



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: 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

2016



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el 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” realizado por el señor **JOSÉ GABRIEL ÁLVAREZ MEYTHALER**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los resultados teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar al señor **JOSÉ GABRIEL ÁLVAREZ MEYTHALER** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 5 de Agosto de 2016

Dr. Rodrigo Marcelo Grijalva Silva, M.D., Ph.D.

DIRECTOR DEL PROYECTO



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **JOSÉ GABRIEL ÁLVAREZ MEYTHALER**, con cédula de identidad N° 050308544-1, declaro que este 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”** ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerados en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría y en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 5 de Agosto de 2016

JOSÉ GABRIEL ÁLVAREZ MEYTHALER

C.C. 050308544-1



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **JOSÉ GABRIEL ÁLVAREZ MEYTHALER**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual en la institución el presente 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”** cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 5 de Agosto de 2016



JOSÉ GABRIEL ÁLVAREZ MEYTHALER

C.C. 050308544-1

DEDICATORIA

A mi madre quien ha sabido tener siempre un consejo valioso en todo momento, quien con su amor y su dedicación incansables ha procurado tener en mí a una persona de bien en todo ámbito de mi vida. Mi apoyo y modelo a seguir para alcanzar mis metas.

A mi padre quien con su manera tan especial de mostrarme su amor y preocupación, ha sido para mí un soporte importante en cada objetivo planteado, quien siempre estuvo a mi lado dispuesto a luchar mis batallas.

A mis hermanos Amparo y Carlos quienes han sido un apoyo constante en presencia y ausencia, quienes han sabido impulsarme a ser alguien de quien puedan estar orgullosos siempre.

José Gabriel Álvarez Meythaler

AGRADECIMIENTO

A Dios por haberme acompañado y cuidado en toda esta travesía no permitiéndome tropezar sin antes darme las fuerzas para levantarme, por guiarme siempre por el camino correcto.

A mis padres por su cariño y apoyo incondicional, por no dejarme desviar la mirada de mis objetivos.

A mis hermanos por ayudarme siempre a renovar mi fortaleza mental en momentos difíciles.

A mis tíos Juan Manuel Montalvo y Mónica Meythaler por brindarme un segundo hogar, su apoyo y compañía fueron importantes, siempre estaré agradecido con ustedes.

A mis primos Carlos García y Pedro Vásconez por todos los momentos compartido, disfrutados y siempre recordados todo este tiempo, porque más que familia supieron ser grandes amigos, consejeros y confidentes.

A mis amigos de muchos años Cristina Berrazueta, Alexander Maldonado y Pablo Mancheno por todas las vivencias, ideas locas y gratos momentos, porque pese a los tiempos largos de ausencia sabemos que la amistad perdurará.

A Valeria Bautista por su cariño y apoyo incondicional, por impulsarme para no caer vencido ante cada obstáculo que esta etapa profesional y personal me puso en el camino. Gracias por tanto.

A mis compañeras y amigas Karla Vizquete, Lizeth Salazar, Daniela Sánchez y Diana Herrera por hacer de esta época de universidad y tesis una experiencia inmejorable.

A Isaac Armendáriz, Evelyn Calderón, Dayana Aguilar, María José Vallejo, Gabriela Vilema y Gabriela Zapata por los conocimientos brindados y buenos momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio.

Al Dr. Marcelo Grijalva por haber permitido integrarme en este reconocido laboratorio que me ayudó a desarrollar mis capacidades y conocimiento. Gracias por su tiempo y por tener siempre una respuesta a mis inquietudes.

A la Dr. Patricia Jiménez por su apoyo y ayuda de inicio a fin en mi proyecto de titulación.

Al Dr. Javier Camacho, Ing. Pedro Romero y Mat. Luis Castillo por sus valiosos aportes y consejos para la culminación de este proyecto.

Al Laboratorio de Biología Molecular del HCAM por su colaboración para el desarrollo de esta investigación.

A todos lo que me ayudaron en pequeña o gran magnitud para la consecución de esta meta importante en mi vida.

José Gabriel Álvarez Meythaler

INDICE

CERTIFICACIÓN	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
INDICE.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xvii
ABREVIATURAS	xxii
RESUMEN	xxiv
ABSTRACT	xxv
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN	1
1. Formulación del problema y antecedentes	1
2. Justificación del Problema	3
3. Objetivos del proyecto	5
3.1. Objetivo general	5
3.2. Objetivos específicos.....	5
4. Marco teórico.....	6
4.1. Trasplante renal.....	6
4.2. Rechazo del aloinjerto renal	6
4.2.1. Rechazo hiperagudo	8
4.2.2. Rechazo agudo acelerado	8
4.2.3. Rechazo agudo	8

4.2.4. Rechazo crónico	9
4.3. Rechazo agudo a aloinjerto renal	9
4.3.1. El sistema inmune innato en el rechazo agudo renal	10
4.3.2. Rechazo mediado por anticuerpos.....	11
4.3.3. Rechazo mediado por células T	12
4.3.3.1. Presentación del aloantígeno.....	12
4.3.3.2. Reconocimiento de aloantígeno por las células T.....	13
4.3.3.3. Diferenciación de células T y movimiento en el aloinjerto	14
4.3.3.4. Acción de las células T efectoras en el aloinjerto.....	15
4.4. Células T reguladoras	16
4.4.1. Forkhead box P3 (FOXP3).....	18
4.5. Biopsia renal.....	20
4.6. Biomarcador	21
4.6.1. Biomarcadores de rechazo agudo renal.....	21
4.6.2. FOXP3 como biomarcador de rechazo agudo renal	22
4.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR)	23
4.7.1. Cuantificación Absoluta.....	24
4.7.2. Cuantificación Relativa.....	25
4.8. Precisión de un ensayo	26
5. Hipótesis.....	27
 CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA	 28
1. Análisis de cebadores y sondas	28
2. Extracción de ADN a partir de sangre total	29
3. Cuantificación de ADN por espectrofotometría.....	29
4. Análisis cualitativo del ADN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa.....	29
5. Optimización de PCR convencional	29
6. Ensayo de sensibilidad analítica de PCR convencional	31
7. Estandarización del protocolo para obtención de leucocitos a partir de sangre total.....	33

8. Estandarización del protocolo para la extracción de ARN a partir de leucocitos.....	33
9. Estandarización del tratamiento de ARN con DNasa	33
10. Cuantificación de ARN por espectrofotometría.....	34
11. Análisis cualitativo del ARN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa.....	34
12. Optimización de RT-PCR convencional	34
13. Estandarización del procesamiento de muestras de orina y obtención de sedimento celular urinario.....	37
14. Estandarización del protocolo para la extracción de ARN a partir de sedimento celular urinario.....	38
15. Estandarización del tratamiento de ARN con DNasa y extracción fenol/cloroformo.....	38
16. Análisis de estabilización y almacenamiento del RNA later	39
17. Optimización de RT-qPCR con SYBR® Green	40
18. Optimización de RT-qPCR con TaqMan®.....	44
19. Cuantificación de ARN por espectrofotometría y fluorometría	46
20. Ensayo de sensibilidad analítica de RT-qPCR con TaqMan®.....	47
21. Análisis de la eficiencia relativa de amplificación	49
22. Obtención de muestras clínicas de orina de pacientes trasplantados y no trasplantados renales.....	51
23. Procesamiento de muestras clínicas y obtención de sedimento celular urinario.....	51
24. Extracción de ARN a partir del sedimento celular urinario de muestras clínicas, tratamiento del ARN con DNasa y extracción con fenol/cloroformo.....	52
25. Evaluación de los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® en muestras clínicas.....	52

26. Análisis estadístico RT-qPCR con TaqMan® de ARN de muestras clínicas de orina.....	56
CAPÍTULO 3 RESULTADOS.....	59
1. Análisis de cebadores y sondas	59
2. Extracción de ADN a partir de sangre total	62
3. Optimización de PCR convencional	64
4. Ensayo de sensibilidad analítica de PCR convencional	65
5. Extracción de ARN a partir de leucocitos de sangre	66
6. Optimización de RT-PCR convencional	68
7. Extracción de ARN a partir de sedimento celular urinario	70
8. Análisis de estabilidad y almacenamiento del RNAlater.....	73
9. Optimización de RT-qPCR con SYBR® Green	78
10. Optimización de RT-qPCR con TaqMan®.....	82
11. Extracción de ARN a partir de leucocitos de sangre y cuantificación por espectrofotometría y fluorometría.....	85
12. Ensayo de sensibilidad analítica de RT-qPCR con TaqMan®.....	87
13. Análisis de la eficiencia relativa de amplificación	89
14. Extracción de ARN a partir del sedimento celular de muestras clínicas de orina de pacientes no trasplantados y trasplantados renales.....	94
15. Evaluación de los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® en muestras clínicas.....	96
16. Análisis estadístico de resultados de RT-qPCR con TaqMan® en ARN de muestras clínicas de orina	99
16.1. Sistema del gen 18S	99
16.2. Sistema del gen FOXP3	113
CAPÍTULO 4 DISCUSIÓN	116

CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES	128
CAPÍTULO 6 RECOMENDACIONES	131
CAPÍTULO 7 BIBLIOGRAFÍA	133

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Configuración de la reacción de PCR convencional para el sistema del gen FOXP3.	30
Tabla 2. Programación del termociclador para el ensayo de PCR convencional para el gen FOXP3.	31
Tabla 3. Configuración de la reacción de PCR convencional para el ensayo de sensibilidad analítica del sistema del gen FOXP3.	32
Tabla 4. Configuración de la reacción de RT-PCR convencional para el sistema del gen 18S.....	36
Tabla 5. Configuración de la reacción de RT-PCR convencional para el sistema del gen FOXP3.	36
Tabla 6. Programación del termociclador para el ensayo de RT-PCR convencional para el gen 18S.....	37
Tabla 7. Programación del termociclador para el ensayo de RT-PCR convencional para el gen FOXP3.	37
Tabla 8. Configuración de la reacción de RT-qPCR con SYBR® para el sistema del gen 18S.....	42
Tabla 9. Configuración de la reacción de RT-qPCR con SYBR® para el sistema del gen FOXP3.	42
Tabla 10. Programación del equipo para el ensayo de RT-qPCR con SYBR® para el gen 18S.	43
Tabla 11. Programación del equipo para el ensayo de RT-qPCR con SYBR® para el gen FOXP3.....	43
Tabla 12. Configuración de la reacción de RT-qPCR con TaqMan® para el sistema del gen 18S.....	45
Tabla 13. Configuración de la reacción de RT-qPCR con TaqMan® para el sistema del gen FOXP3.	45

Tabla 14. Programación del equipo para los ensayos de RT-qPCR con TaqMan® para los genes 18S y FOXP3.....	46
Tabla 15. Configuración de la reacción de RT-qPCR con TaqMan® para el ensayo de sensibilidad analítica del sistema del gen 18S.....	48
Tabla 16. Configuración de la reacción de RT-qPCR con TaqMan® para el ensayo de sensibilidad analítica del sistema del gen FOXP3.	49
Tabla 17. Configuración de la reacción de RT-qPCR con TaqMan® del sistema del gen 18S para los ensayos con ARN de muestras clínicas de orina de pacientes no trasplantados y trasplantados renales.	55
Tabla 18. Configuración de la reacción de RT-qPCR con TaqMan® del sistema del gen FOXP3 para los ensayos con ARN de muestras clínicas de orina de pacientes no trasplantados y trasplantados renales.....	55
Tabla 19. Características de los cebadores de los genes 18S y FOXP3.....	59
Tabla 20. Características de las sondas de los genes 18S y FOXP3.....	59
Tabla 21. Valores de energía libre de Gibbs (ΔG) de estructuras secundarias de cebadores de los genes 18S y FOXP3.....	60
Tabla 22. Características de los amplicones obtenidos de los genes 18S y FOXP3.	61
Tabla 23. Características del amplicón obtenido en ensayos de PCR con ADN humano y los cebadores del gen FOXP3.	61
Tabla 24. Valores de cuantificación por espectrofotometría con NanoDrop 2000™ de la extracción de ADN a partir de sangre total.	63
Tabla 25. Valores de cuantificación por espectrofotometría con NanoDrop 8000™ de la extracción de ARN a partir de leucocitos de sangre.	66

Tabla 26. Valores de cuantificación por espectrofotometría con NanoDrop 2000™ de la extracción de ARN a partir de sedimento celular urinario.....	71
Tabla 27. Valores de cuantificación por espectrofotometría con NanoDrop 2000™ de la extracción de ARN a partir de sedimento celular urinario correspondiente al primer ensayo de RNAlater.....	74
Tabla 28. Valores de cuantificación por espectrofotometría con NanoDrop 2000™ de la extracción de ARN a partir de sedimento celular urinario correspondiente al segundo ensayo de RNAlater.....	76
Tabla 29. Resultados del ensayo de RT-qPCR con SYBR® Green para el gen 18S.....	78
Tabla 30. Resultados del ensayo de RT-qPCR con SYBR® Green para el gen FOXP3.	80
Tabla 31. Resultados del ensayo de RT-qPCR con TaqMan® para el gen 18S.....	83
Tabla 32. Resultados del ensayo de RT-qPCR con TaqMan® para el gen FOXP3.	84
Tabla 33. Resultados de cuantificación por espectrofotometría con NanoDrop 2000™ y por fluorimetría con Qubit® 1.0 Fluorometer de la extracción de ARN de leucocitos de sangre. .	86
Tabla 34. Concentraciones de ARN y valores de Cq correspondientes del sistema de RT-qPCR con TaqMan® para el gen 18S.	90
Tabla 35. Concentraciones de ARN y valores de Cq correspondientes del sistema de RT-qPCR con TaqMan® para el gen FOXP3.	90
Tabla 36. Eficiencias de amplificación correspondientes a los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® para los genes 18S y FOXP3.....	93
Tabla 37. Cálculo del logaritmo en base 10 de la concentración de ARN inicial y el valor de ΔCq de los sistemas 18S y FOXP3.	93
Tabla 38. Valores de cuantificación por espectrofotometría con NanoDrop 2000™ del primer ensayo de extracción de ARN a partir de	

sedimento celular de muestras de orina de pacientes no trapiantados.	95
Tabla 39. Valores de cuantificación por espectrofotometría con NanoDrop 8000™ del segundo ensayo de extracción de ARN a partir de sedimento celular de muestras de orina de pacientes no trapiantados.	95
Tabla 40. Valores de cuantificación por espectrofotometría con NanoDrop 2000™ del ensayo de extracción de ARN a partir de sedimento celular de muestras de orina de pacientes trapiantados.	95
Tabla 41. Valores de Cq resultados de los ensayos 1 y 3 correspondientes a la evaluación de los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® de los genes 18S y FOXP3 en muestras clínicas de ARN de orina de pacientes no trapiantados.	97
Tabla 42. Valores de Cq resultados de los ensayos 4, 5 y 6 correspondientes a la evaluación de los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® de los genes 18S y FOXP3 en muestras clínicas de ARN de orina de pacientes trapiantados.	98
Tabla 43. Coeficientes de variación (CV) e intervalos de confianza al 95% por paciente y ensayo de los resultados de RT-qPCR con TaqMan® del sistema 18S en ARN de muestras clínicas de orina.	102
Tabla 44. Prueba de hipótesis para la diferencia de coeficientes de variación (CV) de cada ensayo en cada paciente del sistema 18S e intervalos de confianza al 95% de los CV contrastados.	104
Tabla 45. Promedios de las repeticiones de Cq resultados de RT-qPCR con TaqMan® del sistema 18S en ARN de muestras clínicas de orina.	105
Tabla 46. Coeficientes de variación (CV) e intervalos de confianza al 95% por ensayo de los resultados de RT-qPCR con TaqMan® del sistema 18S en ARN de muestras clínicas de orina.	106

