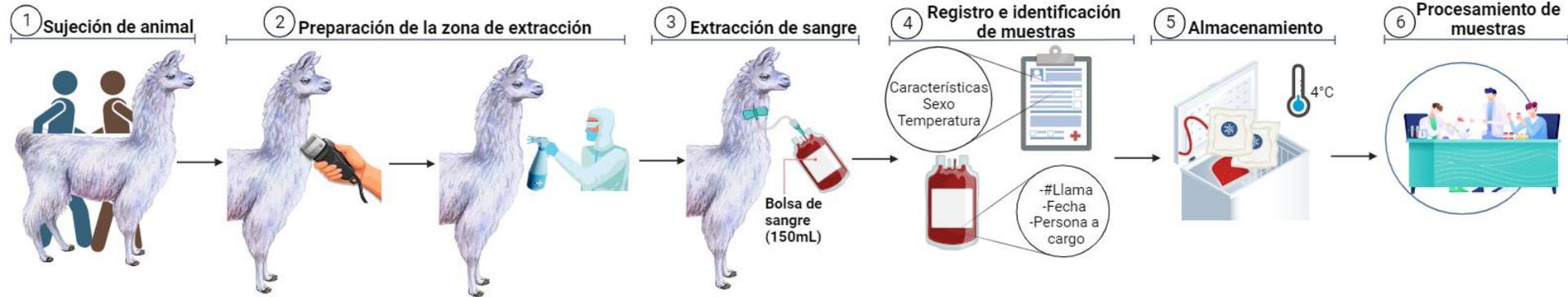


Analizar Delta ct mediante PCR cuantitativa (qPCR) a fin de verificar los niveles de expresión de los genes B-actina y GAPDH.

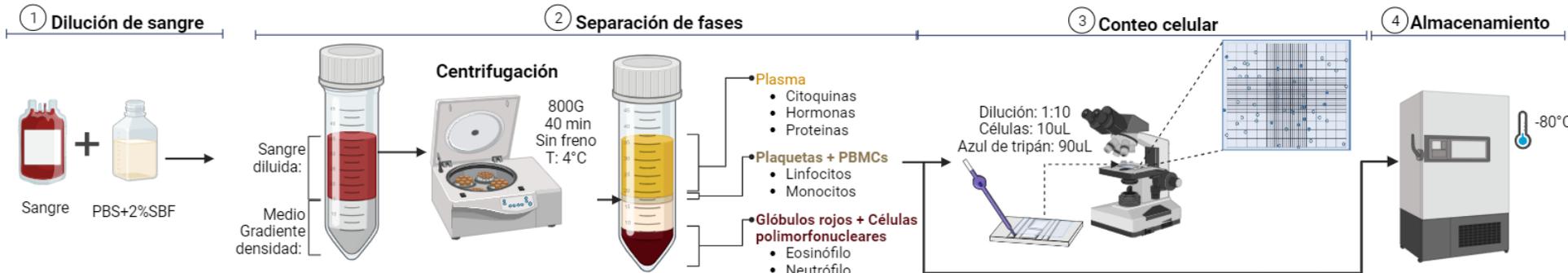
## Hipótesis

La especie *Lama glama* perteneciente a la familia Camelidae presentará una expresión génica positiva a B-actina y GAPDH a partir de la extracción de linfocitos.

