



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN



Implementación y optimización de un ensayo de RT-qPCR del biomarcador urinario FOXP3 ARNm para su futura utilización como indicador temprano de rechazo agudo en pacientes sometidos a trasplante renal.

AUTOR: Álvarez Meythaler José Gabriel

DIRECTOR: Dr. Grijalva Marcelo, M.D., Ph.D.

Sangolquí, 16 de Agosto de 2016



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

UNIDAD DE RELACIONES DE COOPERACIÓN INTERINSTITUCIONAL

CONTENIDO

Introducción

Objetivos

Metodología

Resultados y Discusión

Conclusiones

Recomendaciones

Enfermedad renal en etapa terminal (ESRD)



Pérdida de capacidad de los riñones para filtrar desechos y exceso de líquido

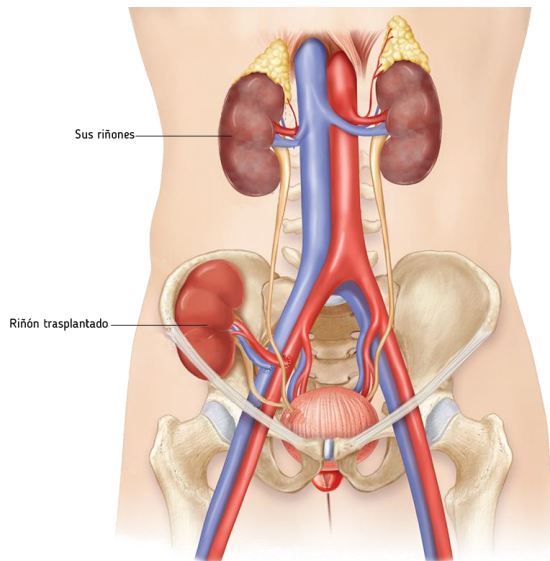


Figura 1: Trasplante renal.
Fuente: ALCER-Gipuzkoa, 2015.

Tratamientos

Definitivo

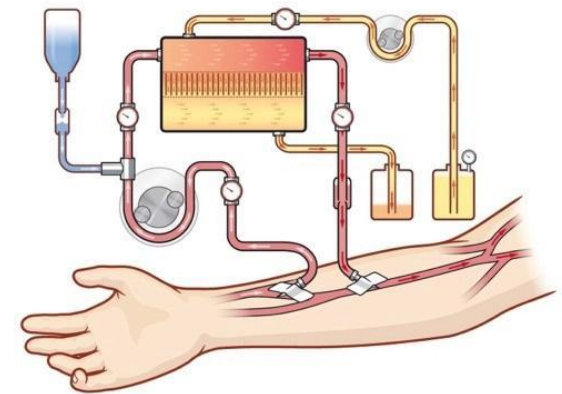


Figura 2: Diálisis renal.
Fuente: Clase Qsl, 2009.

Rechazo Agudo (AR) de Aloiinjerto Renal

- Deterioro repentino en la función renal.
- Más común y reversible.

Ecuador (Cuenca)

43.4% - rechazo agudo en los primeros 6 meses.

(Carrión Monsalve, Espinoza Manzano, & Flores Enderica, 2012)



Figura 3: Rechazo agudo de aloinjerto renal.
Fuente: Human pathology, 2004.

Pronóstico y Diagnóstico de AR de Aloiinjerto

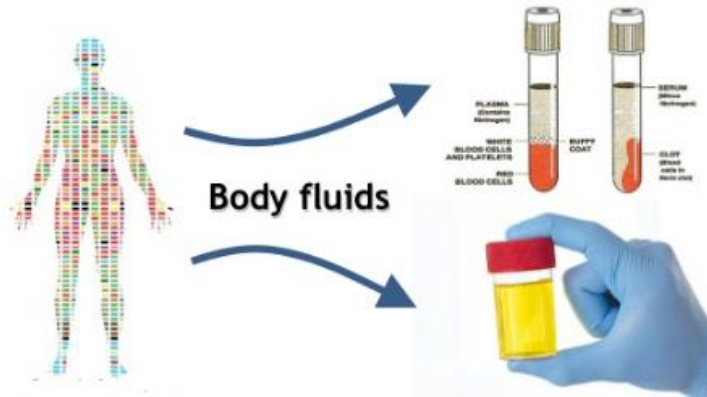


Figura 4: Muestras de fluidos corporales.
Fuente: UFMG, 2014

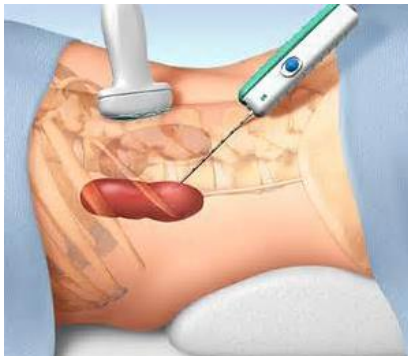
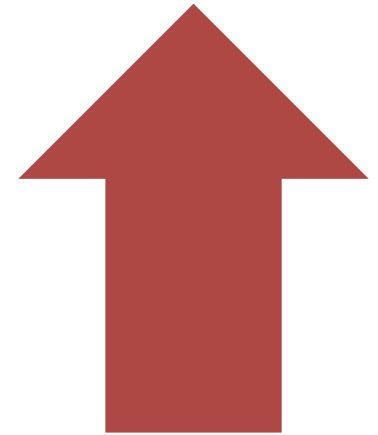