Tabla 47. Prueba de hipótesis para la diferencia de coeficientes de variación (CV) de cada ensayo del sistema 18S e intervalos de confianza al 95% de los CV contrastados.....	108
Tabla 48. Resultado de la prueba de Shapiro-Wilks modificado en Infostat de los valores de Cq de pacientes trasplantados y no trasplantados en el sistema 18S.	109
Tabla 49. Resultado de la prueba F de igualdad de varianzas en Infostat de los valores de Cq de pacientes trasplantados y no trasplantados en el sistema 18S.	110
Tabla 50. Resultado de Kruskal-Wallis en Infostat de los valores de Cq de pacientes trasplantados y no trasplantados en el sistema 18S.	111
Tabla 51. Clasificación de los grupos a partir de los resultados de Kruskal-Wallis en Infostat de los valores de Cq de pacientes trasplantados y no trasplantados en el sistema 18S.....	111
Tabla 52. 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.	113
Tabla 53. Media, desviación estándar y coeficiente de variación (CV) por ensayo de los valores de Cq resultados de RT-qPCR con TaqMan® del sistema FOXP3 del paciente trasplantado T3.	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rechazo agudo renal mediado por anticuerpos.	12
Figura 2. Vía directa, indirecta y semidirecta de alorreconocimiento.	14
Figura 3. Activación de los linfocitos T.....	15
Figura 4. Diferenciación de células Treg y expresión de FOXP3.....	19
Figura 5. Procedimiento para la obtención de diluciones seriadas de ADN para el ensayo de sensibilidad analítica de PCR convencional. .	32
Figura 6. Procedimiento para la obtención de diluciones seriadas de ARN para los ensayos de sensibilidad analítica de RT-qPCR con TaqMan®.	48
Figura 7. 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.....	53
Figura 8. Evaluación cualitativa de cebadores reconstituidos de los genes 18S y FOXP3 mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.....	62
Figura 9. Espectro de muestras de ADN a partir de sangre total cuantificadas por espectrofotometría con NanoDrop 2000™.....	63
Figura 10. Evaluación cualitativa de ADN de sangre total mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.	64
Figura 11. Resultados del sistema de PCR convencional del gen FOXP3. .	65
Figura 12. Sensibilidad Analítica del sistema de PCR convencional del gen FOXP3.	66
Figura 13. Espectro de muestras de ARN a partir de leucocitos de sangre cuantificadas por espectrofotometría con NanoDrop 8000™.....	67
Figura 14. Evaluación cualitativa de ARN de leucocitos de sangre mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.	68

Figura 15. Resultados del sistema de RT-PCR convencional del gen 18S.	69
Figura 16. Resultados del sistema de RT-PCR convencional del gen FOXP3.	69
Figura 17. Espectro de muestras de ARN a partir de sedimento celular urinario cuantificadas por espectrofotometría con NanoDrop 2000™.	71
Figura 18. Evaluación cualitativa de ARN de sedimento celular urinario mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.	72
Figura 19. Ensayo de RT-PCR convencional del gen 18S con muestra de ARN de sedimento celular urinario.....	73
Figura 20. Espectro de muestras de ARN a partir de sedimento celular urinario cuantificadas por espectrofotometría con NanoDrop 2000™ correspondiente al primer ensayo de RNAlater.	74
Figura 21. Ensayo de RT-PCR convencional del gen 18S con muestra de ARN de sedimento celular urinario correspondiente al primer ensayo de RNAlater.	75
Figura 22. Espectro de muestras de ARN a partir de sedimento celular urinario cuantificadas por espectrofotometría con NanoDrop 2000™ correspondiente al segundo ensayo de RNAlater.	76
Figura 23. Ensayo de RT-PCR convencional del gen 18S con muestra de ARN de sedimento celular urinario correspondiente al segundo ensayo de RNAlater.	77
Figura 24. Curvas de amplificación y valores de Cq del ensayo de RT- qPCR con SYBR® Green para el gen 18S.	79
Figura 25. Curva de disociación y temperaturas de melting del ensayo de RT-qPCR con SYBR® Green para el gen 18S.	79
Figura 26. Curvas de amplificación y valores de Cq del ensayo de RT- qPCR con SYBR® Green para el gen FOXP3.....	81

Figura 27. Curva de disociación y temperaturas de melting del ensayo de RT-qPCR con SYBR® Green para el gen FOXP3.....	81
Figura 28. Curvas de amplificación y valores de Cq del ensayo de RT-qPCR con TaqMan® para el gen 18S.....	83
Figura 29. Curvas de amplificación y valores de Cq del ensayo de RT-qPCR con TaqMan® para el gen FOXP3.	84
Figura 30. Evaluación cualitativa de ARN de leucocitos de sangre mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.	86
Figura 31. Espectro de muestras de ARN a partir de leucocitos de sangre cuantificadas por espectrofotometría con NanoDrop 2000™.....	87
Figura 32. Curvas de amplificación y valores de Cq del ensayo de sensibilidad analítica de RT-qPCR con TaqMan® para el gen 18S.....	88
Figura 33. Curvas de amplificación y valores de Cq del ensayo de sensibilidad analítica de RT-qPCR con TaqMan® para el gen FOXP3.....	89
Figura 34. Curva estándar de logaritmo en base 10 de la concentración de ARN inicial vs el valor de Cq promedio del sistema de RT-qPCR con TaqMan® para el gen 18S.	91
Figura 35. Curva estándar de logaritmo en base 2 de la concentración de ARN inicial vs el valor de Cq promedio del sistema de RT-qPCR con TaqMan® para el gen 18S.	91
Figura 36. Curva estándar de logaritmo en base 10 de la concentración de ARN inicial vs el valor de Cq promedio del sistema de RT-qPCR con TaqMan® para el gen FOXP3.....	92
Figura 37. Curva estándar de logaritmo en base 2 de la concentración de ARN inicial vs el valor de Cq promedio del sistema de RT-qPCR con TaqMan® para el gen FOXP3.....	92

Figura 38. Curva ΔCq promedio vs. $\text{Log}_{10}(Q)$ correspondiente a los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® para los genes 18S y FOXP3.	94
Figura 39. 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.....	100
Figura 40. Gráfico de valores de Cq resultados de cada paciente, excepto el paciente NT3, 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.....	101
Figura 41. 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.	103
Figura 42. Diferencias de coeficientes de variación (CV) entre ensayos según cada paciente del sistema 18S y sus intervalos de confianza al 95%.....	104
Figura 43. Coeficientes de variación (CV) por ensayo de los resultados de RT-qPCR con TaqMan® del sistema 18S en ARN de muestras clínicas de orina.	107
Figura 44. Diferencias de coeficientes de variación (CV) entre ensayos según del sistema 18S y sus intervalos de confianza al 95%. ...	108
Figura 45. 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.	112
Figura 46. 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 sin datos atípicos.	112

- Figura 47. 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 FOXP3 en muestras clínicas de ARN de orina..... 114
- Figura 48. Coeficientes de variación (CV) por ensayo de los valores de Cq resultados de RT-qPCR con TaqMan® del sistema FOXP3 del paciente trasplantado T3..... 115

ABREVIATURAS

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa.

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa.

RT-qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa con Transcripción Reversa.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal o ribosómico.

AR: Rechazo Agudo.

FOXP3: Forkhead box P3.

ESRD: Enfermedad renal en etapa terminal.

HLA: Antígeno Leucocitario Humano.

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

TLR: Receptor de Tipo Toll.

DAMP: Patrón Molecular Asociado a Daño.

APCs: Células Presentadoras de Antígenos.

MICA: Secuencia del péptido A del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I.

DC: Células Dendríticas.

Th: *T helper*.

Treg: T reguladoras o reguladores.

LFA-1: Antígeno asociado a la Función Leucocitaria 1.

IPEX: Síndrome de desregulación inmune, poliendocrinopatía, enteropatía, ligado al cromosoma X.

CTLA-4: Antígeno asociado al Linfocito T Citotóxico 4.

GITR: Factor de Necrosis Tumoral Inducible por Glucocorticoides.

Ct: *Cycle threshold*.

Cq: *Quantification cycle*.

CV: Coeficiente de Variación.

Tm: Temperatura de melting.

GC: Guanina-Citosina.

EA: Eficiencia de Amplificación.

PEA: Eficiencia de Amplificación en Porcentaje.

RESUMEN

El rechazo agudo a aloinjerto es el principal obstáculo para la supervivencia de un riñón trasplantado. La biopsia renal todavía es la prueba de referencia en el diagnóstico de la disfunción del injerto, pese a ser un procedimiento invasivo. Diversos estudios indican que los linfocitos T reguladores, que expresan el gen FOXP3, aumentan en el aloinjerto durante el rechazo agudo. En esta investigación, se evaluaron sistemas de RT-qPCR con la química TaqMan® para analizar la expresión del biomarcador urinario FOXP3 ARNm y del gen de referencia 18S ARNr en muestras clínicas de ARN de orina de pacientes no nefrópatas y de pacientes trasplantados renales, proporcionadas por el Hospital Carlos Andrade Marín en Quito, Ecuador. Para ello, se optimizaron los sistemas de RT-qPCR a partir de ARN de sangre total, y paralelamente se estandarizó un método de extracción de ARN a partir de sedimento urinario. El aislamiento de ARN de muestras clínicas de orina tuvo rendimientos de 4.15-13.85 ng de ARN por mL de orina, baja calidad y tendencia del ARN a degradarse. El sistema 18S en muestras clínicas de orina es preciso y reproducible, con una variabilidad intraensayo de 1.6% y sin diferencias entre las variaciones de los ensayos. Se comprobó una mayor cantidad del gen 18S en muestras de pacientes trasplantados respecto a muestras de pacientes no trasplantados. El sistema FOXP3 no detectó el gen en muestras de ARN de pacientes no trasplantados, pero sí lo hizo en una de cuatro muestras de pacientes trasplantados, demostrando que este sistema necesita mayor optimización para poder detectar el gen en todos los pacientes trasplantados. Pese a una sensibilidad analítica del sistema FOXP3 de hasta 1 pg/ μ L de ARN a partir de sangre total, en muestras de ARN a partir de orina se dificultó la detección y amplificación del gen debido a una cantidad de ARNm del gen FOXP3 menor en muestras de orina y presencia de inhibidores de PCR. Por lo tanto, el sistema FOXP3 necesita aumentar su sensibilidad analítica para ser validado en muestras de orina, y se recomienda mejorar la calidad de las muestras de ARN e implementar una etapa de preamplificación.

PALABRAS CLAVES: RECHAZO AGUDO RENAL, BIOMARCADOR, FOXP3, 18S, RT-qPCR.

ABSTRACT

Acute allograft rejection is the main complication in kidney transplantation. Despite being an invasive procedure, renal biopsy is still the gold standard in the diagnosis of graft dysfunction. Several studies indicate that regulatory T cells, which express the gene FOXP3, increase in the allograft during acute rejection. In this research, RT-qPCR TaqMan® systems were evaluated in order to study the potential applicability of FOXP3 mRNA as a urinary biomarker for acute kidney rejection. A housekeeping gene, 18S rRNA was used as reference gene for quantitation of gene expression. For both systems, RNA was extracted from urine samples from patients without kidney disease and from kidney transplant patients. Biological samples were kindly provided by the Transplant Unit and the Laboratory of Molecular Biology of Carlos Andrade Marin Hospital in Quito, Ecuador. RT-qPCR systems were optimized with whole blood extracted RNA. A method of RNA extraction from urine epithelial cell pellet was also standardized. Yields of extracted RNA from urine were 4.15-13.85 ng of RNA per mL of urine, low quality and RNA tended to degradate. The 18S system on urine samples is accurate and reproducible, with intra-assay variability of 1.6%, and no significant differences in variation between essays. More quantity of the 18S gene was proved in transplanted patient samples compared with non-transplanted patient samples. The FOXP3 system did not detect the gene in RNA from non-transplanted patient samples, but it detected the gen in one of four transplant patient samples, showing that this system needs further optimization in order to detect the gene in all transplant patients. Despite an analytical sensitivity of FOXP3 system of 1 pg/mL of RNA from whole blood, detection and amplification of the gene became more difficult in RNA samples from urine due to a less amount of mRNA of FOXP3 gene in urine samples and the presence of PCR inhibitors. Therefore, the system FOXP3 needs to increase analytical sensitivity to be validated in urine samples, and it is recommended to improve the quality of the RNA samples and implement a preamp stage.

KEYWORDS: ACUTE ALLOGRAFT REJECTION, BIOMARKER, FOXP3, 18S, RT-qPCR.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. Formulación del problema y antecedentes

El trasplante de riñón es el tratamiento definitivo para la mayoría de los pacientes con enfermedad renal en fase terminal (Lo, Kaplan, & Kirk, 2014). El desarrollo científico en el área de trasplantes ha sido considerable durante el último medio siglo, tanto en la comprensión de los mecanismos moleculares de rechazo del aloinjerto como en su relación con el sistema inmunológico (Morris, 2004) (Sayegh & Carpenter, 2004).

Unos de los principales problemas con el trasplante renal es la gran disparidad entre la oferta y la demanda de órganos, en donde la mayoría de los pacientes tienen que esperar algunos años para disponer de un riñón compatible (Harper, McBride, & Ellison, 1999). Pese a que los avances en el tratamiento de inmunosupresión han disminuido los porcentajes de rechazo agudo y mejorado los resultados a largo plazo (Kaneku & Terasaki, 2006), el rechazo del aloinjerto renal continúa siendo una de las principales causas para el desarrollo de enfermedad renal terminal (Agodoa, y otros, 1999), lo cual contribuye más a la escasez de órganos (Muthukumar, y otros, 2005). Aproximadamente el 20 por ciento de los pacientes en los Estados Unidos que están en lista de espera son aquellos que tienen un injerto rechazado (Harper, McBride, & Ellison, 1999), de los cuales, sólo el 15 por ciento repiten el trasplante (Cecka, 1998).

El rechazo agudo es el principal obstáculo y factor de riesgo para el daño del injerto y su supervivencia a largo plazo (Akhtar, y otros, 1998) (Meier-Kriesche, Schold, Srinivas, & Kaplan, 2004). Se define como el deterioro repentino en la función renal del aloinjerto debido a una respuesta inmune del receptor al órgano del donante (Gulanikar, MacDonald, Sungurtekin, & Belitsky, 1992). Alrededor del 35 por ciento de los receptores de aloinjertos tiene un episodio de rechazo agudo en el primer año después del trasplante (Hariharan, y otros, 2000).

A inicios de 1960, los fármacos utilizados en los pacientes receptores de aloinjerto renal fueron la azatioprina y los corticosteroides; sin embargo, el desarrollo de rechazo agudo, acompañado con fiebre y sensibilidad del injerto, era habitual (Nankivell & Al, 2010). En 1980, con el apareamiento de la inmunosupresión utilizando inhibidores de calcineurina y una mejor elección de los pacientes donantes y receptores, basado en sus características inmunológicas, disminuyó el riesgo de rechazo agudo. A pesar de eso, los episodios de rechazo actualmente se producen con mayor severidad que antes y los porcentajes de supervivencia del aloinjerto no han variado (Meier-Kriesche, Schold, Srinivas, & Kaplan, 2004).

En un estudio realizado en pacientes con trasplante renal entre los años 2007 y 2012 en Cuenca, Ecuador, se encontró que seis meses después del trasplante, el 43.4 por ciento de los pacientes presentaron rechazo agudo (Carrión Monsalve, Espinoza Manzano, & Flores Enderica, 2012).