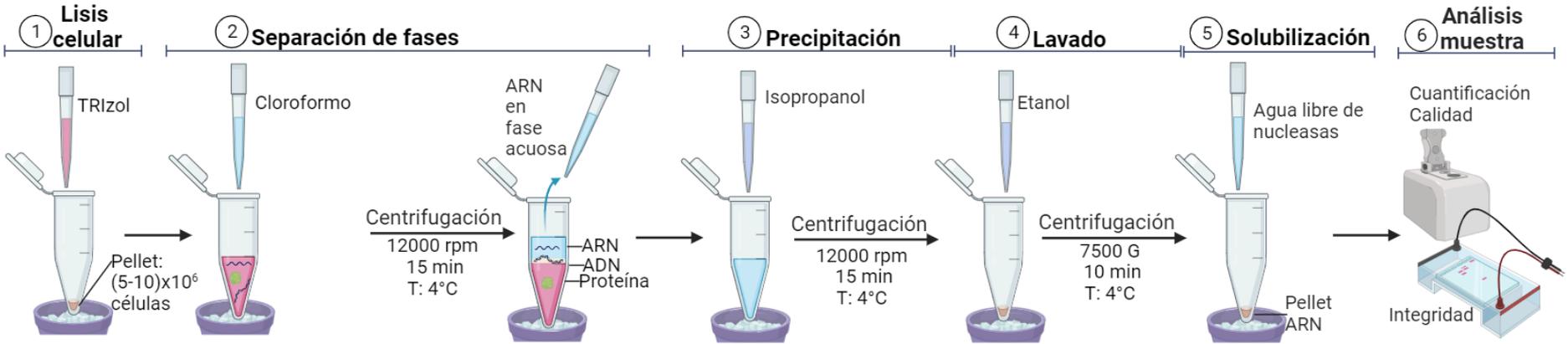
## Toma de muestra a partir de llama



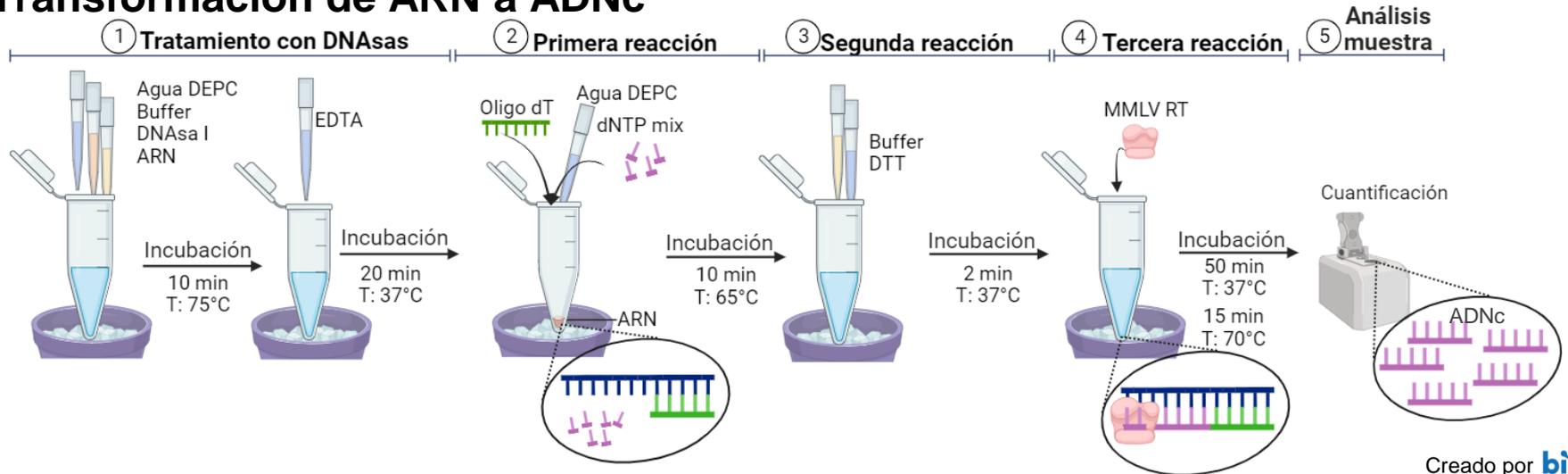
## Purificación y cuantificación de linfocitos



## Aislamiento de ARN a partir de linfocitos



## Transformación de ARN a ADNc



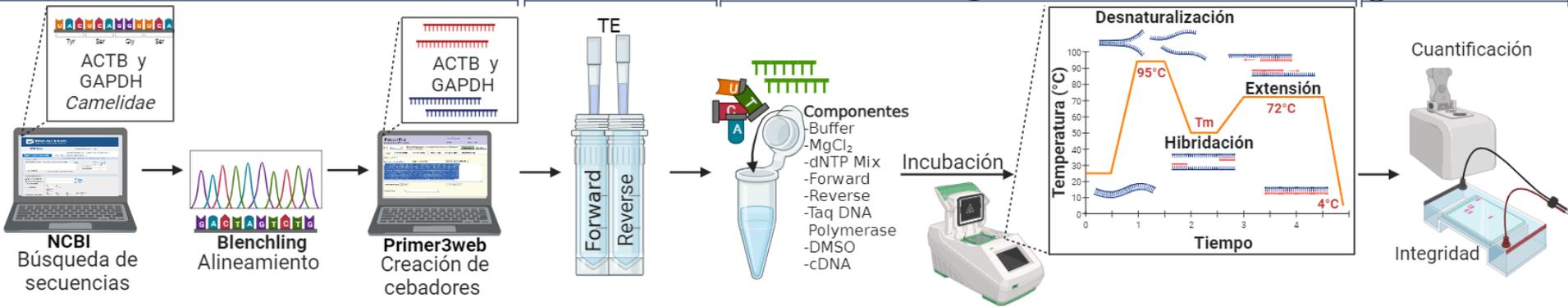
## Diseño de cebadores y PCR punto final