Figura 5: Biopsia Renal.
Fuente: Grupo Nefrológico Nauslife, 2015

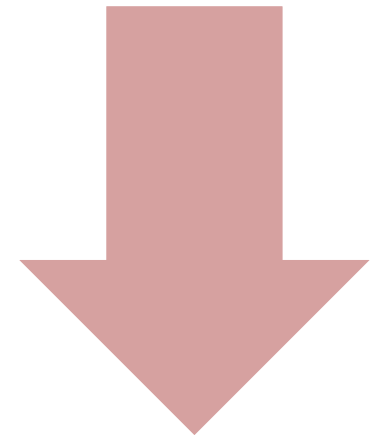
Biomarcadores

No invasivo
Diagnóstico y Pronóstico
Seguimiento
RT-qPCR



Biopsia por Punción

Estándar de Oro
Invasivo y Riesgoso
Impreciso en Predicción



Células T reguladoras y FOXP3

Treg aumentan durante rechazo agudo de aloinjerto



Estabilización del proceso de inflamación intrainjerto

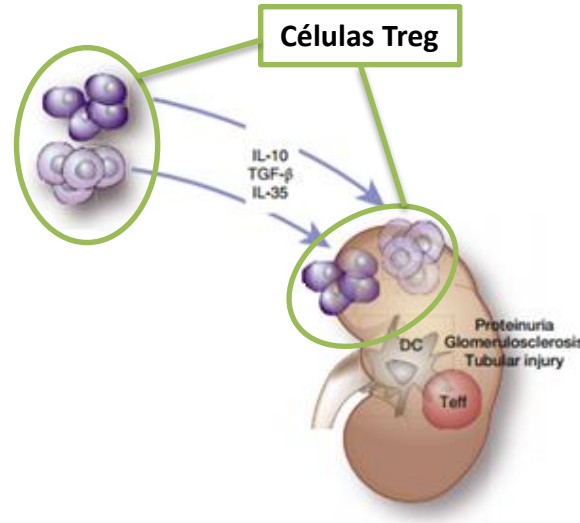


Figura 6: Infiltración de linfocitos T reguladores en el aloinjerto renal.
Fuente: Hu y cols, 2016.

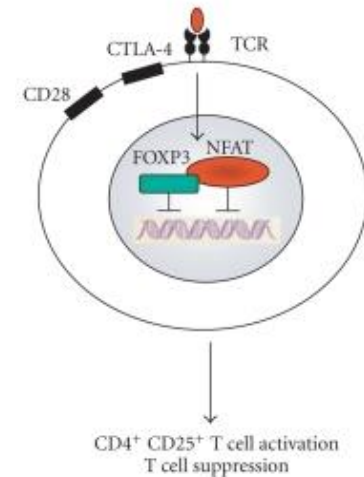


Figura 7: Regulación génica de FOXP3.
Fuente: van der Vliet y Nieuwenhuis, 2007

Forkhead box P3 (FOXP3)



Factor de transcripción de linfocitos T reguladores



Clave en su desarrollo y función supresora



Principal marcador molecular de células Treg

(Bunnag y cols., 2008)

FOXP3 ARNm como biomarcador

Muthukumar y cols. (2005)

Los niveles de ARNm de FOXP3 en orina se incrementan durante AR renal.

Aquino-Dias y cols. (2008)

Los niveles de FOXP3 ARNm predijeron AR renal con una sensibilidad y especificidad del 100%

Otras Investigaciones

Afaneh y cols. (2010)
Keslar y cols. (2013)
Suthanthiran y cols. (2013)



OBJETIVO GENERAL

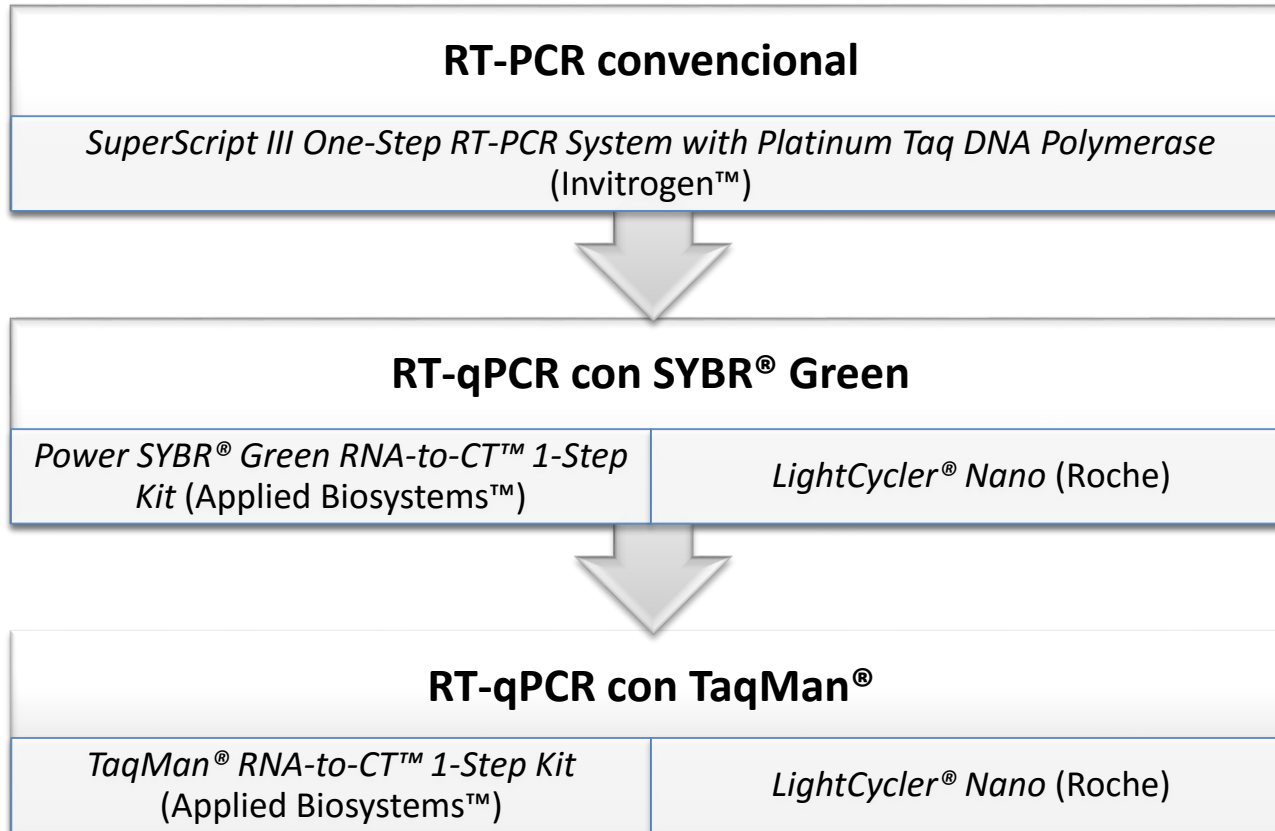
Implementar y optimizar un ensayo de RT-qPCR del biomarcador urinario FOXP3 ARNm para su futura potencial utilización como indicador temprano de rechazo agudo en pacientes sometidos a trasplante renal.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Estandarizar el protocolo de extracción de ARN total y mensajero a partir de muestras de sedimento urinario mediante un kit de extracción comercial.
- Implementar y optimizar ensayos de qPCR a partir de ARN (RT-qPCR) extraído de sangre total para evaluar la expresión del biomarcador FOXP3 ARNm y del gen 18S ARNr.
- Validar los ensayos de qPCR a partir de ARN (RT-qPCR) extraído de orina para evaluar la expresión del biomarcador FOXP3 ARNm y del gen 18S ARNr en pacientes trasplantados y no trasplantados (ensayo de validación de campo).