Pese a los avances en los tratamientos de inmunosupresión, la eficacia de estas terapias se ha visto obstaculizada por correlaciones inexactas entre las dosis y/o concentraciones administradas de los fármacos y los resultados o efectos adversos, lo que ha contribuido a la morbilidad de los pacientes que han recibido un trasplante (Lo, Kaplan, & Kirk, 2014).

El enfoque actual para el tratamiento del rechazo agudo es uniforme, a pesar de que se conoce que algunos episodios de rechazo no son totalmente reversibles, conduciendo a la disfunción y fracaso del aloinjerto a largo plazo, mientras que otros son fácilmente tratables (Opelz, 1997). El reconocimiento de que cada paciente tiene un repertorio inmunológico único ha centrado el interés en realizar terapias de inmunosupresión de forma individual. Para eso, algunas pautas han sido validadas en estudios prospectivos para dirigir terapias personalizadas; sin embargo, la imprecisión en la capacidad predictiva de las pruebas de diagnóstico para determinar cualquier rechazo aumenta la dificultad de manejo terapéutico direccionado (Lo, Kaplan, & Kirk, 2014).

Pese a que los niveles de creatinina en suero del paciente pueden dar una idea de un posible rechazo renal, los rechazos subclínicos pueden

determinarse únicamente con la biopsia del injerto; por lo que en dicho escenario, al no existir una evidente disfunción renal, puede dañar el órgano (Nankivell, y otros, 2003). Al ser la biopsia la prueba validada para determinar el rechazo de aloinjerto, influye tanto en el pronóstico de su estado así como la terapia que se llevará cabo en el paciente (Halloran, 2004).

La biopsia por punción percutánea del aloinjerto renal se utiliza actualmente para el diagnóstico de rechazo agudo (Hartono, Muthukumar, & Suthanthiran, 2010). Aunque la biopsia sigue siendo considerado el "estándar de oro" en el diagnóstico de la disfunción del injerto, tiene sus limitaciones (Naqvi, Jafri, Imani, Mubarak, & Muzaffar, 2011).

En el procedimiento de la biopsia del aloinjerto, se pueden presentar complicaciones como hematuria, anuria, hematoma perirrenal, hemorragia y shock, fístulas arteriovenosas, y hasta la pérdida del injerto (Huraib, y otros, 1989). Además de ser un procedimiento invasivo, la biopsia puede tener errores de muestreo y variaciones inter observador por lo tanto, se necesitan varias muestras para aumentar la precisión diagnóstica (Sorof, y otros, 1995). Riesgos y complicaciones relacionadas con el procedimiento limitan su aplicación rutinaria en un programa de trasplante de donante emparentado vivo y seguimiento post trasplante (Naqvi, Jafri, Imani, Mubarak, & Muzaffar, 2011).

2. Justificación del Problema

La enfermedad renal en etapa terminal requiere como tratamiento decisivo el trasplante de riñón; sin embargo, este tipo de intervenciones quirúrgicas representan demandas elevadas de órganos respecto a los disponibles, sin contar con los riesgos que conlleva toda operación (Tonelli, y otros, 2011). Cabe destacar que un trasplante exitoso no garantiza el mantenimiento del aloinjerto a largo plazo. En Estados Unidos, aproximadamente el 35 por ciento de los pacientes trasplantados tiene un episodio de rechazo agudo luego del primer año del trasplante y un 75 por ciento aproximadamente de estos pacientes perdieron el injerto debido a un daño irreversible (Hariharan, y otros, 2000). En Ecuador se manejan cifras del

43.4 por ciento de los receptores de aloinjertos que presentan rechazo agudo, y alrededor de 34 por ciento de los mismos perdieron el injerto (Carrión Monsalve, Espinoza Manzano, & Flores Enderica, 2012).

El desarrollo del rechazo agudo actualmente es difícil de predecir, para lo cual se tiene como prueba “gold standard” a la biopsia por punción percutánea para observar las características histológicas del injerto (Matas, y otros, 1983). La biopsia del aloinjerto, al ser un procedimiento invasivo, puede generar complicaciones como hematuria, hematoma perirrenal, hemorragia, fistulas arteriovenosas, entre otras, llegando incluso a la pérdida del injerto (Huraib, y otros, 1989).

Varios estudios han demostrado que mediante el uso de biomarcadores no invasivos se puede identificar el rechazo agudo renal de manera temprana (Lo, Kaplan, & Kirk, 2014). Algunas de estas investigaciones han implementado una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) para analizar los niveles de ARN mensajero específicos dentro de las células urinarias de los pacientes trasplantados (Muthukumar, y otros, 2005). Implementar esta técnica no invasiva permitiría un diagnóstico temprano del rechazo agudo mediante la detección de niveles elevados de productos de linfocitos T CD8+ (Li, y otros, 2001), integrinas (Ding, y otros, 2003), quimiocinas y combinaciones quimiocina-receptor que promueven el reclutamiento de células T efectoras hacia el aloinjerto (Tatapudi, y otros, 2004).

Diversos estudios revelaron el papel de los linfocitos T reguladores CD4+CD25+ en la supresión de la autoinmunidad y en ciertos tipos de tolerancia inmune, los cuales expresan de manera específica un factor regulador de la transcripción llamado forkhead box P3 (FOXP3), que participa directamente en la función de estas células. Hasta la actualidad FOXP3 es considerado el principal marcador molecular de esta subpoblación reguladora (González Parias, Duque Giraldo, & Velásquez-Lopera, 2010).

La cantidad de células T reguladoras (Treg) en el humano, que expresan el factor de transcripción FOXP3, aumenta durante un episodio de rechazo agudo de aloinjerto (Muthukumar, y otros, 2005).

Considerando la función predominante de los linfocitos T reguladores en el control de la autotolerancia (Sakaguchi S. , 2005) y su función supresora en modelos experimentales de tolerancia al trasplante (Zheng, y otros, 2003), varios estudios de medición del ARNm de FOXP3 en células urinarias se han llevado a cabo debido a que puede indicar los eventos inmunológicos dentro de un aloinjerto renal sometido a rechazo agudo, y muchos de ellos con resultados alentadores (Muthukumar, y otros, 2005) (Aquino-Dias, y otros, 2008) (Afaneh, y otros, 2010).

En Ecuador, hasta el momento no se han realizado estudios sobre biomarcadores para su evaluación y validación como una prueba de apoyo en el diagnóstico temprano de rechazo agudo post trasplante, constituyéndose como el inicio de un estudio pionero en el país.

El objetivo de este proyecto es implementar y optimizar un sistema de RT-PCR cuantitativo que permita analizar la expresión del biomarcador urinario FOXP3 ARNm para su futura utilización como posible indicador temprano de rechazo agudo en pacientes sometidos a trasplante renal.

3. Objetivos del proyecto

3.1. *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.

3.2. *Objetivos específicos*

- 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 gel 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).

4. Marco teórico

4.1. *Trasplante renal*

El trasplante renal es un procedimiento quirúrgico para colocar un riñón de un donante vivo o muerto en un paciente cuyos riñones no poseen funcionamiento normal. En el momento en el que los riñones pierden su capacidad de filtrar, desechos peligrosos y exceso de líquido empiezan a acumularse en la sangre y en todo el cuerpo. Esta condición se conoce como insuficiencia renal o enfermedad renal en etapa terminal (ESRD) (Mayo Clinic Staff, 2015).

Los pacientes con enfermedad renal en etapa terminal tienen dos opciones de tratamiento: el retiro de residuos de su torrente sanguíneo, conocido como diálisis, o el trasplante de riñón. Procedimientos con los cuales el paciente trasplantado pueden mantenerse con vida (Mayo Clinic Staff, 2015).

Avances considerables en la supervivencia y función del injerto a largo plazo han transformado al trasplante de riñón en la alternativa más rentable de tratamiento, comparado con la diálisis (Collins, 2015). En los Estados Unidos se han llevado a cabo más de 375.000 trasplantes de riñón y hasta el 2012, 191.400 pacientes mantuvieron el riñón trasplantado en funcionamiento (Matas, y otros, 2014).

4.2. *Rechazo del aloinjerto renal*

El rechazo del aloinjerto renal consiste en el desarrollo de una respuesta inmune del receptor al interactuar con los aloantígenos del órgano del donante, debido a que se realiza el trasplante de riñón de un donante que

difiere genéticamente con el receptor. La respuesta generada destruye al injerto si no es controlada a tiempo (Nankivell & Al, 2010). La disfunción del riñón provocada por el rechazo al aloinjerto es un problema común y es el principal obstáculo para el éxito del trasplante a mediano y largo plazo (Zhang R. , 2014).

Varias son las características del donante que influyen en una mayor o menor posibilidad de desarrollo de rechazo y, por lo tanto, en la decisión de sí se acepta o no el riñón, tales como edad, presencia de hipotensión o hipertensión, daño renal, isquemia prolongada en donantes fallecidos, entre otras (Terasaki, Cecka, Gjertson, & Takemoto, 1995). Por otro lado, con la donación de un paciente vivo, sea relacionado con el receptor o un donante altruista, en óptimas condiciones y con tiempos menores de isquemia, se obtienen excelentes resultados, así exista gran diferencia genética en el genotipo HLA (Antígeno Leucocitario Humano) entre ellos (Terasaki, Cecka, Gjertson, & Takemoto, 1995).

Incluso antes del trasplante renal, se inicia la amenaza inmunológica por muerte cerebral del donante o daño isquémico perioperatorio, el cual induce una sobreexpresión de antígenos HLA en el injerto. Este aumento en la presencia de antígenos HLA intensifica la respuesta inmunitaria, por lo tanto, se incrementa la infiltración celular y el riesgo de rechazo (Kim, Bedi, Denecke, Ge, & Tullius, 2008).

El rechazo de aloinjerto se puede clasificar dependiendo de varios criterios. La clasificación más importante es según el momento post trasplante de desarrollo del rechazo, que puede ser hiperagudo, agudo acelerado, agudo o crónico (Nankivell & Al, 2010).

Otros criterios de clasificación del rechazo renal comprenden cambios fisiopatológicos (celular-intersticial, vasculares, anticuerpo-endotelial), gravedad del rechazo (grado de inflamación histológica y lesiones, dado por el esquema de Banff) (Haas, y otros, 2014), respuesta al tratamiento (presencia o ausencia de resistencia a glucocorticoides), presencia o ausencia de disfunción renal (lo cual indica rechazo agudo o subclínico,

respectivamente), y mecanismos inmunológicos (innato o adaptativo) (Nankivell & Al, 2010).

4.2.1. Rechazo hiperagudo

El rechazo hiperagudo es un proceso que inicia minutos después del trasplante renal y generalmente termina por la eliminación del injerto (Nankivell & Al, 2010). Este tipo de rechazo se produce por una acción de anticuerpos previamente formados contra moléculas del HLA que se expresan en el endotelio glomerular y vascular (Colvin, 2007). El sistema inmune innato actúa activando el sistema del complemento intrainjerto, lo cual provoca necrosis del endotelio y coagulación intravascular en el órgano trasplantado (Terasaki P. , 2003).

4.2.2. Rechazo agudo acelerado

El rechazo agudo acelerado puede ocurrir entre uno y varios días después del trasplante (Kumbala & Zhang, 2013). Al existir una exposición previa del antígeno específico, se genera una respuesta anamnésica por las células B y T de memoria que produce rápidamente gran cantidad de anticuerpos y respuesta celular respectivamente (Nankivell & Al, 2010) (Kumbala & Zhang, 2013).

4.2.3. Rechazo agudo

El rechazo agudo (AR) se desarrolla generalmente en los primeros 3 a 6 meses post trasplante; sin embargo, puede ocurrir en cualquier momento durante la vida de un aloinjerto renal. El rechazo agudo puede ser mediado por células T, mediado por anticuerpos o ambos. Es más común y reversible este tipo de rechazo comparado con el rechazo hiperagudo y agudo acelerado (Zhang, Kumar, Ramcharan, & Reisin, 2004).

4.2.4. Rechazo crónico

El rechazo crónico es una lesión inmune en curso para el injerto, la cual se desarrolla luego de varios meses o años. Este rechazo se produce al no mantener el tratamiento de inmunosupresión para controlar los linfocitos o anticuerpos residuales contra los antígenos del aloinjerto renal. El rechazo crónico genera disminución progresiva de la función renal e infiltración en el parénquima e intersticio renal por células T y macrófagos (Solez, y otros, 2008). Por lo general es irreversible y no hay intervención efectiva para este tipo de rechazo (Djamali, y otros, 2014).

4.3. Rechazo agudo a aloinjerto renal

El rechazo agudo renal consiste en un deterioro súbito de la función de un riñón trasplantado debido a una respuesta inmune destructiva del paciente receptor al aloinjerto del donante (Hartono, Muthukumar, & Suthanthiran, 2010), lo cual se transforma en un factor de riesgo para el fracaso de injerto renal (Cecka, 1998).

Algunos episodios de rechazo agudo renal no son completamente reversibles, lo que conducen a la disfunción y fracaso del riñón a largo plazo, mientras que otros son tratables (Opelz, 1997).

El rechazo agudo, pese a que ha tenido una decreciente incidencia a lo largo de los últimos años debido a avances en la terapia inmunosupresora y comprensión de sus mecanismos moleculares (Hartono, Muthukumar, & Suthanthiran, 2010), continúa siendo un importante inconveniente dentro del trasplante renal (Meier-Kriesche, Schold, Srinivas, & Kaplan, 2004).

Aproximadamente el 35 por ciento de los pacientes trasplantados tienen un episodio de rechazo agudo antes del primer año luego del trasplante (Hariharan, y otros, 2000). Los pacientes que han sufrido un episodio de rechazo agudo poseen una vida media proyectada de su aloinjerto cuatro años menor que los pacientes que no lo han padecido (Cecka, 1998).

Dentro del rechazo agudo, el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) juega un papel importante ya que codifica el sistema HLA, en donde, si existe diferencias entre el HLA del donante y del receptor, aumenta las probabilidades de rechazo (Trowsdale & Parham, 2004). Cabe destacar que diferencias en pocos aminoácidos en el sitio de unión al péptido del MHC bastan para inducir rechazo del aloinjerto renal.

En el rechazo agudo de aloinjerto renal, el sistema inmune innato cumple un papel importante en la aceleración del rechazo y reclutamiento de linfocitos. Cabe señalar que, como se mencionó anteriormente, el rechazo agudo puede ser mediado por células T, mediado por anticuerpos o ambos.

4.3.1. El sistema inmune innato en el rechazo agudo renal

Las vías de inflamación generan una regulación al alza de las moléculas de daño innatas, acelerando el proceso de rechazo renal activando y reclutando linfocitos T, ya sea directa o indirectamente (Nankivell & Al, 2010).

Los tejidos lesionados expresan ligandos del sistema TLR (Receptor de tipo Toll) denominados moléculas DAMP (patrón molecular asociado a daño), así como otras moléculas innatas de peligro. Los TLRs tienen la capacidad de detectar, aparte de patógenos, moléculas de tejido extraño y con lo cual generan factores de activación y maduración de células dendríticas que promueven el rechazo agudo (Kim, Bedi, Denecke, Ge, & Tullius, 2008) (Alegre, y otros, 2008).

El sistema de complemento, parte de la inmunidad innata, genera las proteínas C3a y C5a, que activan los linfocitos T dentro del injerto y células presentadoras de antígenos (APCs) directamente (Zhou, Medof, Heeger, & Sacks, 2007).

De la misma forma, en la superficie del endotelio del riñón se produce un incremento de antígenos relacionados con la secuencia del péptido A del MHC de clase I (MICA), lo que puede activar linfocitos T CD8+ y células NK (Zou, Stastny, Süsal, Döhler, & Opelz, 2007).