① Diseño de cebadores

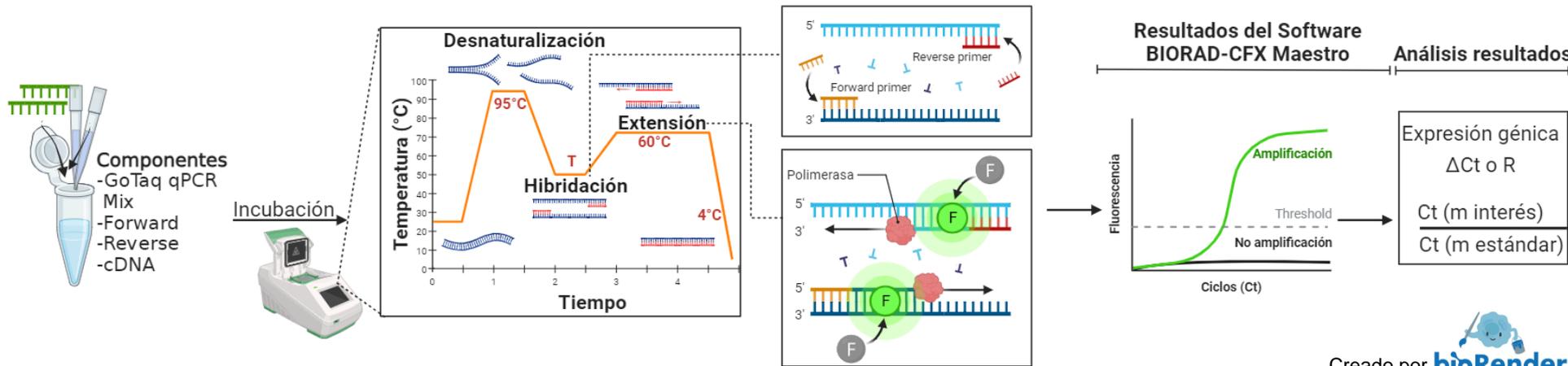
② Resuspensión

③ PCR

④ Análisis muestra



## Técnica RT-qPCR



Creado por bioRender

Análisis estadístico



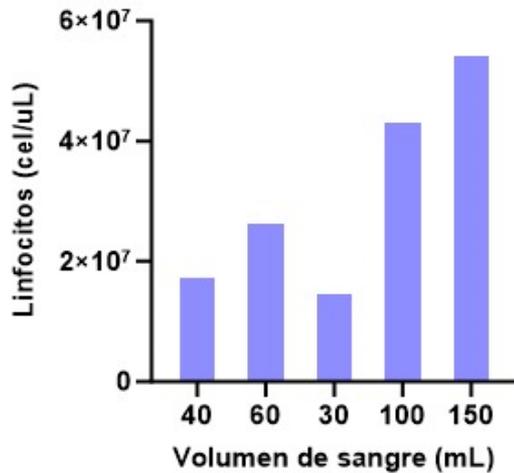
-T-test  
-ANOVA de dos vías



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

## Obtención de linfocitos a partir de sangre de llama

Número de linfocitos con respecto al volumen de sangre extraída



T-test (m. indep):  $\alpha=0,05$ ;  $p=0,0138$



Características de cada muestreo de llamas

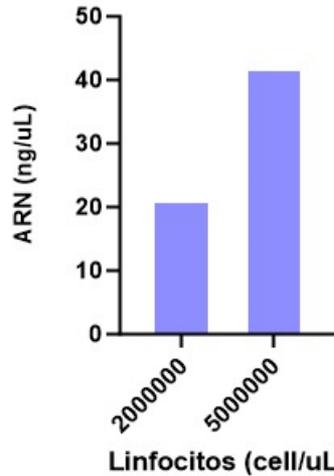
Volu men (mL)	Material de recolección de sangre	Anticoagulante
40	Tubos	Ácido etilendiaminotetracético (EDTA)
60		
30		
100	Bolsas de extracción de sangre	Citrato-Fosfato-Dextrosa-Adenina (C.P.D.A-1)
150		

Comparación de número de linfocitos entre especies de la familia Camelidae

<p>Linfocitos en <i>Lama glama</i> (150mL): <math>5 \times 10^7</math></p> 	<p>Linfocitos en <i>Vicugna pacos</i> (1L): <math>3,55</math> a <math>2,76 \times 10^8</math></p> <p>Linfocitos en alpaca (150mL): <math>4,14 \times 10^7</math></p> 
---	---