Optimización de sistemas 18S y FOXP3

ARN: Sangre Total



Sensibilidad analítica y Eficiencia de amplificación de sistemas RT-qPCR con TaqMan®

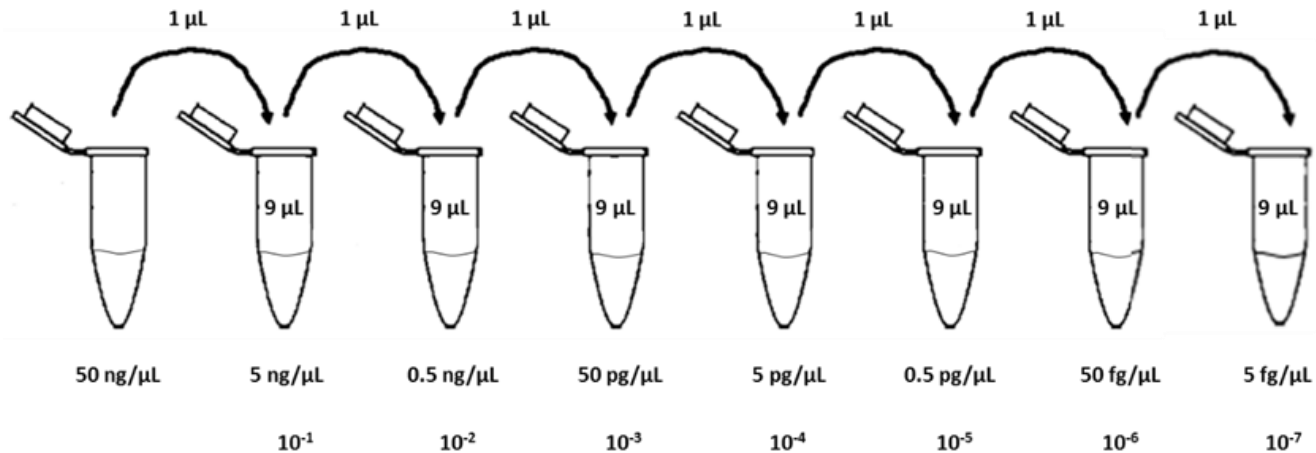
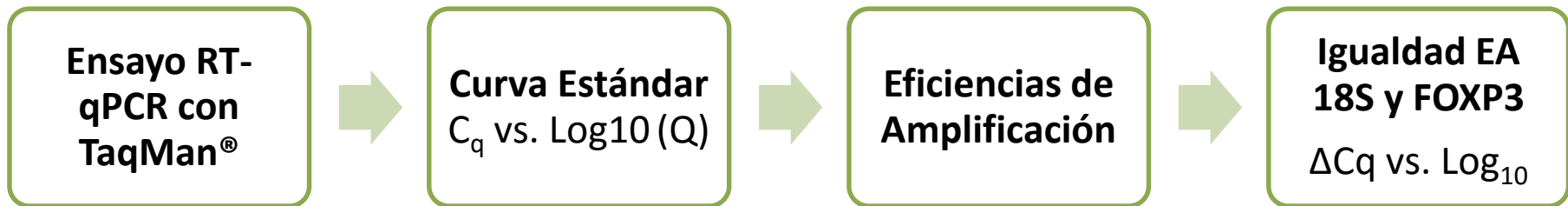


Figura 8. Procedimiento para la obtención de diluciones seriadas de ARN para los ensayos de sensibilidad analítica de RT-qPCR con TaqMan®.



Extracción de ARN a partir de muestras clínicas de orina

Obtención de sedimento celular

- Muestras de orina del HCAM: 4 pacientes no trasplantados renales (no nefrópatas) y 4 trasplantados renales.

Extracción de ARN

- *MagPurix 12 System* (Zinexts Life Science Corporation) - HCAM

Tratamiento con DNasa

- *TURBO DNA-free™ kit* (Ambion™)
- Fenol/cloroformo 1:1

Análisis Cuantitativo

- *NanoDrop™ 2000* (Thermo Scientific™)

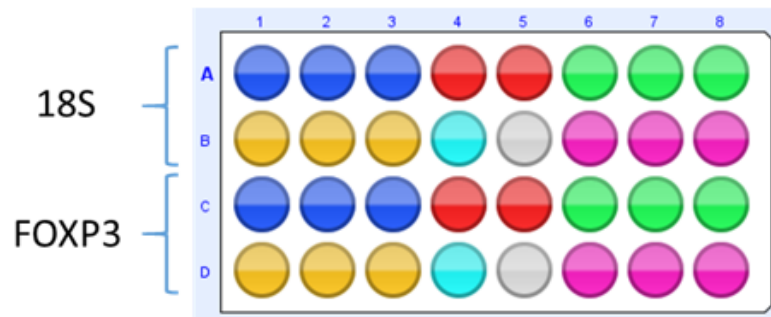


ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS

INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

UNIDAD DE RELACIONES DE COOPERACIÓN INTERINSTITUCIONAL

Evaluación de los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® en ARN de muestras clínicas de orina



- Paciente No Trasplantado/Trasplantado 1:** A1 – A3, C1 – C3 (Azul)
- Paciente No Trasplantado /Trasplantado 2:** A6 – A8, C6 – C8 (Verde)
- Paciente No Trasplantado /Trasplantado 3:** B1 – B3, D1 – D3 (Amarillo)
- Paciente No Trasplantado /Trasplantado 4:** B6 – B8, D6 – D8 (Violeta)
- Control Positivo (Sangre):** A4 – A5, C4 – C5 (Rojo)
- Control Negativo (Agua):** B4, D4 (Celeste)
- Pocillo Vacío:** B5, D5 (Blanco)



Figura 9. Diseño de placa de los ensayos de RT-qPCR con TaqMan® con ARN de muestras clínicas de orina de pacientes no trasplantados y trasplantados renales.

Análisis estadístico

Variabilidad
intraensayo e
interensayo (R)

Coeficiente de
variación (CV) de
valores de Cq

Prueba de Hipótesis
de igualdad de CV

Prueba de hipótesis
de igualdad de
medias (InfoStat)

Entre valores de Cq
de pacientes
trasplantados y no
trasplantados

Sistema 18S



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

UNIDAD DE RELACIONES DE COOPERACIÓN INTERINSTITUCIONAL

Optimización de RT-qPCR con TaqMan® – 18S y FOXP3

Sistema 18S

Tabla 1. Configuración de la reacción de RT-qPCR con TaqMan® para el sistema del gen 18S.