Los macrófagos activados deterioran la función del injerto al secretar varias citocinas (IL-1, IL-12, IL-18, TNF α e IFN- γ), y aumentan el rechazo mediado por linfocitos T (Wyburn, Jose, Wu, Atkins, & Chadban, 2005).

4.3.2. Rechazo mediado por anticuerpos

Los anticuerpos que intervienen en el proceso de rechazo de aloinjerto renal son los que reaccionan contra antígenos de células endoteliales, del grupo sanguíneo ABO y moléculas del HLA. Cabe resaltar que, a excepción de casos especiales como pacientes con trasplantes anteriores o pacientes expuestos a aloantígenos, la mayor parte de receptores no cuentan con anticuerpos para moléculas del HLA pre trasplante (Nankivell & Al, 2010).

El rechazo mediado por anticuerpos, el cual inicia días después del trasplante, provoca la disfunción del aloinjerto rápidamente al generar inflamación (Nankivell & Al, 2010). Los antígenos del MHC expresados en el endotelio de los capilares peritubular y glomerular del donante son las principales moléculas a detectarse por dichos anticuerpos; en donde, luego de darse la unión antígeno-anticuerpo, se desencadena la fijación del complemento (Figura 1) (Terasaki P. , 2003).

Tras el daño producido en el endotelio, las células endoteliales segregan varias moléculas de daño, las cuales inducen agregación plaquetaria (factor von Willebrand y P-selectina), producen que leucocitos se adhieran al glomérulo o a capilares peritubulares (citocinas como IL-1 α y IL-8, y quimiocinas como CCL2) y activan la vía clásica del complemento (quimioatrayentes C3a y C5a) (Colvin, 2007).

La activación del sistema de complemento y formación del complejo membrana-ataque causa necrosis y apoptosis de las células endoteliales, así como su desprendimiento de la membrana basal (Colvin, 2007).

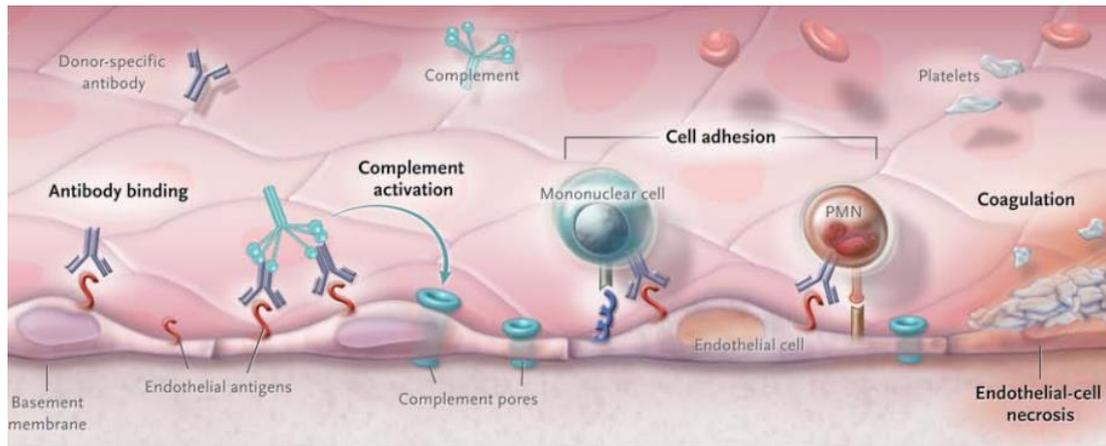


Figura 1. Rechazo agudo renal mediado por anticuerpos.

Fuente: (Nankivell & Al, 2010).

Los anticuerpos se unen a los antígenos del donante expresados en la superficie de las células endoteliales en los vasos de injerto. La unión antígeno-anticuerpo favorece la activación del complemento, que da como resultado la adhesión celular y la necrosis de las células endoteliales, seguido de deposición de plaquetas y coagulación. PMN: células polimorfonucleares.

4.3.3. Rechazo mediado por células T

El rechazo mediado por células T es el rechazo agudo de injerto renal más común, el cual se produce al presentar los aloantígenos del donante a los linfocitos T del receptor mediado por las células presentadoras de antígenos (APCs) (Nankivell & Al, 2010).

4.3.3.1. Presentación del aloantígeno

Las células dendríticas inmaduras transportan el antígeno del donante desde el riñón trasplantado hacia los ganglios linfáticos y el bazo. Las células dendríticas inmaduras pueden provenir del donante, que se encuentran presentes intrainjerto, o del receptor, las cuales circulan a través del riñón (Larsen, Morris, & Austyn, 1990).

Conforme se movilizan, las células dendríticas (DC) maduran en APCs y viajan a los órganos linfoides, donde activan los linfocitos T del receptor; las cuales se diferencian, migran al órgano trasplantado y participan en la destrucción del mismo (Nankivell & Al, 2010).

Las células dendríticas y los macrófagos presentan el antígeno a las células T de manera eficiente; sin embargo, pueden funcionar como APCs las células B, mediante las moléculas MHC de clase II, las células epiteliales y endoteliales tubulares, que participan sensibilizando las células T en la periferia o en órganos linfoides internos en el aloinjerto (Hagerty & Allen, 1992).

4.3.3.2. Reconocimiento de aloantígeno por las células T

Alrededor de 1 en 10⁵ a 10⁶ linfocitos T responden normalmente a un antígeno específico (Gudmundsdottir & Turka, 2001); sin embargo, la cantidad de linfocitos T que responden en un trasplante renal aumenta, llegando a porcentajes de 1 a 10 por ciento (Suchin, y otros, 2001).

Los linfocitos T del receptor pueden detectar los antígenos del donante presentados tanto por las APCs del donante, que se conoce como vía directa, como por las APCs del receptor, denominada vía indirecta y es similar al proceso de reconocimiento de antígenos extraños al organismo (Figura 2) (Vella, Vos, Carpenter, & Sayegh, 1997). Al inicio del rechazo, pocos linfocitos T reconocen los antígenos por la vía indirecta; sin embargo, al agotarse los APCs del donante, esta vía adquiere mayor protagonismo en el rechazo (Womer, Sayegh, & Auchincloss, 2001). Las APCs del receptor pueden incluso desarrollar una vía semidirecta tomando fragmentos de membrana de otras células que contienen moléculas de MHC con péptidos pre-digeridos del MHC del donante, los cuales pueden ser presentados a los linfocitos T CD4+, que activan a los linfocitos T CD8+ (Ely, Burrows, Purcell, Rossjohn, & McCluskey, 2008).

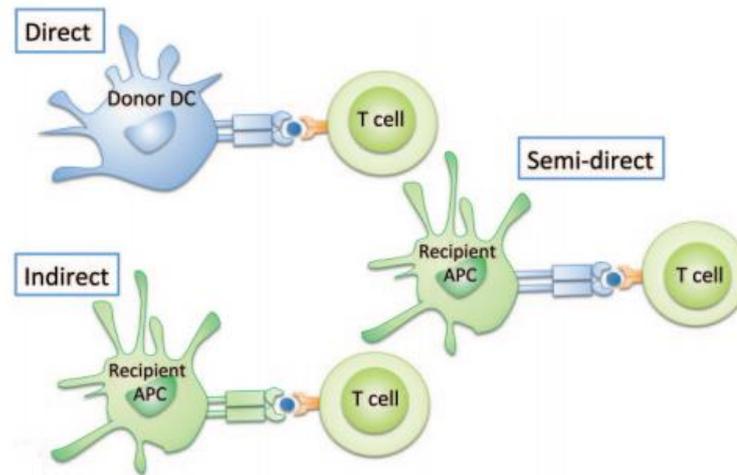


Figura 2. Vía directa, indirecta y semidirecta de alorreconocimiento.

Fuente: (Wood & Goto, 2012).

La vía directa es la interacción de las células T del receptor a través de los TCR con complejos MHC-péptido alogénicos presentados por las APCs del donante. La vía indirecta se produce cuando péptidos derivados del MHC del donante son degradados por las vías de procesamiento de antígenos y presentados por las APCs del receptor. La vía semi-directa es la captura de complejos MHC-péptido del donante por las APCs del receptor. DC: Célula dendrítica.

4.3.3.3. Diferenciación de células T y movimiento en el aloinjerto

Luego de la presentación del antígeno del donante por las APCs, los linfocitos T se activan, proliferan y diferencian en subtipos con funciones diferentes y citocinas características (Zha, Ghobrial, Busuttil, & Kupiec-Weglinski, 1999). Las células T helper tipo 1 (Th1) median la respuesta inmune celular, las células T helper tipo 2 (Th2) inducen la respuesta inmune humoral, las células T helper tipo 17 (Th17) producen el rechazo resistente a glucocorticoides, y las células T reguladoras (Treg) pueden limitar la respuesta al rechazo (Figura 3) (Nankivell & Al, 2010).

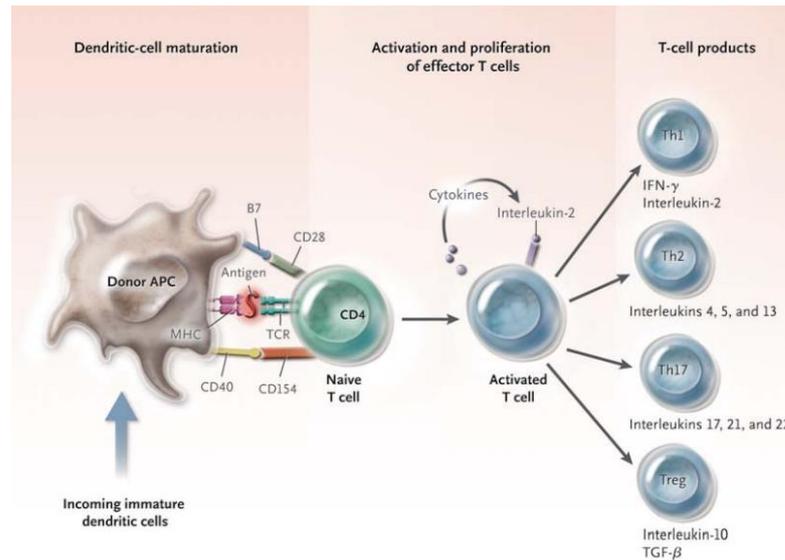


Figura 3. Activación de los linfocitos T.

Fuente: (Nankivell & AI, 2010).

Después de la presentación de antígeno por las APCs, los linfocitos T vírgenes se activan, proliferan y se diferencian en subtipos con perfiles de citocinas diferentes: las células Th1, Th2, Treg y Th17. APC: célula presentadora de antígeno, IFN- γ : interferón- γ , MHC: complejo mayor de histocompatibilidad, TCR: receptor de células T, y TGF- β : factor de crecimiento transformante β .

Los linfocitos T utilizan moléculas de adhesión, tales como el antígeno asociado a la función leucocitaria 1 (LFA-1), mediante las cuales permiten sujetarse y rodar a lo largo del endotelio, para luego movilizarse a través de los capilares peritubulares e ingresar al aloinjerto (Briscoe, Alexander, & Lichtman, 1998). De esta manera, linfocitos T CD4+, linfocitos CD8+, demás células mononucleares, citocinas proinflamatorias y quimiocinas se acumulan en los sectores de rechazo agudo mediado por células (Hoffmann, y otros, 2005).

4.3.3.4. Acción de las células T efectoras en el aloinjerto

Las células T intervienen en la lesión de manera directa al contacto con las células epiteliales tubulares y con la acción de citocinas liberadas en el sitio de ataque. De forma indirecta, los linfocitos T activan células endoteliales inflamatorias y vasculares para lesionar al injerto (Barry & Bleackley, 2002).

Los linfocitos T CD8+ liberan perforina, cuya función es perforar la membrana de células objetivo, y granzimas A y B, que ingresan a las células para inducir apoptosis activando la vía de caspasas. También se activa un receptor de las células del injerto denominado Fas mediante el ligando del mismo nombre presente en la membrana de los linfocitos T CD8+; en donde la célula muere también por apoptosis mediada por caspasas (Barry & Bleackley, 2002).

Los linfocitos T CD4+ pueden atacar células que expresan antígenos del MHC menos relevantes (Zorn, y otros, 2004), y también secretan factor de necrosis tumoral alfa y beta (TNF- α y TNF- β), los cuales se unen a los receptores en las membranas de las células endoteliales o tubulares, sometiéndolas a apoptosis (Al-Lamki, y otros, 2001).

En aloinjertos renales con rechazo agudo, los linfocitos T se infiltran y multiplican dentro del espacio intersticial. Luego se internan e invaden los túbulos renales, produciendo tubulitis. Además, los linfocitos T internalizados secretan citocinas proinflamatorias que activan las células epiteliales tubulares, las cuales secretan quimiocinas, tales como CCL2, CCL5, y CX3CL1, que atraen más linfocitos T (Robertson & Kirby, 2003). Los linfocitos T CD8+ atraídos y con especificidad inmunológica para atacar al aloinjerto, cruzan la membrana basal e induce apoptosis de las células tubulares. Con la muerte de las células epiteliales tubulares, se da una ruptura de la membrana basal que genera pérdida de orina y disfunción del injerto (Bonsib, y otros, 2000).

4.4. Células T reguladoras

Los linfocitos T cumplen un papel central en la discriminación de lo propio, lo desconocido y la regulación de las respuestas inmunes no deseadas (Jiang & Chess, 2006). Estudios han identificado el papel de un subgrupo especializado de los linfocitos T CD4+CD25+, denominados linfocitos T reguladores (Treg), en la supresión de la autoinmunidad (Sakaguchi S. , 2005) (Schwartz, 2005). Ahora son reconocidos como una subpoblación de células supresoras altamente eficaces (Veronese, y otros, 2007).

Los linfocitos T reguladores CD4+CD25+ que se originan en el timo de forma normal actúan a nivel periférico suprimiendo la activación y el aumento poblacional de células T reactivos al propio organismo, los cuales se encuentran normalmente en el sistema inmunitario. El control que ejercen las células T reguladoras sobre las células T efectoras puede ser directo o indirecto, este último con la ayuda de las células presentadoras de antígenos (APCs) (Sakaguchi S. , 2005).

Existen evidencias que comprueban que las células T reguladoras CD4+CD25+ actúan en el control negativo de varias respuestas inmunitarias, como en la prevención de enfermedades autoinmunes, tolerancia inmunológica a antígenos extraños provenientes de órganos o tejidos trasplantados y prevención de alergias, y también en el control positivo de dichas respuestas, como en el incremento de defensas dentro de la inmunidad tumoral y microbiana (Sakaguchi S. , 2004).

Las células T reguladoras (Treg) se relacionan con algunos tipos de tolerancia inmune; pero en el humano la cantidad de estas células aumenta durante un episodio de rechazo agudo de aloinjerto, y no se tiene claro aún si estas células proliferan con el objetivo de detener la respuesta inmune o simplemente como consecuencia de la activación de linfocitos T inmaduros (Muthukumar, y otros, 2005). Aunque, durante una respuesta inmune celular, se puede esperar que los linfocitos T reguladores aumenten en número para controlar y limitar esta respuesta en última instancia (Batsford, y otros, 2011).

Cabe destacar que en algunos estudios se comprobó que el número de linfocitos Treg se correlaciona con marcadores de rechazo renal mediado por células T, los cuales incluyen inflamación intersticial, tubulitis, y expresión del gen citotóxico; sin embargo, no se correlacionó con implicaciones en el injerto. Por lo tanto, se concluyó que los linfocitos T reguladores colaboran en la estabilización del proceso de inflamación intrainjerto (Bunnag, y otros, 2008).