## Aislamiento de ARN a partir de linfocitos

Evaluación de ARN obtenido con respecto al número de linfocitos



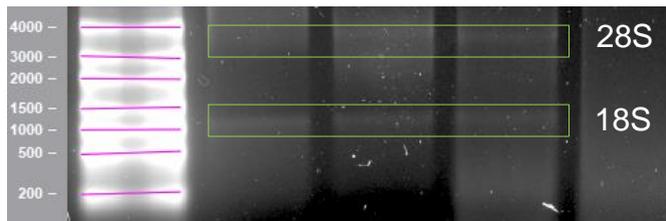
Calidad de ARN

260/280  
Ref:1,7-2,2  
1,98-2,23

T-test (m. indep):  $\alpha=0,05$ ;  $p<0,0001$



Integridad de ARN



Gel de agarosa al 2,5%

ImageLab

## Obtención de cDNA a partir de ARN (RT)

Cantidad de cDNA obtenido con respecto a diferentes concentraciones de RNA

RNA (ng/uL)	cDNA (ng/uL)
125	663,2
250	664,75
375	682,75
500	683,8

T-test (m. indep):  $\alpha=0,05$ ;  $p=0,123$



ARN > 100ng

Amplificación en la Retrotranscripción



## Diseño de cebadores para B-actina y GAPDH

Características de cebadores diseñados de los genes B-actina y GAPDH

GEN	Producto (pb)	Longitud (pb)	Secuencias 5'-3'		TM (°C)	GC (%)	ESPECIE
B-actina	151	20	F	GAAGATCTG GCACCACAC CT	59,6 7	55	Alineamiento múltiple 2 secuencias: <i>Lama Glama</i> y <i>Vicugna Pacos</i>
		20	R	GTACATGGCT GGGGTGTG A	59,9 6	55	
GAPDH	205	20	F	GTTTGTGATG GGCGTGAAC C	60,1	55	Secuencia consensus: <i>Camelus ferus</i> ; <i>Camelus bactrianus</i> ; <i>Vicugna pacos</i> ; <i>Camelus dromedarius</i>
		20	R	ATCACGCCA CATCTTCCCA G	60,2	50	

F: Forward; R: Reverse

**Condiciones de un diseño ideal de cebadores**

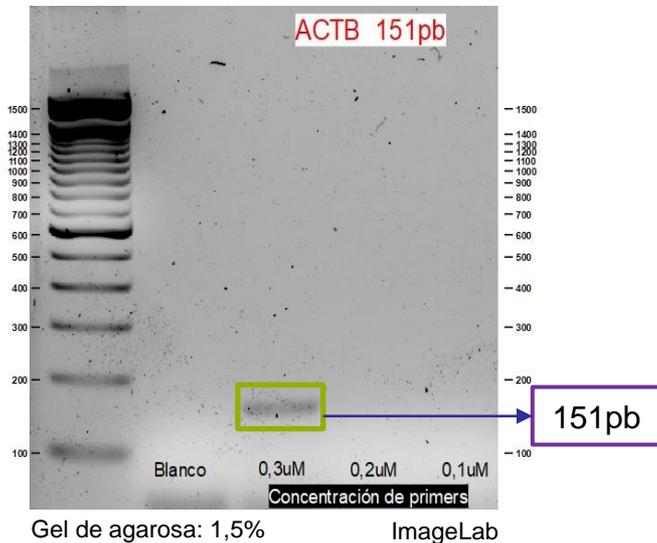
-%GC: 50-55%  
-Tm: 60°C  
-Amplicón: 130-200 pb  
-Cebador: 12-20 pb

**Genes constitutivos ACTB-GAPDH en camélidos**

-Estabilidad  
-Presencia en mayoría de mamíferos  
-Mayor consistencia génica

## Optimización de PCR punto final

Producto amplificado de PCR del gen B-actina en *Lama glama*



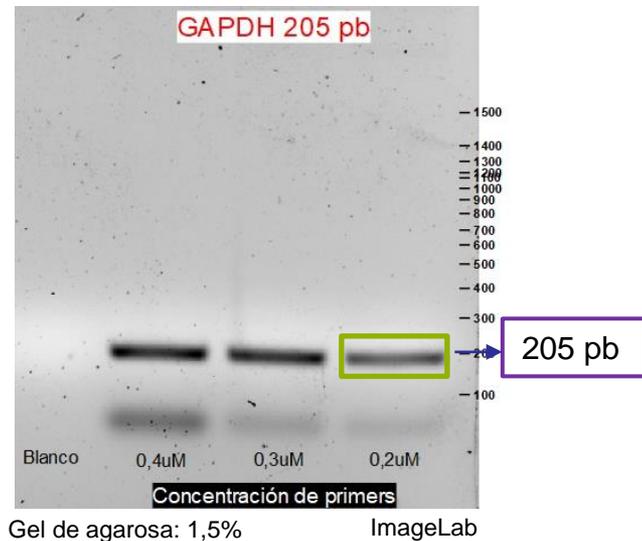
Componentes y concentraciones de PCR de B-actina