Componente	C. Inicial	C. Final	1X (μL)
TaqMan® RT-PCR Mix	2X	1X	5.00
Primer Forward	10μM	0.2μM	0.20
Primer Reverse	10μM	0.2μM	0.20
Sonda TaqMan	1000nM	100nM	1.00
TaqMan® RT Enzyme Mix	40X	1X	0.25
Agua libre de nucleasas	-	-	1.35
ARN*	5ng/μL	1ng/μL	2.00
Volumen Total (μL)			10.00

Sistema FOXP3

Tabla 2. Configuración de la reacción de RT-qPCR con TaqMan® para el sistema del gen FOXP3.

Componente	C. Inicial	C. Final	1X (μL)
TaqMan® RT-PCR Mix	2X	1X	5.00
Primer Forward	10μM	0.5μM	0.50
Primer Reverse	10μM	0.5μM	0.50
Sonda TaqMan	1000nM	100nM	1.00
TaqMan® RT Enzyme Mix	40X	1X	0.25
Agua libre de nucleasas	-	-	0.75
ARN*	5ng/μL	1ng/μL	2.00
Volumen Total (μL)			10.00

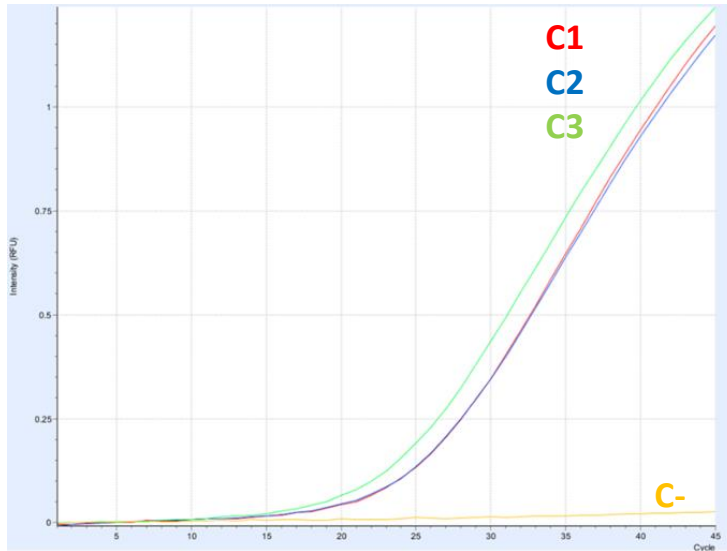
Tabla 3. Programación del termociclador para el ensayo de RT-qPCR con TaqMan® del gen 18S y FOXP3.

Proceso	Temperatura	Tiempo	Número de Ciclos
Síntesis de ADNc	48°C	15 min	1
Denaturación Inicial (Activación de DNA Polimerasa)	95°C	10 min	1
Denaturación	95°C	15 seg	45
Annealing	63°C	30 seg	
Extensión	72°C	30 seg	

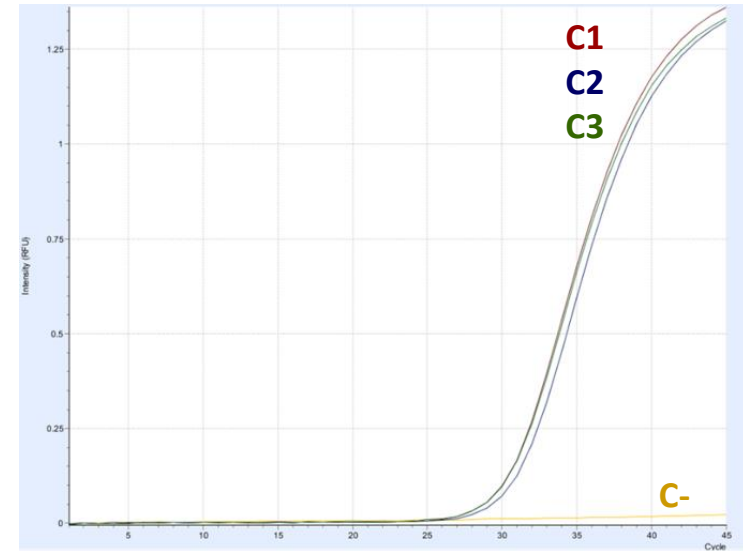


Optimización de RT-qPCR con TaqMan® – 18S y FOXP3

Sistema 18S



Sistema FOXP3



Figuras 10 y 11. Curvas de amplificación de los ensayos de RT-qPCR con TaqMan® para los genes 18S (izquierda) y FOXP3 (derecha). C1, C2, C3: Controles positivos. C-: Control negativo sin ARN.