La mayoría de los linfocitos T reguladores CD4+ expresan la molécula CD25 que funciona como un receptor de la cadena α de la IL-2 (IL-2R α) (Sakaguchi, Sakaguchi, Asano, Itoh, & Toda, 1995). Las células T reguladoras también expresan de manera específica FOXP3 que es un factor de

transcripción clave en el control del desarrollo y función celular (Hori, Nomura, & Sakaguchi, 2003) (Fontenot, Gavin, & Rudensky, 2003).

4.4.1. Forkhead box P3 (FOXP3)

El síndrome de inmunodeficiencia ligada al cromosoma X IPEX (síndrome de desregulación inmune, poliendocrinopatía, enteropatía, ligado al cromosoma X) se asocia a varias enfermedades autoinmunes causantes de afecciones en órganos endocrinos (tiroiditis, diabetes tipo I), inflamaciones de intestino, alergias severas (dermatitis, alergia a los alimentos), entre otras (Gambineri, Torgerson, & Ochs, 2003). Este síndrome es mortal en la infancia (Bennett, y otros, 2001).

IPEX se produce debido a mutaciones en el gen forkhead box P3 (FOXP3), el cual codifica el factor de transcripción FOXP3 (X-linked forkhead/winged helix transcription factor) (Fontenot, Gavin, & Rudensky, 2003). Los linfocitos T reguladores expresan específicamente el gen FOXP3 y es importante para su actividad y desarrollo (Hori, Nomura, & Sakaguchi, 2003) (Fontenot, Gavin, & Rudensky, 2003).

El gen FOXP3 humano se localiza en la región cromosómica Xp11.23 y se encuentra formado por 11 exones, los cuales codifican una proteína de 431 aminoácidos (González Parias, Duque Giraldo, & Velásquez-Lopera, 2010).

FOXP3 (o Foxp3 en ratones) se considera luego de varios estudios como un gen maestro en el control del desarrollo y la función de los linfocitos T reguladores; en donde la actividad de estas células se encuentra programada y depende genéticamente del factor de transcripción FOXP3 (Sakaguchi S. , 2005).

Varios estudios han identificado algunas vías de señalización que promueven la expresión del gen FOXP3; sin embargo, los mecanismos exactos de expresión en las células Treg no están completamente claros. Se necesita de una señalización a través del TCR, moléculas coestimuladoras y receptores de citocinas para inducir la transcripción del gen FOXP3 (Figura 4) (González Parias, Duque Giraldo, & Velásquez-Lopera, 2010).

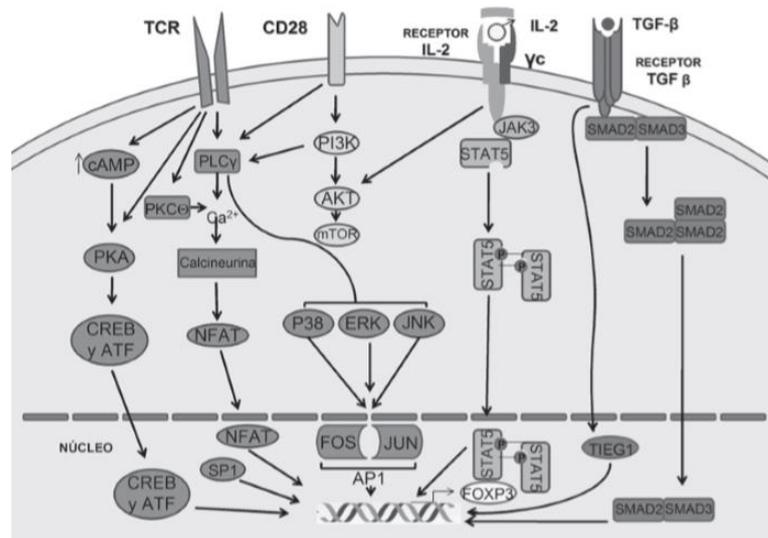


Figura 4. Diferenciación de células Treg y expresión de FOXP3.

Fuente: (González Parias, Duque Giraldo, & Velásquez-Lopera, 2010).

La expresión de FOXP3 es dependiente de la señalización a través del TCR, del CD28, de receptores de citocinas que comparten la cadena gamma común γ (γ c) (IL 2,4,7,9,15, y 21) y del receptor del factor estimulante de crecimiento β (TGF- β R).

El factor de transcripción FOXP3 controla la expresión de algunos genes que codifican moléculas asociadas a las células T reguladoras, que son importantes en su función supresora, tales como CD25, antígeno asociado al linfocito T citotóxico 4 (CTLA-4) y receptor del factor de necrosis tumoral inducible por glucocorticoides (GITR) (Hori, Nomura, & Sakaguchi, 2003).

Al igual que las células T reguladoras CD4+CD25+, los timocitos CD4+CD8-CD25+, que son precursores de las células T reguladoras naturales generadas normalmente en el timo, también expresan de manera específica FOXP3, contrario a otras células inmunitarias como células T, células B células NK y otros timocitos, las cuales no lo expresan. Cabe resaltar que los linfocitos T activados y diferenciados a células T helper tipo 1 y 2 (Th1 y Th2) tampoco expresan FOXP3 (Hori, Nomura, & Sakaguchi, 2003) (Fontenot, Gavin, & Rudensky, 2003).

La interrupción en la expresión de FOXP3 debido a mutaciones altera la función de las células T reguladoras, provocando hiperactivación de células T reactivas frente a antígenos propios, bacterias intestinales beneficiosas y sustancias ambientales, y así desarrollando enfermedades autoinmunes,

inflamatorias intestinales y alergias (Sakaguchi S. , 2005). Por lo anteriormente descrito, se corrobora el papel clave de los linfocitos T reguladores y de FOXP3 en la respuesta inmune frente a antígenos propios y extraños en el humano.

4.5. Biopsia renal

La biopsia renal consiste en la extracción de una muestra de tejido del riñón para su estudio al microscopio (Saludemia, s.f.). La biopsia por punción del aloinjerto es la prueba estándar para el diagnóstico de rechazo agudo renal (Huraib, y otros, 1989).

La biopsia por punción se considera la técnica más utilizada y habitual dentro de las biopsias renales. Esta técnica también es conocida como biopsia percutánea (Saludemia, s.f.). Consiste en la introducción de una aguja de biopsia al paciente a través de una pequeña incisión haciéndola llegar al interior del aloinjerto para la obtención de una muestra de tejido renal (Clinica Alemana, s.f.).

El diagnóstico del rechazo agudo se basa en el análisis histológico de la muestra de injerto obtenido en la biopsia (Geddes, Woo, & Jardine, 2002). Aunque la biopsia del injerto es la prueba de referencia para el diagnóstico de la disfunción del injerto, tiene sus limitaciones (Akhtar, y otros, 1998).

Este procedimiento con el tiempo se ha refinado, volviéndose más seguro, y la interpretación de la biopsia se ha estandarizado (Williams, Taheri, Tolkoff-Rubin, & Colvin, 2012). Sin embargo, todavía se presentan complicaciones que corresponden a una técnica invasiva, tales como hematuria, anuria, hematoma perirrenal, hemorragia e incluso pérdida del injerto (Beckingham, Nicholson, & Bell, 1994). También se presentan errores de muestreo y la variabilidad entre observadores en la lectura de biopsias problemáticas (Sorof, y otros, 1995) (Furness & Taub, 2001).

La imprecisión en la capacidad predictiva de esta prueba de diagnóstico de rechazo agudo de aloinjerto y el riesgo que la técnica conlleva aumenta la

dificultad de manejo terapéutico, limitando así su aplicación rutinaria en seguimiento de pacientes con trasplante renal (Lo, Kaplan, & Kirk, 2014).

4.6. Biomarcador

Un biomarcador se define como una característica celular, bioquímica, molécula o alteración genética que puede medirse y evaluarse objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patógenos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica, con lo cual tiene utilidad diagnóstica y pronóstica (Biomarkers Definitions Working Group, 2001) (Lesko & Atkinson, 2001).

4.6.1. Biomarcadores de rechazo agudo renal

Pese a que las posibilidades de elección de biomarcadores renales es aparentemente ilimitada, existen sólo tres fuentes que se pueden utilizar en la práctica para evaluar el estado de un aloinjerto de riñón: el tejido del injerto que se obtiene a través de una biopsia, orina y sangre, estas dos últimas consideradas no invasivas y las cuales no poseen los limitantes y riesgos de la biopsia mencionados anteriormente (Lo, Kaplan, & Kirk, 2014).

Con respecto al diagnóstico de rechazo agudo renal mediante la evaluación de biomarcadores no invasivos, hay que considerar que las muestras de sangre y orina se obtienen fácil y económicamente, sin contar con la posibilidad de seguimiento en el tiempo. Esta capacidad de monitorización sería importante debido a la creciente comprensión de la variación dinámica del estado inmunitario del paciente post trasplante (Ting, Coates, Walker, & Alexander, 2012).

Pese a los beneficios descritos, la sangre periférica es un medio remoto y diluido dentro de evaluación de los eventos que ocurren intrainjerto. También, aunque se supone acertada una evaluación en sangre debido al tráfico de células inmunes o factores liberados como resultado de la inflamación del aloinjerto, son también una fuente no específica, particularmente aquellos biomarcadores asociados con infecciones remotas o

inflamación. Una mayor atención por parte de los investigadores se está dirigiendo hacia la orina como una fuente potencial de biomarcadores de rechazo agudo, ya que se deriva del propio aloinjerto renal. La proximidad de la orina al aloinjerto disminuye la posibilidad de tener eventos no específicos al riñón trasplantado y de confundir a los resultados (Lo, Kaplan, & Kirk, 2014).

Un biomarcador renal puede ser una molécula de membrana (expresada por células epiteliales tubulares TEC renales o por leucocitos filtrados en el sitio de la lesión local) o moléculas secretadas tales como citocinas. Este biomarcador puede ser expresado o liberado por actividad proteolítica durante la inflamación. También un biomarcador puede estar presente en condiciones normales, pero sobreexpresarse durante la inflamación (Nickerson, 2009).

Algunas investigaciones han realizado estudios de análisis de los niveles de ARN mensajero de productos inmunes de las células presentes en la orina y sangre de los pacientes trasplantados (Muthukumar, y otros, 2005), detectando niveles elevados de productos de linfocitos T CD8+ (Li, y otros, 2001), integrinas (Ding, y otros, 2003), quimiocinas y combinaciones quimiocina-receptor que promueven el reclutamiento de células T efectoras hacia el aloinjerto (Tatapudi, y otros, 2004), entre otros.

4.6.2. *FOXP3 como biomarcador de rechazo agudo renal*

Considerando el papel dominante de las células T reguladoras en el mantenimiento de la autotolerancia y en vista de su función supresora en modelos experimentales de tolerancia al trasplante, se razonó que la medición de los niveles de ARNm del gen FOXP3 en células del sedimento urinario pueden dar una idea de los eventos inmunológicos dentro de un aloinjerto renal sometido a rechazo agudo, demostrándose en varios estudios que es un biomarcador preciso para la predicción de episodios de rechazo agudo renal.

El papel del biomarcador FOXP3 ARNm que se expresa en las células T reguladoras en el trasplante se está estudiando en varios laboratorios (Hartono, Muthukumar, & Suthanthiran, 2010).

En un estudio realizado por Muthukumar y otros (2005) se informó que los niveles de ARNm de FOXP3 en las células urinarias se incrementan durante un episodio de rechazo agudo renal, y que estos niveles están inversamente correlacionados con los niveles de creatinina en suero medidos en el momento de la biopsia al grupo con rechazo agudo.

En otra investigación llevada a cabo por Aquino-Dias y otros (2008) se informó que los niveles de ARNm para perforina, granzima B, FasL, PI-9 y FOXP3 de células urinarias predicen el rechazo agudo con alto grado de precisión. En dicho estudio, los niveles de FOXP3 ARNm fueron los más exactos y predijeron rechazo agudo renal con una sensibilidad y especificidad del 100%.

4.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polymerase chain reaction por sus siglas en inglés) en tiempo real es la técnica cuantitativa más sensible y fiable actualmente para el análisis de la expresión génica. Se ha aplicado ampliamente para la verificación de microarrays, cuantificación de patógenos, cuantificación del cáncer, determinación del número de copias transgénicas, estudios de terapia de drogas, entre otras (Yuan, Reed, Chen, & Stewart, 2006).

Con la llegada de la PCR en tiempo real y PCR a partir de ARN con transcripción reversa a ADNc (RT-PCR) en tiempo real, ha cambiado drásticamente el campo de la medición de la expresión génica (Wong & Medrano, 2005). En la PCR a tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea, sin necesidad de ninguna acción posterior (Costa, 2004). Mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN generado. Esta tecnología permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. (Higuchi, Fockler, Dollinger, & Watson, 1993). La dinámica de la PCR se observa normalmente a través de dos métodos: colorantes de unión (agente

intercalante) al ADN como SYBR® Green, y sondas de hibridación como Molecular Beacons® (Stratagene) o sondas TaqMan® (Applied Biosystems) (Bustin, 2000).

Una PCR tiene tres fases: la fase exponencial, fase lineal y fase de meseta. La fase exponencial es el segmento en el que producto aumenta exponencialmente ya que los reactivos no están limitados. La fase lineal se caracteriza por un aumento lineal de producto conforme los reactivos de la PCR se convierten en limitante. La PCR con el tiempo se llega a la fase de meseta durante los ciclos posteriores, en donde la cantidad de producto no cambiará debido a que algunos reactivos se agotan (Yuan, Reed, Chen, & Stewart, 2006).

En PCR en tiempo real los datos se cuantifican en términos absolutos o relativos. La cuantificación absoluta emplea una curva de calibración interna o externa para derivar el número de copias de la plantilla de entrada. En estos ensayos es importante determinar el número exacto de copias transcripcionales. La cuantificación relativa se basa en la comparación entre la expresión de un gen diana en comparación con un gen de referencia y la expresión de un mismo gen en la muestra diana frente muestras de referencia (Pfaffl, 2001).

4.7.1. Cuantificación Absoluta

La cuantificación absoluta utiliza una curva estándar que se genera a partir de diluciones seriadas de concentraciones conocidas con el objetivo de producir una relación lineal entre los Ct y las cantidades iniciales de ARN o ADNc en la reacción. El uso de la curva de calibración permite determinar la concentración de una muestra desconocida en función de sus valores de Ct (Heid, Stevens, Livak, & Williams, 1996).

El método de cuantificación absoluta es importante en ensayos que sea necesario determinar el número exacto de copias de plantilla inicial (Pfaffl, 2001). Además, se asume que todos los estándares y las muestras poseen

eficiencias de amplificación aproximadamente iguales (Wong & Medrano, 2005).

4.7.2. Cuantificación Relativa

La cuantificación relativa se utiliza principalmente en ensayos de expresión génica. En este caso se parte de los niveles del transcrito o ARNm de las muestras, por lo que es necesario realizar la transcripción reversa (RT) y los ensayos de RT-PCR en tiempo real (Aguilera, Ruiz Tachiquín, Rocha Munive, Pineda Olvera, & Chánez Cárdenas, 2004).

En un ensayo de la cuantificación relativa, los cambios en la expresión génica de la muestra se miden a partir de una muestra de referencia, también conocida como un calibrador (Livak & Schmittgen, 2001). Cuando se utiliza un calibrador, sólo se pueden determinar los cambios relativos del gen de interés con referencia al gen endógeno (Wong & Medrano, 2005). Existen varios modelos matemáticos disponibles para calcular la expresión génica normalizada de los ensayos de cuantificación relativa. Según el método empleado, se pueden dar resultados diferentes y medidas discrepantes de error estándar (Muller, Janovjak, Miserez, & Dobbie, 2002).