Componentes	Reacción 1X (uL)	Concentración inicial	Concentración final
PCR Buffer	2,5	10X	1X
MgCl <sub>2</sub>	0,75	50 mM	1,5 mM
dNTPS mix	0,5	10mM	0,2 mM
Taq DNA Polimerasa	0,1	5 U/uL	0,02 U/uL
Cebador Forward	0,75	10 uM	0,3 uM
Cebador Reverse	0,75	10 uM	0,3 uM
%DMSO	1,25	-	5%
Agua libre de nucleasas	16,4	-	-
Muestra de cDNA	2	100 ng/uL	200 ng/uL

Temperatura de hibridación: 62°C

## Optimización de PCR punto final

Producto amplificado de PCR del gen GAPDH en *Lama glama*



Componentes y concentraciones de PCR de GAPDH

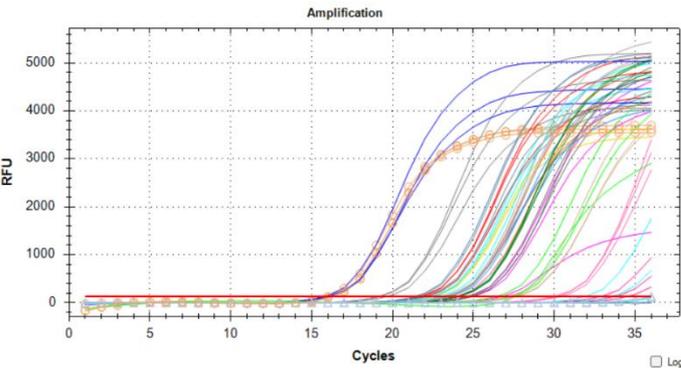
Componentes	Reacción 1X (uL)	Concentración inicial	Concentración final
PCR Buffer	2,5	10X	1X
MgCl <sub>2</sub>	0,75	50 mM	1,5 mM
dNTPS mix	0,5	10mM	0,2 mM
Taq DNA Polimerasa	0,1	5 U/uL	0,02 U/uL
Cebador Forward	0,75	10 uM	0,2 uM
Cebador Reverse	0,75	10 uM	0,2 uM
%DMSO	1,25	-	5%
Agua libre de nucleasas	16,4	-	-
Muestra de cDNA	2	100 ng/uL	200 ng/uL