Muestra	Valor de Cq
C1 18S	25.238
C2 18S	25.259
C3 18S	23.589
C- 18S	-

Muestra	Valor de Cq
C1 FOXP3	29.525
C2 FOXP3	30.082
C3 FOXP3	29.575
C- FOXP3	-

Sensibilidad analítica de sistemas RT-qPCR TaqMan®

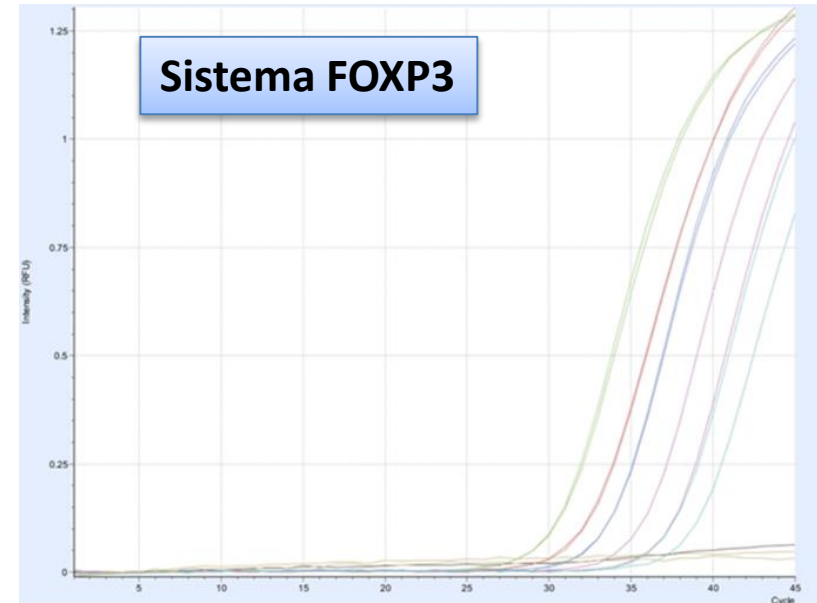
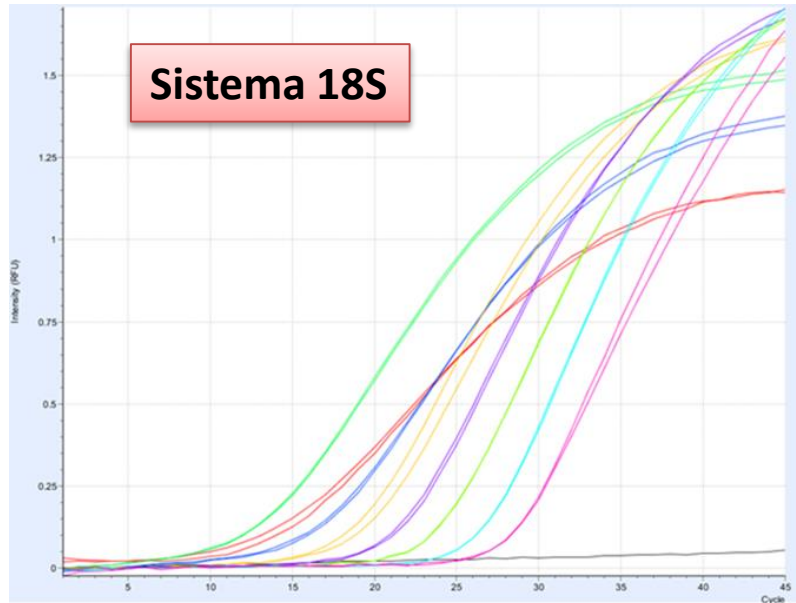


Figura 12 y 13. Curvas de amplificación de los ensayos de sensibilidad analítica de RT-qPCR con TaqMan® para los genes 18S (izquierda) y FOXP3 (derecha).

**Sensibilidad
Analítica**

- 18S: 1 fg/ μ L
- FOXP3: 1 pg/ μ L

Eficiencia de amplificación de sistemas RT-qPCR TaqMan®

Tabla 4. Eficiencias de amplificación de los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® para los genes 18S y FOXP3.

Sistema	m (log10)	PEA
18S	-2.6855	135.70
FOXP3	-2.6435	138.93

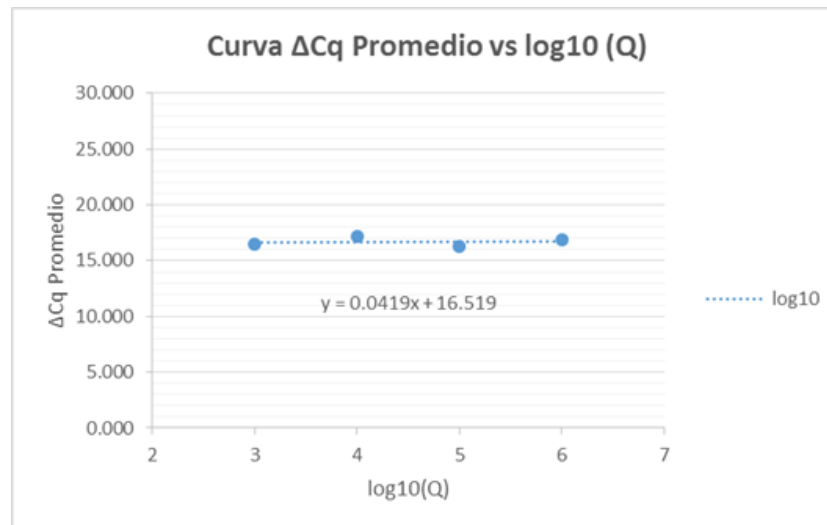


Figura 14. Curva ΔCq promedio vs. $\log_{10}(Q)$ correspondiente a los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® para los genes 18S y FOXP3.

Pendiente (m)
 $0.0419 < 0.1$

EA de 18S y
 FOXP3 son
 iguales

Extracción de ARN a partir de Orina

Tabla 5. Resultados de cuantificación por espectrofotometría con NanoDrop 2000™ de la extracción de ARN a partir de muestras clínicas de orina.

Paciente	Muestra	Conc. (ng/μL)	260/280
No Trasplantado	NT1	16	1.65
	NT3	19.6	1.51
	NT6	18.3	1.86
	NT7	27.7	1.64
Trasplantado	T1	13.3	1.49
	T2	16.1	1.52
	T3	10.4	1.44
	T5	8.5	1.46

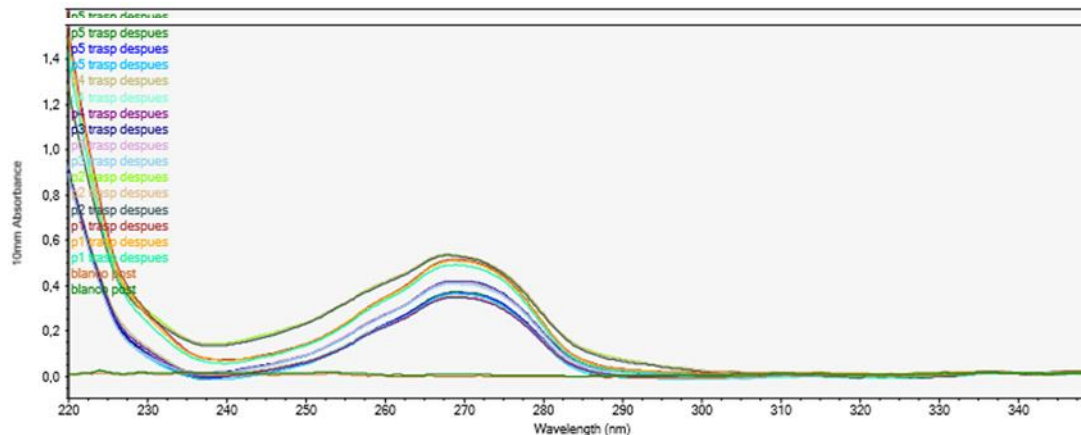


Figura 15. Espectro de muestras de ARN de sedimento celular urinario cuantificadas por espectrofotometría con NanoDrop 2000™.