Dos modelos matemáticos son ampliamente aplicados: el modelo de eficiencia calibrada (Pfaffl, 2001) y el modelo $\Delta\Delta Ct$ (Livak & Schmittgen, 2001). Los sistemas experimentales para ambos modelos son similares. El experimento se lleva a cabo con una muestra control y una muestra tratamiento. Para cada muestra, un gen diana y un gen de referencia para el control interno se incluyen para amplificación por PCR en tiempo real a partir de alícuotas diluidas en serie. Varias repeticiones se suelen utilizar para cada concentración diluida, normalmente tres repeticiones, para obtener la eficiencia de amplificación. La eficiencia de amplificación de la PCR en tiempo real se puede definir como el porcentaje (de 0 a 1) o como el tiempo de aumento de producto de PCR por ciclo (de 1 a 2). El modelo de eficiencia de calibrado es un modelo $\Delta\Delta Ct$ más generalizada. El modelo matemático $\Delta\Delta Ct$ se obtiene al sustraer el número Ct del gen target, blanco o problema del Ct del gen control (Yuan, Reed, Chen, & Stewart, 2006).

Debido a que este método incluye una corrección no ideal para la eficiencia de amplificación, la eficiencia de amplificación del gen blanco y del gen de referencia del ensayo debe ser aproximadamente igual, por lo tanto, se trabaja con el supuesto de igualdad de eficiencia de amplificación. En el caso de que la eficiencia sea diferente para ambos genes, se debería optimizar las condiciones de reacción para cumplir dicho supuesto (Yuan, Reed, Chen, & Stewart, 2006).

4.8. Precisión de un ensayo

La precisión de un ensayo para medir variables biológicas es la estimación del potencial de error de medición, el cual debe ser determinado ya que frente a una calidad poco satisfactoria de datos biológicos puede terminar en hallazgos falsos y conclusiones erróneas (Hanneman S. K., Cox, Green, & Kang, 2011).

El error de medición puede darse por factores pre-analíticos, analíticos y post-analíticos. Los factores pre-analíticos corresponden a los pacientes, recolección, procesamiento y almacenamiento de muestras biológicas. Los factores analíticos son las posibles fuentes de error existentes en los pasos de ensayo, por ejemplo, reactivos, temperatura, equipos, técnico, etc. Los factores post-analíticos se refieren a los posibles errores en el manejo e interpretación de datos (Persson, Garde, AM, K, & B, 2008).

Para identificar y controlar el error analítico, se llevan a cabo generalmente ensayos biológicos con repeticiones y se calculan coeficientes de variación (CV) intraensayo e interensayo para determinar la precisión de la medición biológica (Hanneman S. K., Cox, Green, & Kang, 2011). La precisión intraensayo se refiere a la variabilidad en el análisis repetitivo de una muestra en un sólo ensayo, mientras que la precisión interensayo es la variabilidad en el análisis repetitivo de varias muestras y repeticiones del ensayo (de la Fuente & Rodríguez-Carranza, 1996).

El coeficiente de variación (CV) relaciona la desviación estándar para la media muestral y representa el grado de variabilidad de un ensayo. El CV

normalmente se presenta como un porcentaje de desviación de la media; cuanto mayor sea el valor de CV, mayor es el error en el ensayo (Hanneman S. K., Cox, Green, & Kang, 2011).

5. Hipótesis

La expresión génica del biomarcador urinario FOXP3 ARNm puede ser estudiado a partir de ARN extraído de muestras de orina mediante RT-qPCR.

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

1. Análisis de cebadores y sondas

Las secuencias de los cebadores y sondas de los genes blanco (FOXP3) y de referencia (18S) a utilizarse fueron obtenidas a partir del estudio realizado por Muthukumar y otros (2005). Se verificó que las secuencias correspondan a sus respectivos genes y no produzcan alineamientos indeseados, mediante la herramienta informática *Primer-BLAST* de NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Cada par de cebadores fueron analizados, con la ayuda de los paquetes de software *OligoAnalyzer 3.1* de Integrated DNA Technologies y *Oligo Calculator* desarrollado por Northwestern University, con el fin de examinar sus características termodinámicas y verificar que cumplan con parámetros estándares recomendados de diseño como: temperatura de melting (T_m), longitud, contenido de guanina-citosina (GC), posibilidad de formación de homodímeros y heterodímeros, entre otros.

Tras la síntesis por Invitrogen, se reconstituyeron los cebadores liofilizados añadiendo agua libre de nucleasas en un volumen necesario para obtener una solución de primers a una concentración de 100 μM , se incubaron por 24 horas a 4°C y se almacenaron los cebadores reconstituidos a -20°C.

Para determinar que los cebadores fueron reconstituidos correctamente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, configurando la fuente de poder a un voltaje constante de 100 voltios (V), amperaje de 300 miliamperios (mA) y tiempo de 40 minutos (min).

El protocolo para la preparación del gel y el procedimiento general para la corrida se detallan en el Anexo 1.

2. Extracción de ADN a partir de sangre total

La extracción de ADN a partir de sangre total se llevó a cabo mediante el uso del kit *PureLink® Genomic DNA Mini Kit* de Invitrogen™, y de acuerdo a modificaciones realizadas al protocolo recomendado por el fabricante.

El protocolo de extracción de ADN utilizado se detalla en el Anexo 2 (Invitrogen™, Life Technologies™, 2012).

3. Cuantificación de ADN por espectrofotometría

La cuantificación del ADN extraído se realizó en el equipo *NanoDrop™ 2000* de Thermo Scientific™, siguiendo las recomendaciones del fabricante, en el cual también se determinó su pureza biológica y química (radios 260/280 y 260/230 respectivamente).

El protocolo para el uso del equipo se especifica en el Anexo 3 (Thermo Scientific™, 2009).

4. Análisis cualitativo del ADN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa

Para determinar la presencia y la calidad del ADN extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, configurando la fuente de poder a un voltaje constante de 100 voltios (V), amperaje de 300 miliamperios (mA) y tiempo de 50 minutos (min).

5. Optimización de PCR convencional

Como paso inicial para de la optimización del sistema de RT-PCR, se estandarizó el sistema de PCR convencional del gen FOXP3, con el objetivo de tener un punto de partida en cuanto a concentración de cebadores en la reacción y temperatura de annealing en la programación del termociclador. La estandarización se llevó a cabo mediante el uso del kit *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* de Promega Corporation y de ADN de sangre total extraído previamente.

Se diseñó el sistema de PCR del gen FOXP3 que consistió en dupletas de control positivo y un control negativo sin ADN, para corroborar que no existe contaminación en los ensayos. Se llevaron a cabo modificaciones al protocolo recomendado por el fabricante del kit a un volumen final de reacción de 50 μL .

La configuración de la reacción de PCR del gen FOXP3 se muestra en la Tabla 1, donde se presentan las concentraciones de los reactivos utilizados, los volúmenes respectivos en una reacción del sistema y los volúmenes para el ensamblaje del máster mix. La programación estandarizada del termociclador se muestra en la Tabla 2.

Para determinar la temperatura de annealing del sistema, se realizaron ensayos con gradiente de temperatura respecto a la temperatura de annealing teórica de los cebadores. La concentración óptima de los cebadores en la reacción de PCR se definió mediante ensayos de variación de concentración y balance de primers.

Tabla 1.

Configuración de la reacción de PCR convencional para el sistema del gen FOXP3.

Componente	C. Inicial	C. Final	1X (μL)	3X (μL)
Primer Forward	30 μM	0.3 μM	0.50	1.50
Primer Reverse	30 μM	0.3 μM	0.50	1.50
dNTPs	20 mM	0.4 mM	1.00	3.00
MgCl₂	25 mM	1.5 mM	3.00	9.00
Green GoTaq® Flexi Buffer	5X	1X	10.00	30.00
Agua libre de nucleasas	-	-	29.75	89.25
GoTaq® DNA Polymerase	5 U/ μL	0.025 U/ μL	0.25	0.75
ADN*	15 ng/ μL	1.5 ng/ μL	5.00	-
Volumen Total (μL)			50.00	135.00

*Componente no presente en todas las reacciones. La muestra de ADN se añadió sólo en los controles positivos. El volumen que no se adicionó en el control negativo se reemplazó con agua libre de nucleasas.

Tabla 2.

Programación del termociclador para el ensayo de PCR convencional para el gen FOXP3.

Proceso	Temperatura	Tiempo	Número de Ciclos
Denaturación Inicial	94°C	4 min	1
Denaturación	94°C	1 min	
Annealing	65°C	1 min	35
Extensión	72°C	1 min	
Extensión Final	72°C	7 min	1
Espera	4°C	10 min	1

Para visualizar los resultados y comprobar la amplificación de los productos en los ensayos de PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, configurando la fuente de poder a un voltaje constante de 120 voltios (V), amperaje de 300 miliamperios (mA) y tiempo de 45 minutos (min).

6. Ensayo de sensibilidad analítica de PCR convencional

Luego de la optimización del sistema en PCR convencional del gen FOXP3, se llevó a cabo un ensayo de sensibilidad analítica con diluciones seriadas de ADN 1:10, con el objetivo de determinar hasta que concentración de ADN el sistema detecta y amplifica ácidos nucleicos.

Se inició a partir de una concentración inicial de ADN de 15 ng/μL, igual que en los ensayos de optimización del sistema. En seis microtubos estériles se colocaron a cada uno 9 μL de agua libre de nucleasas. En cada microtubo se añadió 1 μL de la dilución de ADN que le precedía. Se obtuvieron diluciones hasta una concentración de 0.015 pg/μL, es decir en un factor de 10⁻⁶ respecto a la concentración inicial de ARN. El procedimiento para la obtención de las muestras de ADN diluidas se visualiza en la Figura 5.

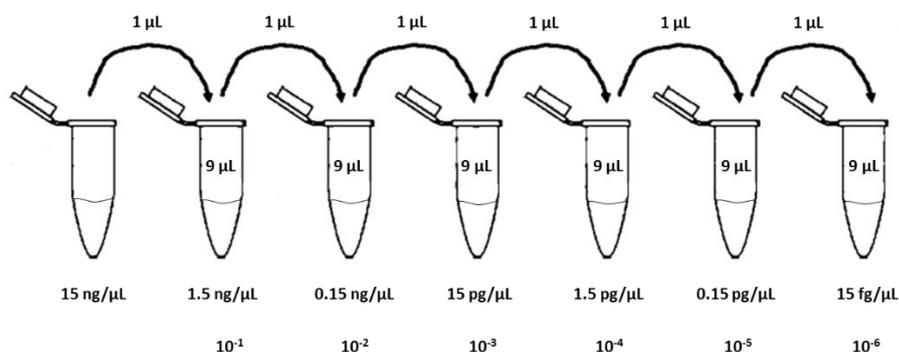


Figura 5. Procedimiento para la obtención de diluciones seriadas de ADN para el ensayo de sensibilidad analítica de PCR convencional.

Se generaron muestras diluidas con concentraciones desde 15 ng/μL hasta 15 fg/μL en proporciones 1:10.

La configuración de la reacción de PCR del gen FOXP3 para el ensayo de sensibilidad analítica se muestra en la Tabla 3, donde se presentan las concentraciones de los reactivos utilizados, los volúmenes respectivos en una reacción del sistema, y los volúmenes para el ensamblaje del máster mix.

Tabla 3.

Configuración de la reacción de PCR convencional para el ensayo de sensibilidad analítica del sistema del gen FOXP3.

Componente	C. Inicial	C. Final	1X (μL)	16X (μL)
Primer Forward	30 μM	0.3 μM	0.50	8.00
Primer Reverse	30 μM	0.3 μM	0.50	8.00
dNTPs	20 mM	0.4 mM	1.00	16.00
MgCl₂	25 mM	1.5 mM	3.00	48.00
Green GoTaq® Flexi Buffer	5X	1X	10.00	160.00
Agua libre de nucleasas	-	-	29.75	476.00
GoTaq® DNA Polymerase	5 U/μL	0.025 U/μL	0.25	4.00
ADN*	Δ1	Δ2	5.00	-
Volumen Total (μL)			50.00	720.00

$$\Delta 1 = 15000 - 1500 - 150 - 15 - 1.5 - 0.15 - 0.015 \text{ pg}/\mu\text{L}$$

$$\Delta 2 = 1500 - 150 - 15 - 1.5 - 0.15 - 0.015 - 0.0015 \text{ pg}/\mu\text{L}$$

*Componente no presente en todas las reacciones. La muestra de ADN se añadió sólo en los controles positivos. El volumen que no se adicionó en el control negativo se reemplazó con agua libre de nucleasas.

Se llevó a cabo el ensayo con dupletas de controles positivos para cada dilución y una dupla de control negativo sin ADN. La programación del termociclador se muestra en la Tabla 2.

7. Estandarización del protocolo para obtención de leucocitos a partir de sangre total

La obtención de leucocitos a partir de sangre total para su posterior extracción de ARN se llevó a cabo mediante el uso de una solución de lisis de eritrocitos, cuya composición fue creada por UC San Diego Health Sciences, y de acuerdo a modificaciones realizadas al protocolo original.

La composición de la solución de lisis de eritrocitos y el protocolo de concentración de leucocitos utilizado se detalla en el Anexo 4 (UC San Diego Health Sciences).

8. Estandarización del protocolo para la extracción de ARN a partir de leucocitos

La extracción de ARN a partir de leucocitos se llevó a cabo mediante el uso del kit *PureLink® RNA Mini Kit* de Ambion™, y de acuerdo a modificaciones realizadas al protocolo recomendado por el fabricante.

El protocolo de extracción de ARN utilizado se detalla en el Anexo 5 (Ambion™ Life Technologies™, 2012).

9. Estandarización del tratamiento de ARN con DNasa

Para eliminar la contaminación con ADN de las muestras de ARN previamente extraídas, se utilizó el kit *TURBO DNA-free™ kit* de Ambion™ de acuerdo a modificaciones del protocolo recomendado por el fabricante. Se realizó dos tratamientos con DNasa para garantizar la eliminación total de ADN de las muestras.

El protocolo de tratamiento de ARN con *TURBO DNA-free™ kit* utilizado se detalla en el Anexo 6 (Ambion™, 2012).

10. Cuantificación de ARN por espectrofotometría

La cuantificación del ARN extraído se realizó en el equipo *NanoDrop™ 8000* de Thermo Scientific™, siguiendo las recomendaciones del fabricante. También se determinó su pureza biológica y química (radios 260/280 y 260/230 respectivamente).

El protocolo para el uso del equipo se especifica en el Anexo 7 (Thermo Fisher Scientific, NanoDrop 8000 Spectrophotometer, 2010).

11. Análisis cualitativo del ARN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa

Para determinar la presencia y la calidad del ARN extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, configurando la fuente de poder a un voltaje constante de 100 voltios (V), amperaje de 300 miliamperios (mA) y tiempo de 50 minutos (min).

12. Optimización de RT-PCR convencional

Se establecieron las condiciones para el óptimo desempeño en los sistemas de RT-PCR convencional del gen objetivo FOXP3 y del gen de referencia 18S, como procedimiento preliminar a la optimización de los sistemas de RT-qPCR con *SYBR® Green*. La optimización de los sistemas de RT-PCR permitió tener una base para determinar las concentraciones de reactivos y la programación del termociclador.

Los ensayos se llevaron a cabo mediante el uso del kit *SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase* de Invitrogen™ y de ARN de leucocitos previamente extraído. El kit utilizado permite realizar una RT-PCR de un solo paso, es decir que se lleva a cabo la síntesis de ADN complementario a partir del ARN y la amplificación de PCR uno a continuación de otro en la misma reacción.