Temperatura de hibridación: 60°C

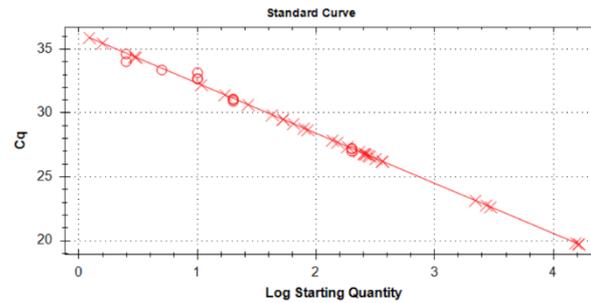
## RT-qPCR

### GEN B-actina

#### Curvas de amplificación

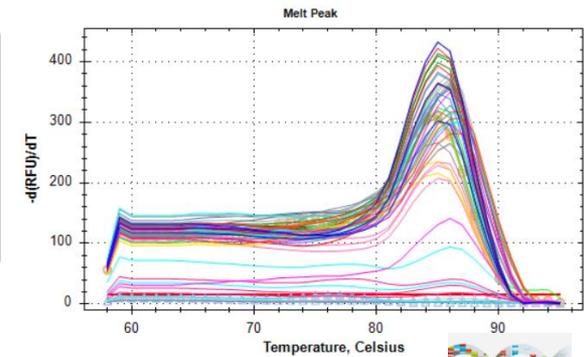


#### Curva estándar



Eficiencia: ~100%  
 $R^2$ : ~1  
Pendiente: ~-3

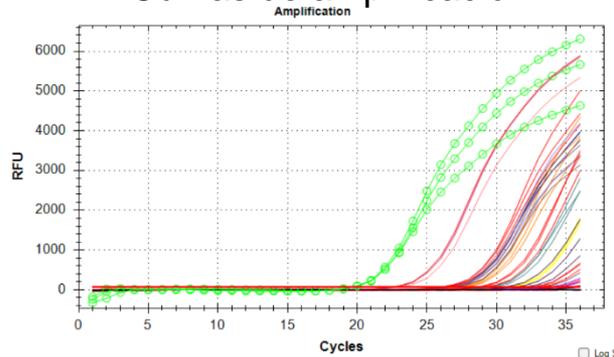
#### Curvas de Melting



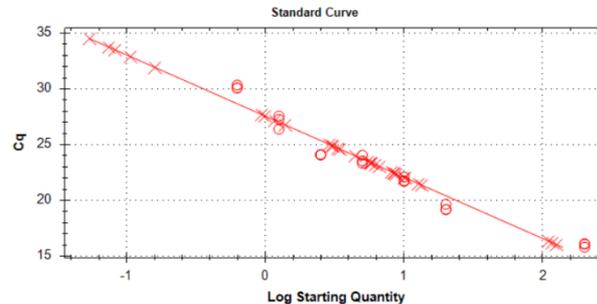
BIORAD-CFX  
Maestro

### GEN GAPDH

#### Curvas de amplificación

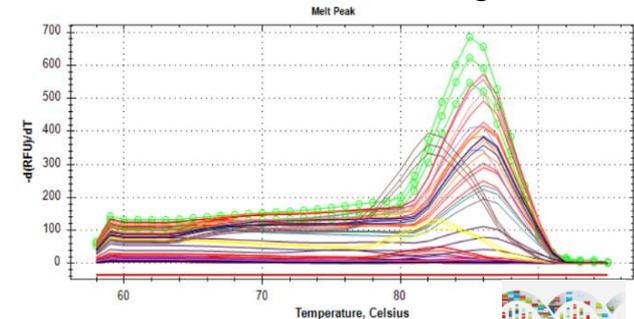


#### Curva estándar



Eficiencia: <100%  
 $R^2$ : ~1  
Pendiente: <-3

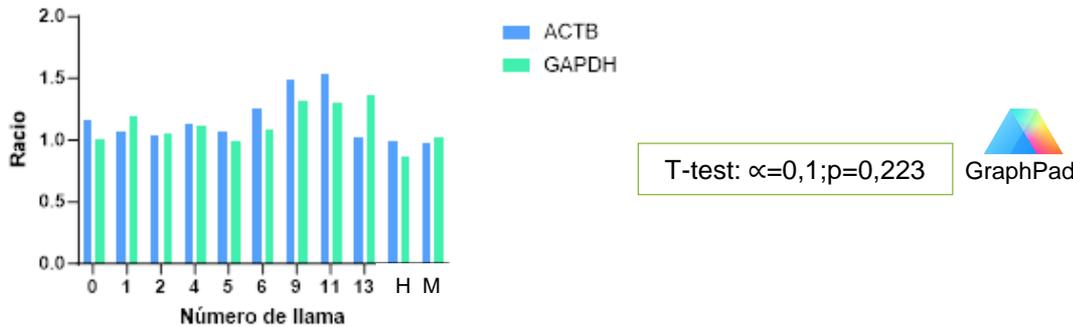
#### Curvas de Melting



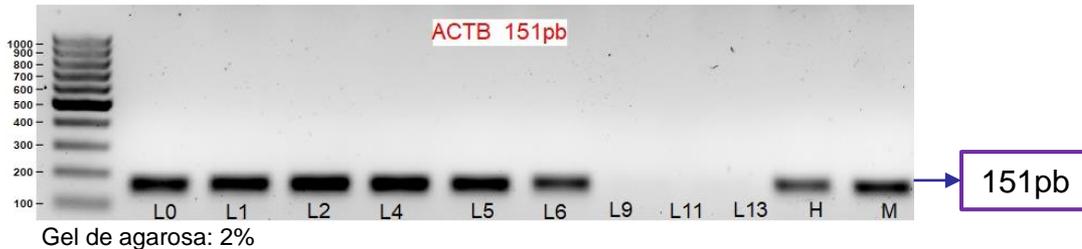
BIORAD-CFX  
Maestro

## Expresión génica

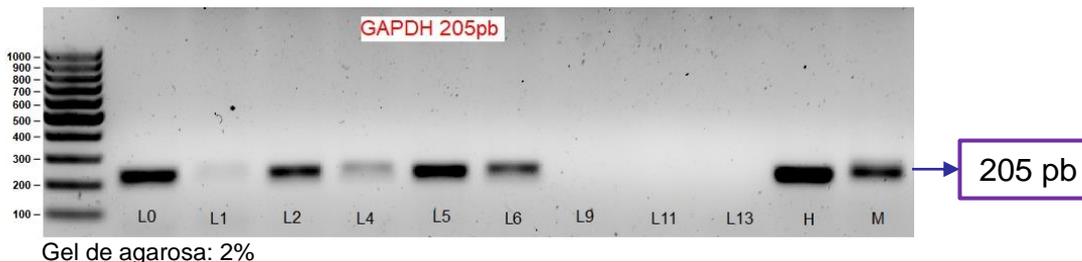
Niveles de expresión del gen B-actina y GAPDH en *Lama glama*