Resultados y análisis de la evaluación de los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® en ARN de muestras clínicas de orina -18S

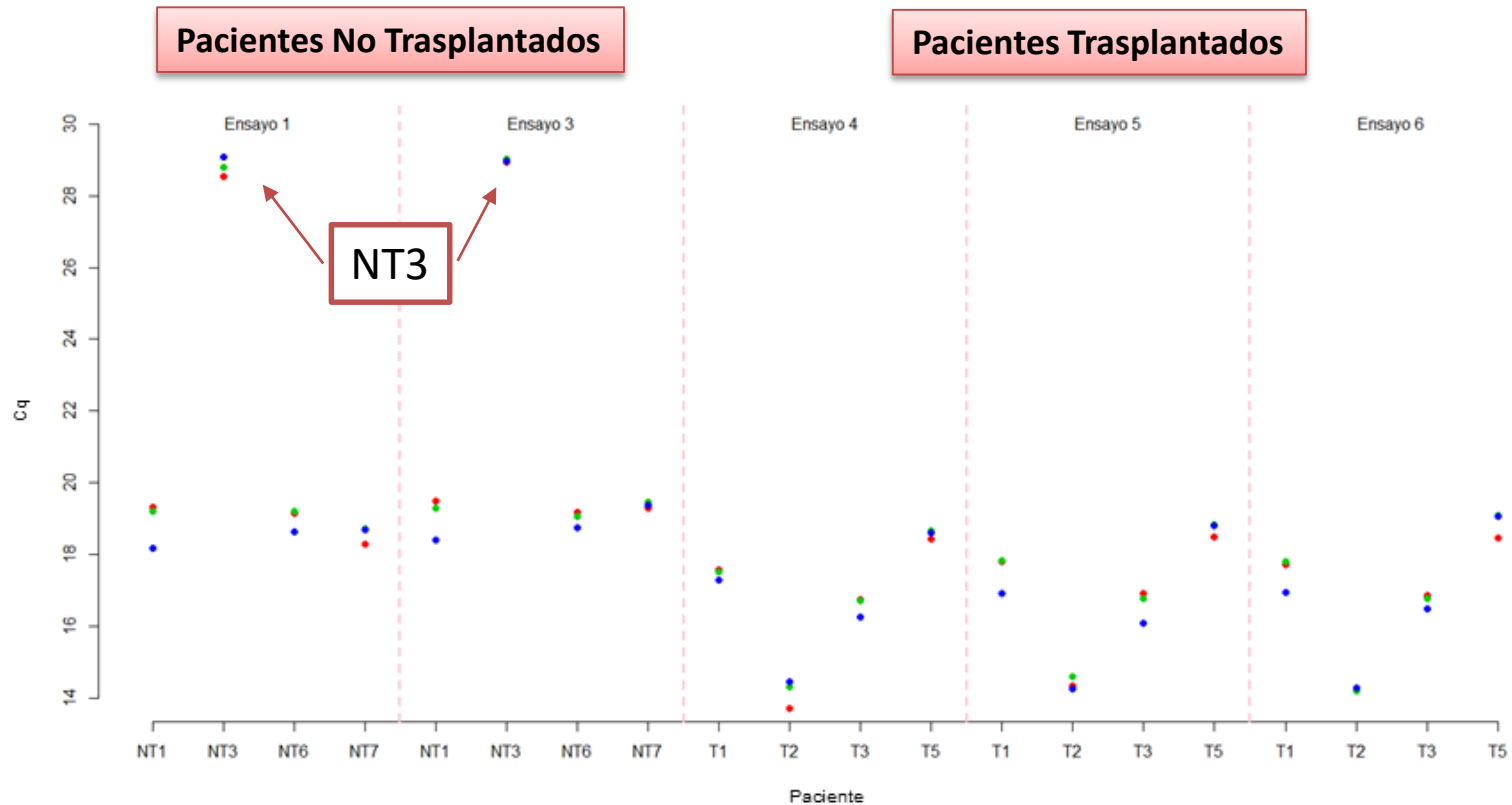


Figura 16. Gráfico de valores de Cq resultados de cada paciente de los ensayos 1, 3, 4, 5 y 6 correspondientes a la evaluación de los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® del gen 18S en muestras clínicas de ARN de orina.

Análisis de Coeficiente de Variación Intraensayo por paciente -18S

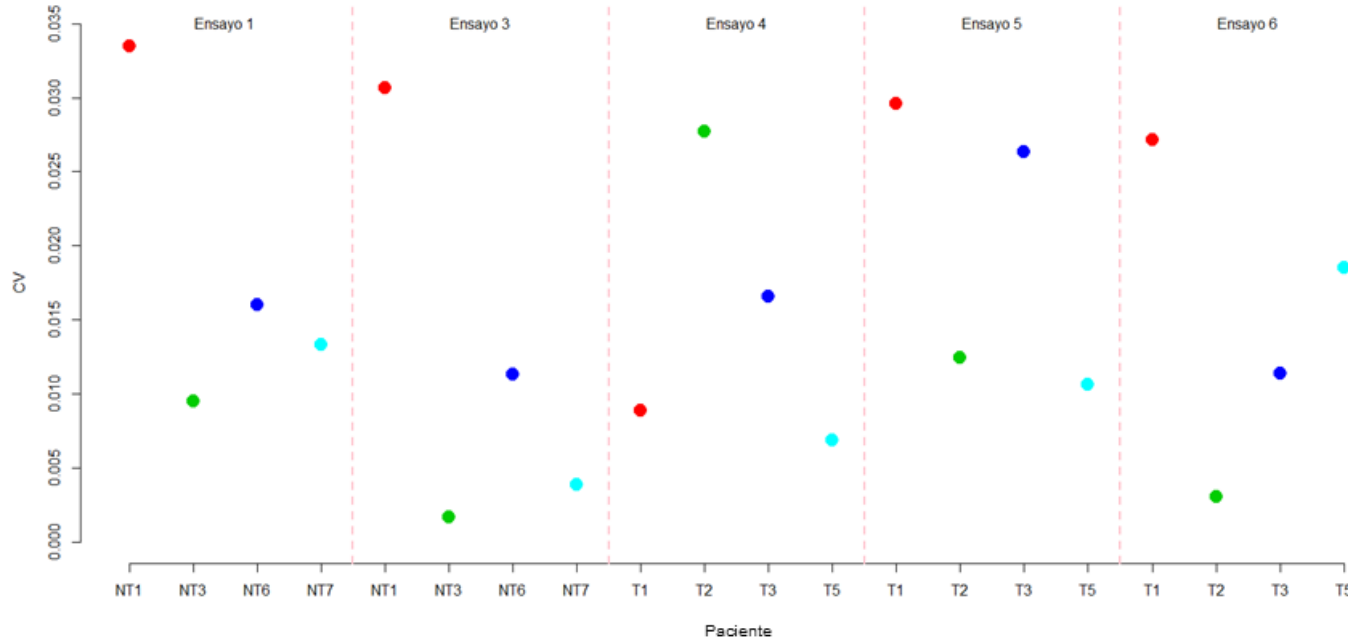


Figura 17. Coeficientes de variación (CV) por paciente y ensayo de los resultados de RT-qPCR con TaqMan® del sistema 18S en ARN de muestras clínicas de orina.