Se diseñaron los sistemas de RT-PCR de los genes 18S y FOXP3 que consistieron en dupletas de control positivo, un control negativo sin ARN, para

corroborar que no existe contaminación en los ensayos, y un control negativo añadido *PlatinumTaq DNA Polymerase* de Invitrogen™ en lugar del mix de enzimas *SuperScript III RT/ Platinum® Taq Mix* disponible en el kit. Esto último se realizó para comprobar la ausencia de ADN genómico contaminante en las muestras de ARN de leucocitos.

Se llevaron a cabo modificaciones al protocolo recomendado por el fabricante del kit, optimizando los ensayos a un volumen final de reacción de 12.5 µL.

La configuración de la reacción de RT-PCR de los genes 18S y FOXP3 se muestra en la Tabla 4 y 5 respectivamente, donde se presentan las concentraciones de los reactivos utilizados, sus volúmenes en una reacción del sistema y los volúmenes para el ensamblaje del máster mix. La programación del termociclador estandarizada se muestra en la Tabla 6 y 7, para los genes 18S y FOXP3 respectivamente.

Para determinar la temperatura de annealing de los sistemas, se realizaron ensayos con gradiente de temperatura respecto a la temperatura de annealing teórica de los cebadores y, en el caso de FOXP3, respecto al programa del termociclador en el sistema de PCR convencional estandarizado anteriormente.

La concentración óptima de los cebadores en la reacción de RT-PCR se definió mediante ensayos de variación de concentración, balance de primers y, en el caso de FOXP3, de la configuración de la reacción de PCR convencional previamente estandarizada.

Para visualizar los resultados y comprobar la amplificación de los productos en los ensayos de RT-PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, configurando la fuente de poder a un voltaje constante de 120 voltios (V), amperaje de 300 miliamperios (mA) y tiempo de 45 minutos (min).

Tabla 4.

Configuración de la reacción de RT-PCR convencional para el sistema del gen 18S.

Componente	C. Inicial	C. Final	1X (µL)	4X (µL)
Reaction Mix	2X	1X	6.25	25.00
Primer Forward	10µM	0.2µM	0.25	1.00
Primer Reverse	10µM	0.2µM	0.25	1.00
SuperScript III RT/ Platinum Taq Mix*	-	-	0.50	-
Agua libre de nucleasas	-	-	2.75	11.00
ARN*	5ng/µL	1ng/µL	2.50	-
Volumen Total (µL)			12.50	38.00

*Componentes no presentes en todas las reacciones. La muestra de ARN y el mix de enzimas SuperScript III RT/ Platinum Taq Mix se añadieron respecto a cada control. En los controles positivos se colocaron ambos reactivos, en un control negativo se añadió el mix de enzimas y agua libre de nucleasas en un volumen igual al de ARN no añadido, y en el otro control negativo se adicionó ARN y Taq DNA Polimerasa Platinum en lugar del mix de enzimas.

Tabla 5.

Configuración de la reacción de RT-PCR convencional para el sistema del gen FOXP3.

Componente	C. Inicial	C. Final	1X (µL)	4X (µL)
Reaction Mix	2X	1X	6.25	25.00
Primer Forward	10µM	0.5µM	0.63	2.50
Primer Reverse	10µM	0.5µM	0.63	2.50
SuperScript III RT/ Platinum Taq Mix*	-	-	0.50	-
Agua libre de nucleasas	-	-	2.00	8.00
ARN*	5ng/µL	1ng/µL	2.50	-
Volumen Total (µL)			12.50	38.00

*Componentes no presentes en todas las reacciones. La muestra de ARN y el mix de enzimas SuperScript III RT/ Platinum Taq Mix se añadieron respecto a cada control. En los controles positivos se colocaron ambos reactivos, en un control negativo se añadió el mix de enzimas y agua libre de nucleasas en un volumen igual al de ARN no añadido, y en el otro control negativo se adicionó ARN y Taq DNA Polimerasa Platinum en lugar del mix de enzimas.

Tabla 6.

Programación del termociclador para el ensayo de RT-PCR convencional para el gen 18S.

Proceso	Temperatura	Tiempo	Número de Ciclos
Síntesis de ADNc	55°C	15 min	1
Denaturación Inicial	94°C	2 min	1
Denaturación	94°C	15 seg	
Annealing	66°C	30 seg	30
Extensión	68°C	30 seg	
Extensión Final	68°C	5 min	1
Espera	4°C	5 min	1

Tabla 7.

Programación del termociclador para el ensayo de RT-PCR convencional para el gen FOXP3.

Proceso	Temperatura	Tiempo	Número de Ciclos
Síntesis de ADNc	55°C	15 min	1
Denaturación Inicial	94°C	2 min	1
Denaturación	94°C	15 seg	
Annealing	66°C	30 seg	35
Extensión	68°C	30 seg	
Extensión Final	68°C	5 min	1
Espera	4°C	5 min	1

13. Estandarización del procesamiento de muestras de orina y obtención de sedimento celular urinario

La obtención de sedimento celular a partir de muestras de orina para su posterior extracción de ARN se llevó a cabo de acuerdo a modificaciones realizadas al protocolo original desarrollado por el programa de investigación Clinical Trials in Organ Transplantation (CTOT) del National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID).

Para llevar a cabo este protocolo se preparó una solución de estabilización y almacenamiento denominada RNAlater. El protocolo de

preparación y las concentraciones de los reactivos utilizados se especifican en el Anexo 8.

El protocolo estandarizado que se utilizó para la concentración de células a partir de orina se detalla en el Anexo 9 (Clinical Trials in Organ Transplantation, 2009).

14. Estandarización del protocolo para la extracción de ARN a partir de sedimento celular urinario

La extracción de ARN a partir de sedimento celular de orina se llevó a cabo mediante el uso del kit *PureLink® RNA Mini Kit* de Ambion™, y de acuerdo a modificaciones realizadas al protocolo recomendado por el fabricante y el programa de investigación Clinical Trials in Organ Transplantation (CTOT) del National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID).

El protocolo de extracción de ARN utilizado se detalla en el Anexo 10 (Ambion™ Life Technologies™, 2012) (Clinical Trials in Organ Transplantation CTOT, 2009).

15. Estandarización del tratamiento de ARN con DNasa y extracción fenol/cloroformo.

Para eliminar la contaminación con ADN de las muestras de ARN de orina previamente extraídas, se utilizó el kit *TURBO™ DNase* de Ambion™ de acuerdo a modificaciones del protocolo recomendado por el fabricante. Para inactivar la enzima *TURBO™ DNase* y purificar las muestras, se llevó a cabo un protocolo de extracción de ARN con solución de fenol/cloroformo 1:1, seguido de precipitación y lavado del ARN con etanol.

El protocolo de tratamiento de ARN con *TURBO™ DNase* y extracción fenol/cloroformo utilizado se detalla en el Anexo 11 (Ambion™ by Life Technologies™, 2012).

Para la cuantificación del ARN extraído se utilizó el equipo *NanoDrop*[™] 2000 de Thermo Scientific[™]. Dentro del análisis cualitativo de las muestras, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras de ARN, configurando la fuente de poder a un voltaje constante de 100 voltios (V), amperaje de 300 miliamperios (mA) y tiempo de 50 minutos (min).

Para comprobar la integridad de las muestras de ARN para aplicaciones posteriores, se montó un ensayo de RT-PCR convencional del gen 18S previamente estandarizado. La configuración de la reacción y la programación del termociclador del ensayo de RT-PCR convencional para el sistema del gen 18S se presentan en las Tablas 4 y 6 respectivamente.

Para visualizar los resultados y comprobar la amplificación de los productos en ensayos de RT-PCR convencional, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, configurando la fuente de poder a un voltaje constante de 120 voltios (V), amperaje de 300 miliamperios (mA) y tiempo de 45 minutos (min).

16. Análisis de estabilización y almacenamiento del RNAlater

Se implementaron dos ensayos para determinar si el estabilizante de ARN preparado (RNAlater) puede preservar el ARN íntegro dentro de las células del sedimento urinario.

En el primer ensayo, se llevó a cabo la recolección y tratamiento de 4 muestras de orina. Luego de colocar el RNAlater se dejó a temperatura ambiente una de las muestras por 3, 2, 1 o 0 horas respectivamente. Después se realizó la extracción y purificación de ARN de las muestras. Para la cuantificación se utilizó el equipo *NanoDrop*[™] 2000 de Thermo Scientific[™], y posteriormente se montó un ensayo de RT-PCR convencional del gen 18S para comprobar la integridad del ARN obtenido.

En el segundo ensayo, se realizó la recolección y tratamiento de 4 muestras de orina. Luego de colocar el RNAlater se dejó a temperatura ambiente una de las muestras por 12, 6, 4 o 0 horas respectivamente. Después se las guardó en el ultracongelador a -80°C. Al día siguiente se llevó

a cabo la recolección y tratamiento de una muestra más de orina. Inmediatamente después se realizó la extracción y purificación de ARN de todas las 5 muestras, tanto las congeladas el día anterior como la recolectada ese momento. Al igual que en el primer ensayo, para la cuantificación se utilizó el equipo *NanoDrop™ 2000* de Thermo Scientific™, y posteriormente se montó un ensayo de RT-PCR convencional del gen 18S para comprobar la integridad del ARN obtenido.

Lo que se buscó con este análisis es determinar el tiempo de estabilidad del ARN tratado con RNAlater a temperatura ambiente. También si el RNAlater preserva íntegro el ARN dentro de las células del sedimento urinario al someterlas a ultracongelación a -80°C .

Los protocolos utilizados para la concentración de células a partir de orina, extracción de ARN del sedimento celular y tratamiento de ARN usando DNasa con extracción fenol/cloroformo se detallan en los Anexos 9, 10 y 11. Para la cuantificación del ARN extraído se utilizó el equipo *NanoDrop™ 2000* de Thermo Scientific™.

La configuración de la reacción de RT-PCR convencional y la programación del termociclador para el sistema del gen 18S, los cuales se utilizaron en estos ensayos para comprobar la integridad del ARN, se presentan en las Tablas 4 y 6 respectivamente.

Para visualizar los resultados y comprobar la amplificación de los productos en los ensayos de RT-PCR convencional, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, configurando la fuente de poder a un voltaje constante de 120 voltios (V), amperaje de 300 miliamperios (mA) y tiempo de 45 minutos (min).

17. Optimización de RT-qPCR con SYBR® Green

Se estandarizaron los sistemas de RT-qPCR con SYBR® Green del gen objetivo FOXP3 y del gen de referencia 18S, como procedimiento preliminar a la optimización de los sistemas de RT-qPCR con TaqMan®.

Los ensayos realizados para la optimización de estos sistemas de RT-qPCR con SYBR® Green se llevaron a cabo mediante el uso del kit *Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit* de Applied Biosystems™ a partir de ARN extraído de leucocitos. Se utilizó el instrumento *LightCycler® Nano* de Roche y de ARN de leucocitos.

Se diseñaron los sistemas de RT-qPCR con SYBR® Green de los genes 18S y FOXP3, que consistieron en tripletas de control positivo y un control negativo sin ARN, para corroborar que no existe contaminación en los ensayos. Se realizaron modificaciones al protocolo recomendado por el fabricante del kit, optimizando los ensayos a un volumen final de reacción de 10 µL.

La programación en el equipo *LightCycler® Nano*, a diferencia de anteriores sistemas estandarizados, contó con una fase de disociación que permitió la construcción de curvas de melting, las cuales indicaron la temperatura de melting de los fragmentos amplificados. Las curvas de disociación permiten identificar la presencia del producto específico buscado, así como de productos inespecíficos y dímeros de cebadores para su eliminación con ensayos de optimización.

La configuración de la reacción de RT-qPCR con SYBR® Green de los genes 18S y FOXP3 se muestra en las Tablas 8 y 9 respectivamente, donde se presentan las concentraciones de los reactivos utilizados, sus volúmenes por reacción y los volúmenes para el ensamblaje del máster mix. La programación estandarizada del equipo se muestra en las Tablas 10 y 11, para los genes 18S y FOXP3 respectivamente.

Para determinar la temperatura de annealing de los sistemas, se realizaron ensayos con gradiente de temperatura respecto al programa del termociclador en los sistemas de RT-PCR convencional estandarizado anteriormente.

Tabla 8.

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

Componente	C. Inicial	C. Final	1X (µL)	4X (µL)
<i>Power SYBR® Green RT-PCR Mix</i>	2X	1X	5.00	20.00
Primer Forward	10µM	0.2µM	0.20	0.80
Primer Reverse	10µM	0.2µM	0.20	0.80
<i>RT Enzyme Mix</i>	125X	1X	0.08	0.32
Agua libre de nucleasas	-	-	2.52	10.08
ARN*	5ng/µL	1ng/µL	2.00	-
Volumen Total (µL)			10.00	32.00

*Componente no presente en todas las reacciones. La muestra de ARN se añadió sólo en los controles positivos. El volumen que no se adicionó en el control negativo se reemplazó con agua libre de nucleasas.

Tabla 9.

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

Componente	C. Inicial	C. Final	1X (µL)	4X (µL)
<i>Power SYBR® Green RT-PCR Mix</i>	2X	1X	5.00	20.00
Primer Forward	10µM	0.5µM	0.50	2.00
Primer Reverse	10µM	0.5µM	0.50	2.00
<i>RT Enzyme Mix</i>	125X	1X	0.08	0.32
Agua libre de nucleasas	-	-	1.92	7.68
ARN*	5ng/µL	1ng/µL	2.00	-
Volumen Total (µL)			10.00	32.00

*Componente no presente en todas las reacciones. La muestra de ARN se añadió sólo en los controles positivos. El volumen que no se adicionó en el control negativo se reemplazó con agua libre de nucleasas.

Tabla 10.

Programación del equipo para el ensayo de RT-qPCR con SYBR® para el gen 18S.

Proceso	Temperatura	Tiempo	Número de Ciclos
Síntesis de ADNc	48°C	15 min	1
Denaturación Inicial (Activación de <i>AmpliTaq Gold® DNA Polymerase</i>)	95°C	10 min	1
Denaturación	95°C	15 seg	30
Annealing	63°C	30 seg	
Extensión	72°C	30 seg	
Fase de Disociación (Curvas de Melting)	95°C	15 seg	1
	60°C	1 min	
	95°C	15 seg	
	60°C	15 seg	

Tabla 11.

Programación del equipo para el ensayo de RT-qPCR con SYBR® para el gen FOXP3.

Proceso	Temperatura	Tiempo	Número de Ciclos
Síntesis de ADNc	48°C	15 min	1
Denaturación Inicial (Activación de <i>AmpliTaq Gold® DNA Polymerase</i>)	95°C	10 min	1
Denaturación	95°C	15 seg	45
Annealing	63°C	30 seg	
Extensión	72°C	30 seg	
Fase de Disociación (Curvas de Melting)	95°C	15 seg	1
	60°C	1 min	
	95°C	15 seg	
	60°C	15 seg	

La concentración óptima de los cebadores en la reacción de RT-qPCR con SYBR® Green se tomó de la configuración de la reacción de RT-PCR convencional previamente estandarizada.

18. Optimización de RT-qPCR con TaqMan®

Se estandarizaron y optimizaron los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® del gen objetivo FOXP3 y del gen de referencia 18S, para los ensayos posteriores en muestras clínicas de orina de pacientes trasplantados y no trasplantados renales.

Los ensayos realizados para la optimización de estos sistemas de RT-qPCR con TaqMan® se llevaron a cabo mediante el uso del kit *TaqMan® RNA-to-CT™ 1-Step Kit* de Applied Biosystems™, el instrumento *LightCycler® Nano* de Roche y ARN de leucocitos, los cuales permitieron definir las concentraciones de reactivos y la programación del termociclador.