Producto amplificado de qPCR del gen B-actina en *Lama glama*

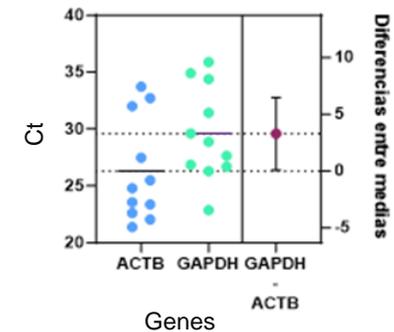


Producto amplificado de qPCR del gen GAPDH en *Lama glama*

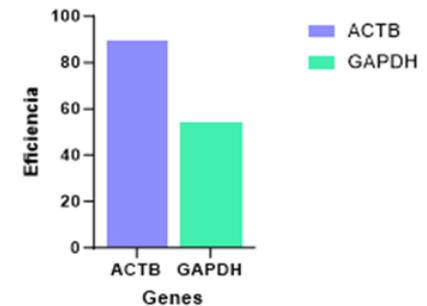


## Comparación de genes

Ciclo de cuantificación (Ct) de B-actina y GAPDH

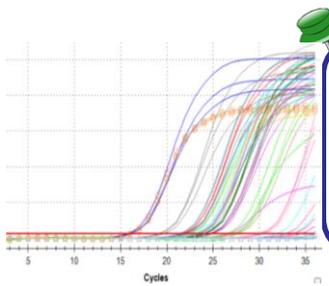
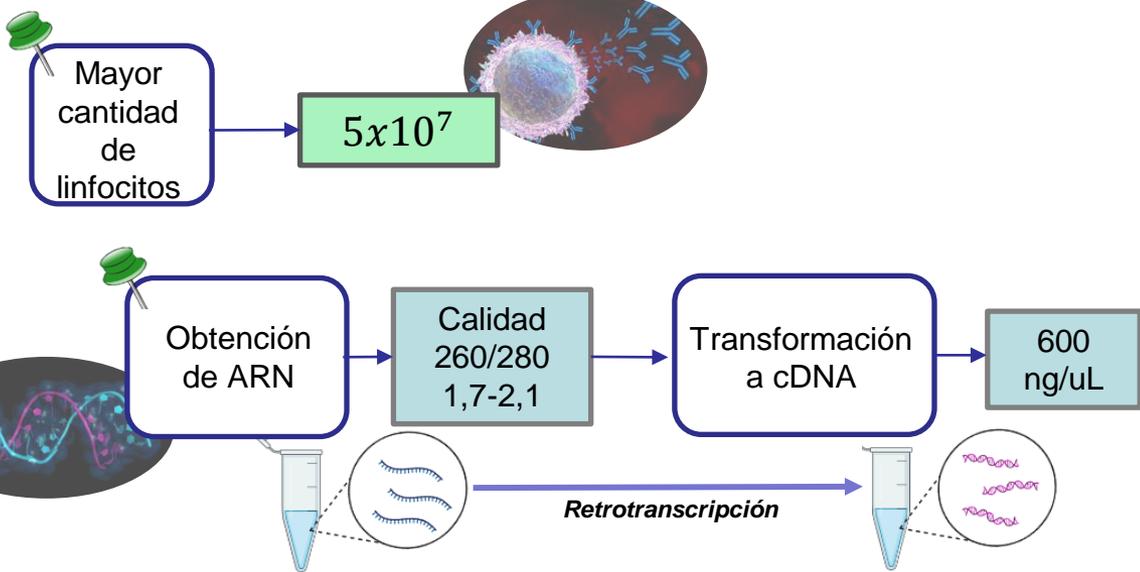


Eficiencia de la curva estándar de de B-actina y GAPDH



ANOVA de dos vías:  $\alpha=0,1; p=0,089$

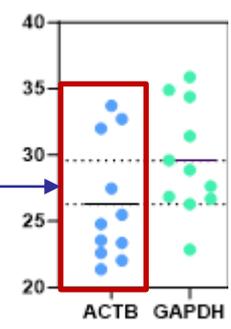
# Conclusiones



Evaluación de los niveles de expresión

- Racios: <1
- Ct: 21 a 36

Gen constitutivo más eficiente ( $\alpha=0,1; p=0,0898$ )