Prueba de hipótesis de igualdad de CV

p-valores
0.524 - 0.871

No hay diferencias en la variabilidad entre ensayos según cada paciente ($\alpha = 0.05$).

Variabilidad intraensayo - sistema 18S: **1.6%**.

Análisis de Coeficiente de Variación Interensayo por ensayo -18S

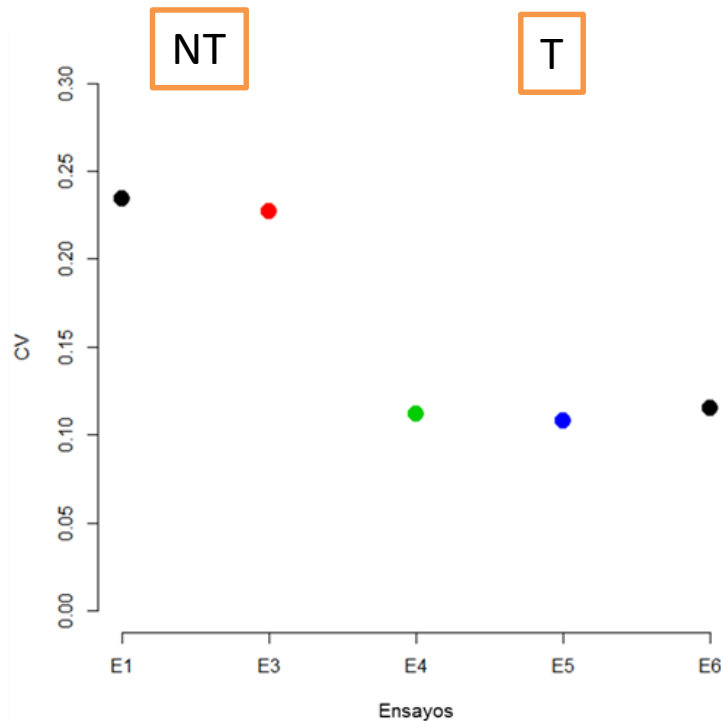


Figura 18. Coeficientes de variación (CV) por ensayo de los resultados de RT-qPCR con TaqMan® del sistema 18S en ARN de muestras clínicas de orina.

Variabilidad interensayo sistema 18S:
15.6% con paciente NT3
7.16% sin paciente NT3

Prueba de hipótesis de igualdad de CV

p-valores
0.505 - 0.634

No hay diferencias en la variabilidad entre ensayos ($\alpha = 0.05$).

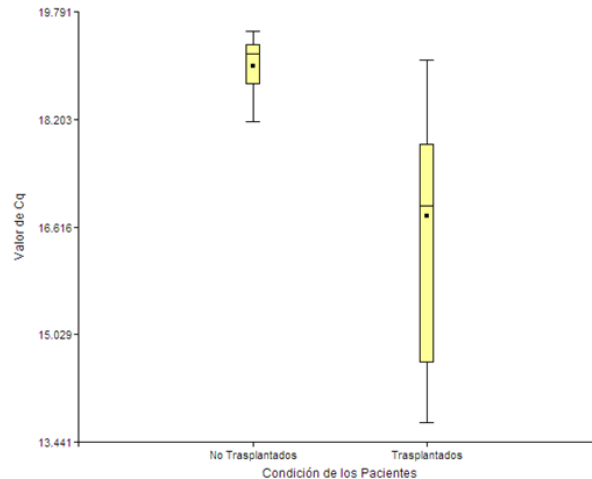


ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Análisis Estadístico de valores de Cq -18S

Tabla 6. Resultado de Kruskal-Wallis en Infostat de los valores de Cq de pacientes trasplantados y no trasplantados en el sistema 18S, sin datos del paciente no trasplantado NT3.

Variable	Condición Paciente	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Valor de Cq	No Trasplantados	18	18.99	0.41	19.17	26.21	<0.0001
Valor de Cq	Trasplantados	36	16.78	1.67	16.92		



Diferencias significativas entre los Cq de pacientes trasplantados y no trasplantados



Posible estudio de la expresión de 18S ARNr como un biomarcador de rechazo agudo renal.

Figura 19. Gráfico de cajas y bigotes de valores de Cq resultados del sistema de RT-qPCR con TaqMan® del gen 18S en muestras clínicas de ARN de orina pacientes trasplantados y no trasplantados excluyendo los datos atípicos.

Resultados y análisis de la evaluación de los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® en ARN de muestras clínicas de orina –FOXP3