B-actina ✓

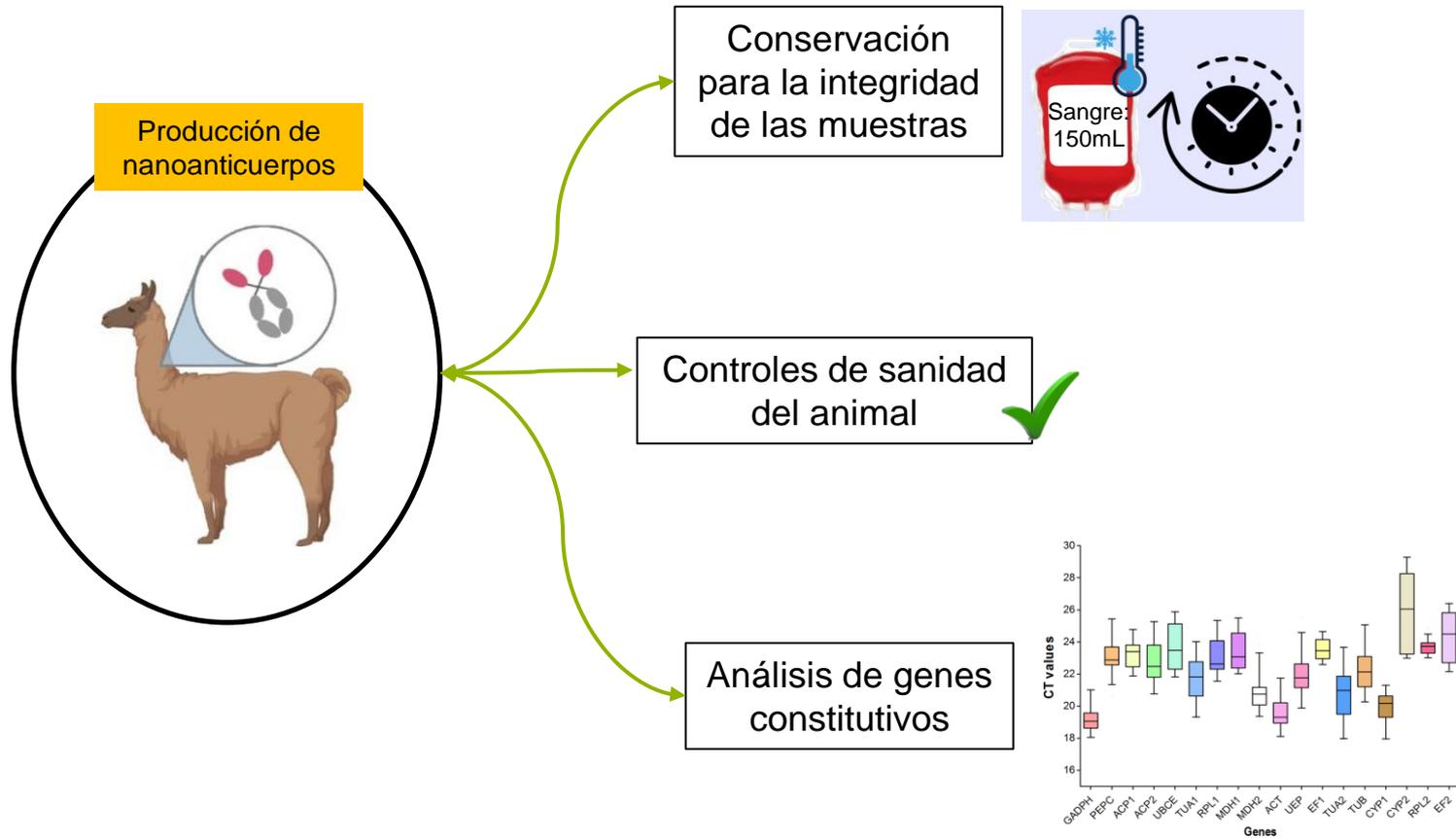
Ciclos tempranos: 21-33

Mayor eficiencia: 90%

Hipótesis ✓

La especie *Lama glama* presentó una expresión génica positiva a B-actina y GAPDH





# Agradecimientos



**Marbel Torres Ph. D.**

**Jorge Ron Ph.D.**

**Jaqueline Arroyo Ph.D.**

**Ing. Andrea Aluisa**

**Ing. Fernanda Toscano**

**Familiares y amigos**