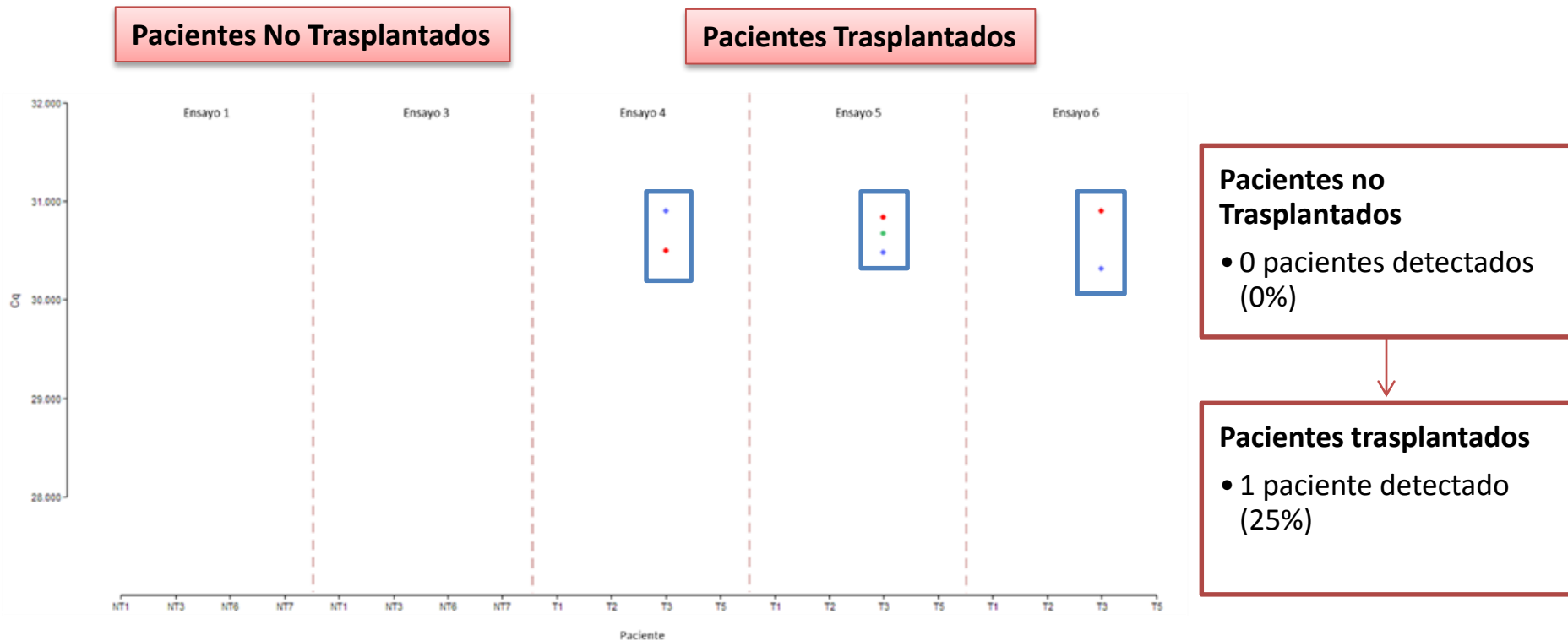


Figura 21. Gráfico de valores de Cq resultados de cada paciente de los ensayos 1, 3, 4, 5 y 6 correspondientes a la evaluación de los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® del gen 18S en muestras clínicas de ARN de orina.

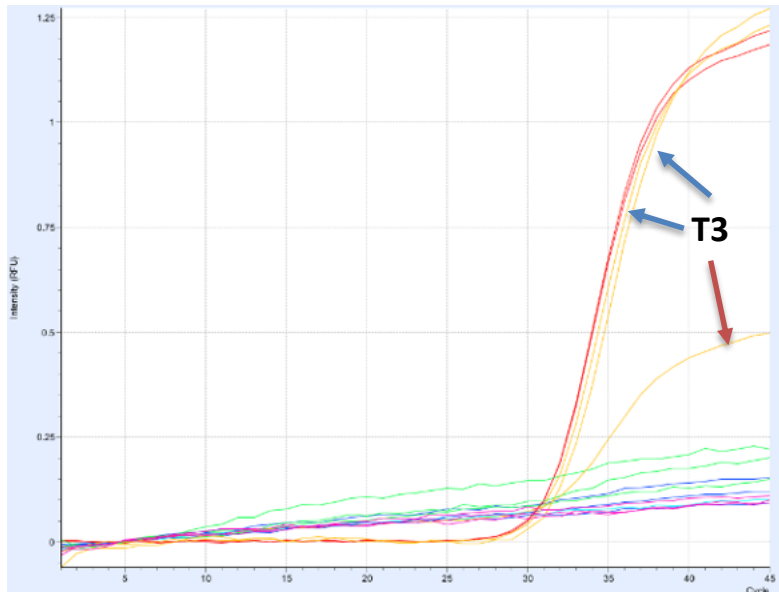
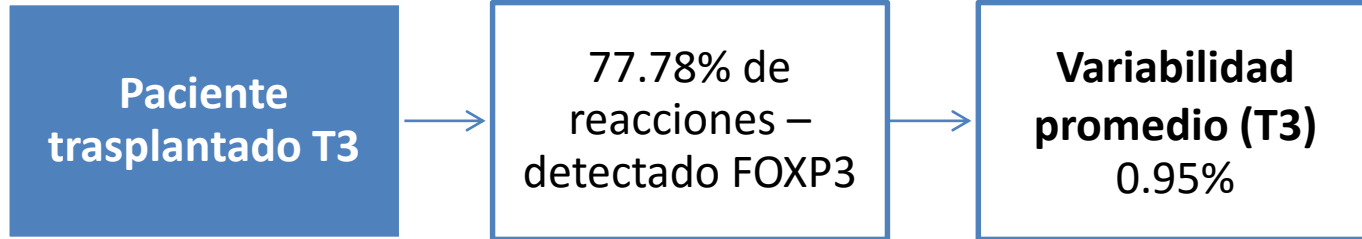


Figura 22: Gráfico de amplificación del ensayo 4 del sistema FOXP3.

Limitante
Calidad del ARN extraído a partir de sedimento urinario

CONCLUSIONES

- Las eficiencias de amplificación de los sistemas RT-qPCR con TaqMan[®] de 18S y FOXP3 fueron de 135.70% y 138.93% respectivamente, comprobando posible contaminación en la muestra de ARN extraído a partir de sangre.
- Los resultados totales de extracción de ARN a partir de orina indicaron rendimientos de extracción variables, baja calidad de ARN con tendencia a degradarse.
- El sistema de RT-qPCR con TaqMan[®] del gen 18S en muestras clínicas de orina es preciso y reproducible, con una variabilidad intraensayo aceptable de 1.6%, y sin diferencias significativas entre las variaciones (CV) de Cq respecto a cada paciente y entre ensayos.

CONCLUSIONES

- El análisis estadístico mostró diferencias significativas de las medias entre los valores de Cq de pacientes trasplantados y no trasplantados en el sistema 18S, comprobando que existe una mayor cantidad de ARN del gen 18S ARNr en pacientes trasplantado renales.
- El sistema de RT-qPCR con TaqMan[®] de FOXP3 fue capaz de detectar el gen FOXP3 ARNm en sólo una muestra clínica de ARN a partir de orina correspondiente a uno de los pacientes trasplantados.
- El sistema RT-qPCR con TaqMan[®] del gen FOXP3 necesita mayor optimización y aumento en la sensibilidad analítica para ser validado en ARN de muestras clínicas de orina de pacientes trasplantados renales.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda optimizar los ensayos de sensibilidad analítica de los sistemas RT-qPCR con TaqMan® de los genes 18S y FOXP3 para construir nuevas curvas estándar y obtener eficiencias de amplificación cercanas al 100%.
- Según los resultados de este proyecto y hallazgos en varias investigaciones, se debería establecer posible estudio de la expresión de 18S ARNr como un biomarcador de rechazo agudo renal.
- Siendo el ARN la principal limitante del presente estudio, se recomienda un mejoramiento de la cantidad y calidad general del ARN extraído a partir de sedimento urinario.

AGRADECIMIENTOS





Gracias por
su atención



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

UNIDAD DE RELACIONES DE COOPERACIÓN INTERINSTITUCIONAL