Se diseñaron los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® de los genes 18S y FOXP3, que consistieron en tripletas de control positivo y un control negativo sin ARN, para corroborar que no existe contaminación en los ensayos. Se realizaron modificaciones al protocolo recomendado por el fabricante del kit, optimizando los ensayos a un volumen final de reacción de 10 µL.

La configuración de la reacción de RT-qPCR con TaqMan® de los genes 18S y FOXP3 se muestra en las Tablas 12 y 13 respectivamente, donde se presentan las concentraciones de los reactivos utilizados, sus volúmenes en una reacción del sistema y los volúmenes para el ensamblaje del máster mix. La programación estandarizada del equipo se muestra en la Tabla 14, para ambos genes 18S y FOXP3.

La temperatura de annealing y la concentración de los cebadores de los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® se tomó respecto a los sistemas de RT-qPCR con SYBR® Green de ambos genes estandarizados anteriormente. Se unificó los programas del equipo para ambos sistemas 18S y FOXP3, fijando la etapa de ciclado, como único elemento que no existía igualdad respecto a los dos sistemas en RT-qPCR con SYBR® Green, a 45 ciclos.

Tabla 12.

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

Componente	C. Inicial	C. Final	1X (µL)	4X (µL)
<i>TaqMan® RT-PCR Mix</i>	2X	1X	5.00	20.00
Primer Forward	10µM	0.2µM	0.20	0.80
Primer Reverse	10µM	0.2µM	0.20	0.80
Sonda TaqMan	1000nM	100nM	1.00	4.00
<i>TaqMan® RT Enzyme Mix</i>	40X	1X	0.25	1.00
Agua libre de nucleasas	-	-	1.35	5.40
ARN*	5ng/µL	1ng/µL	2.00	-
Volumen Total (µL)			10.00	32.00

*Componente no presente en todas las reacciones. La muestra de ARN se añadió sólo en los controles positivos. El volumen que no se adicionó en el control negativo se reemplazó con agua libre de nucleasas.

Tabla 13.

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

Componente	C. Inicial	C. Final	1X (µL)	4X (µL)
<i>TaqMan® RT-PCR Mix</i>	2X	1X	5.00	20.00
Primer Forward	10µM	0.5µM	0.50	2.00
Primer Reverse	10µM	0.5µM	0.50	2.00
Sonda TaqMan	1000nM	100nM	1.00	4.00
<i>TaqMan® RT Enzyme Mix</i>	40X	1X	0.25	1.00
Agua libre de nucleasas	-	-	0.75	3.00
ARN*	5ng/µL	1ng/µL	2.00	-
Volumen Total (µL)			10.00	32.00

*Componente no presente en todas las reacciones. La muestra de ARN se añadió sólo en los controles positivos. El volumen que no se adicionó en el control negativo se reemplazó con agua libre de nucleasas.

Tabla 14.

Programación del equipo para los ensayos de RT-qPCR con TaqMan® para los genes 18S y FOXP3.

Proceso	Temperatura	Tiempo	Número de Ciclos
Síntesis de ADNc	48°C	15 min	1
Denaturación Inicial (Activación de <i>AmpliTaq Gold® DNA Polymerase</i>)	95°C	10 min	1
Denaturación	95°C	15 seg	45
Annealing	63°C	30 seg	
Extensión	72°C	30 seg	

19. Cuantificación de ARN por espectrofotometría y fluorometría

Para comprobar la cuantificación por espectrofotometría para los ensayos posteriores, se llevó a cabo una extracción de ARN a partir de leucocitos con el kit *PureLink® RNA Mini Kit* de Ambion™, la eliminación de ADN de las muestras de ARN con el kit *TURBO DNA-free™ kit* de Ambion™, y la cuantificación del ARN. Para determinar la concentración de ARN de las muestras, se utilizó el equipo *NanoDrop™ 2000* de Thermo Scientific™, como cuantificación por espectrofotometría, y el equipo *Qubit® 1.0 Fluorometer* de Invitrogen con el kit *Qubit® RNA BR Assay Kit* de Molecular Probes para cuantificación por fluorometría.

Para determinar la presencia y la calidad del ARN extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, configurando la fuente de poder a un voltaje constante de 110 voltios (V), amperaje de 300 miliamperios (mA) y tiempo de 60 minutos (min).

El protocolo para el uso del equipo *Qubit® 1.0 Fluorometer* y el kit *Qubit® RNA BR Assay Kit* se especifica en el Anexo 12 (*Molecular Probes™ Life Technologies™, 2015*).

20. Ensayo de sensibilidad analítica de RT-qPCR con TaqMan®

Luego de la optimización de los sistemas en RT-qPCR con TaqMan® de los genes 18S y FOXP3, se llevaron a cabo ensayos de sensibilidad analítica con diluciones seriadas de ADN 1:10, con el objetivo de determinar el límite inferior de detección del sistema.

Para ello, se inició a partir de una concentración inicial de ARN de 50 ng/ μ L. En microtubos estériles se colocó en tubo 9 μ L de agua libre de nucleasas. En cada microtubo se añadió 1 μ L de la dilución de ARN que le precedía. Se obtuvieron diluciones hasta una concentración de 5 fg/ μ L para el ensayo con el sistema 18S y 0.5 pg/ μ L para el para el ensayo con el sistema FOXP3, es decir en un factor respecto a la concentración inicial de ARN de 10^{-5} y 10^{-7} respectivamente. El procedimiento para la obtención de las muestras de ARN diluidas se visualiza en la Figura 6.

Se llevaron a cabo los ensayos para cada sistema realizando dupletas de controles positivos para cada dilución y un control negativo sin ARN por ensayo. La configuración de la reacción de RT-qPCR con TaqMan® de los genes 18S y FOXP3 para los ensayos de sensibilidad analítica se muestran en la Tabla 15 y 16 respectivamente, donde se presentan las concentraciones de los reactivos utilizados, los volúmenes respectivos en una reacción del sistema, y los volúmenes para el ensamblaje del máster mix. La programación del equipo estandarizada anteriormente se muestra en la Tabla 14.

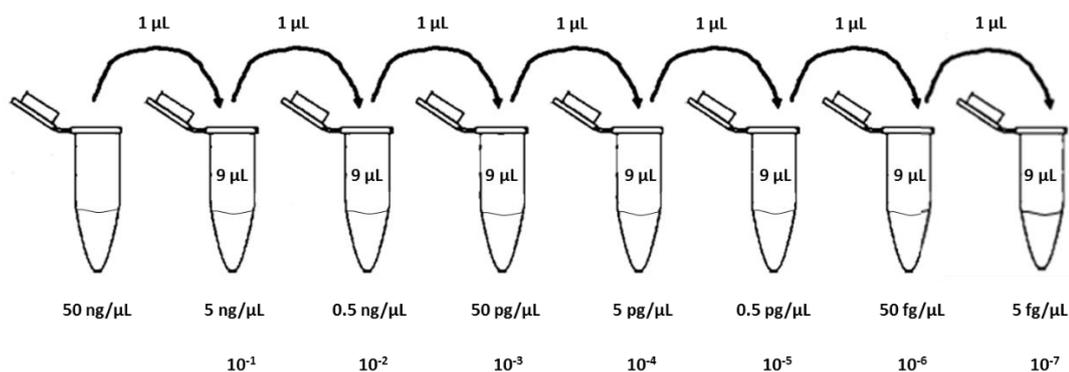


Figura 6. Procedimiento para la obtención de diluciones seriadas de ARN para los ensayos de sensibilidad analítica de RT-qPCR con TaqMan®.

Se generaron muestras diluidas con concentraciones desde 50 ng/μL hasta 5 fg/μL para el sistema 18S y desde 50 ng/μL hasta 0.5 pg/μL para el sistema FOXP3, en proporciones 1:10.

Tabla 15.

Configuración de la reacción de RT-qPCR con TaqMan® para el ensayo de sensibilidad analítica del sistema del gen 18S.

Componente	C. Inicial	C. Final	1X (μL)	17X (μL)
TaqMan® RT-PCR Mix	2X	1X	5.00	85.00
Primer Forward	10μM	0.2μM	0.20	3.40
Primer Reverse	10μM	0.2μM	0.20	3.40
Sonda TaqMan	1000nM	100nM	1.00	17.00
TaqMan® RT Enzyme Mix	40X	1X	0.25	4.25
Agua libre de nucleasas	-	-	1.35	22.95
ARN*	Δ1	Δ2	2.00	-
Volumen Total (μL)			10.00	136.00

Δ1 = 50000000, 5000000, 500000, 50000, 5000, 500, 50, 5 fg/μL

Δ2 = 10000000, 1000000, 100000, 10000, 1000, 100, 10, 1 fg/μL

*Componente no presente en todas las reacciones. La muestra de ARN se añadió sólo en los controles positivos. El volumen que no se adicionó en el control negativo se reemplazó con agua libre de nucleasas.

Tabla 16.

Configuración de la reacción de RT-qPCR con TaqMan® para el ensayo de sensibilidad analítica del sistema del gen FOXP3.

Componente	C. Inicial	C. Final	1X (µL)	13X (µL)
TaqMan® RT-PCR Mix	2X	1X	5.00	65.00
Primer Forward	10µM	0.5µM	0.50	6.50
Primer Reverse	10µM	0.5µM	0.50	6.50
Sonda TaqMan	1000nM	100nM	1.00	13.00
TaqMan® RT Enzyme Mix	40X	1X	0.25	3.25
Agua libre de nucleasas	-	-	0.75	9.75
ARN*	Δ1	Δ2	2.00	-
Volumen Total (µL)			10.00	104.00

Δ1 = 50000, 5000, 500, 50, 5, 0.5 pg/µL

Δ2 = 10000, 1000, 100, 10, 1, 0.1 pg/µL

*Componente no presente en todas las reacciones. La muestra de ARN se añadió sólo en los controles positivos. El volumen que no se adicionó en el control negativo se reemplazó con agua libre de nucleasas.

21. Análisis de la eficiencia relativa de amplificación

Se determinó la eficiencia relativa de amplificación de los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® de los genes 18S y FOXP3. Para ello se utilizaron los resultados del ensayo de sensibilidad analítica de cada sistema.

Con el uso del software de análisis de datos *Excel* de Microsoft® se calcularon los logaritmos en base 10 y en base 2 de las concentraciones de ARN (Q) utilizadas en cada reacción y se tomaron los datos de los valores de C_q obtenidos del ensayo de sensibilidad analítica. Se realizaron curvas de correlación C_q vs. $\text{Log}_{10}(Q)$ o $\text{Log}_2(Q)$. Se llevaron a cabo regresiones lineales de cada curva y se obtuvieron las ecuaciones de la recta con las pendientes correspondientes a cada gráfica.

Para determinar la eficiencia de amplificación se aplicaron las Ecuaciones 1 y 2. En la Ecuación 1 la eficiencia de amplificación se expresa

en porcentaje (PEA) y en la Ecuación 2 se expresa en función del aumento del producto por ciclo (EA).

Ecuación 1. Cálculo de la eficiencia de amplificación de una reacción de RT-qPCR expresada en porcentaje (PEA).

$$PEA = \left[\left(10^{-1/m} - 1 \right) \right] \times 100$$

En donde:

m: pendiente de la recta formada por regresión lineal de C_q vs. $\text{Log}_{10}(Q)$.

Ecuación 2. Cálculo de la eficiencia de amplificación de una reacción de RT-qPCR expresada en función del aumento del producto por ciclo (EA).

$$EA = 2^{-1/m}$$

En donde:

m: pendiente de la recta formada por regresión lineal de C_q vs. $\text{Log}_2(Q)$.

A continuación, se determinó si es posible aplicar el método de $\Delta\Delta C_T$ para obtener la expresión génica del gen FOXP3, que es importante para futuros análisis fuera de este proyecto en pacientes trasplantados. Para poder utilizar este método matemático, es necesario comprobar si la eficiencia relativa la amplificación del gen target FOXP3 y del gel de referencia 18S son aproximadamente iguales.

Para verificar si ambos sistemas tienen la misma eficiencia de amplificación, se evaluó cómo el ΔC_q (C_q target – C_q referencia) varía respecto a la concentración de ARN en la reacción. En los ensayos de sensibilidad analítica de RT-qPCR con TaqMan® se obtuvieron los valores de C_q para cada sistema. Con los valores promedio de C_q de cada concentración de ARN (Q) en ambos ensayos se calculan los valores de ΔC_q , los cuales se utilizan para formar una gráfica ΔC_q versus el logaritmo en base 10 de la concentración de ARN. Se realizó una regresión lineal y la pendiente de la recta se tomó como un criterio de validación general de igualdad de

eficiencias. En donde, si el valor absoluto de la pendiente de ΔCq vs. $\text{Log}_{10}(Q)$ es < 0.1 se consideran eficiencias relativas iguales.

22. Obtención de muestras clínicas de orina de pacientes trasplantados y no trasplantados renales

Las muestras clínicas de orina de pacientes no trasplantados y trasplantados renales fueron recolectadas por la Unidad de Trasplantes y el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Carlos Andrade Marín (HCAM).

Se recolectó un total de 10 muestras de orina, 5 de pacientes no trasplantados y 5 de pacientes trasplantados para su posterior extracción de ARN. Cabe resaltar que todos los procedimientos para la obtención de muestras de orina, procesamiento, extracción de ARN, tratamiento con DNasa y purificación se realizaron el mismo día. Sin embargo, el procesamiento de las 5 muestras clínicas de orina de los pacientes no trasplantados y las 5 muestras de los pacientes no trasplantados se realizaron en dos días diferentes.

23. Procesamiento de muestras clínicas y obtención de sedimento celular urinario

La obtención de sedimento celular a partir de las 10 muestras clínicas de orina para su posterior extracción de ARN se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Carlos Andrade Marín (HCAM) y de acuerdo a modificaciones realizadas al protocolo estandarizado anteriormente.

Se optimizó el procedimiento basándose en recomendaciones presentes en los protocolos desarrollados por el programa de investigación Clinical Trials in Organ Transplantation (CTOT) del National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), y por Early Detection Research Network (EDRN) de National Cancer Institute (NCI), con el fin de optimizar el procedimiento y minimizar la degradación de ARN.

El protocolo optimizado que se utilizó para la concentración de células a partir de muestras clínicas de orina se detalla en el Anexo 13 (Clinical Trials in Organ Transplantation, 2009) (Early Detection Research Network, 2011).

24. Extracción de ARN a partir del sedimento celular urinario de muestras clínicas, tratamiento del ARN con DNasa y extracción con fenol/cloroformo.

La extracción de ARN a partir del sedimento celular urinario de las 10 muestras clínicas de pacientes no trasplantados y trasplantados se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Carlos Andrade Marín (HCAM), mediante el uso del robot de extracción *MagPurix 12 System* de Zinexts Life Science Corporation.

Para eliminar la contaminación con ADN de las muestras clínicas de ARN, se utilizó el kit *TURBO DNA-free™ kit* de Ambion™ de acuerdo a modificaciones del protocolo recomendado por el fabricante. El protocolo de tratamiento de ARN con *TURBO DNA-free™ kit* utilizado se detalla en el Anexo 6.

Luego del tratamiento con DNasa, se transportaron las muestras en congelación al Laboratorio de Nanomedicina y Nanobiología del CENCINAT en la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, donde se llevó a cabo un protocolo de extracción de ARN con solución de fenol/cloroformo 1:1, seguido de precipitación y lavado del ARN con etanol, con el fin de purificar las muestras clínicas de ARN de orina para su aplicación posterior. El protocolo de extracción fenol/cloroformo utilizado forma parte del Anexo 11.

Para la cuantificación del ARN extraído se utilizó el equipo *NanoDrop™ 2000* de Thermo Scientific™.

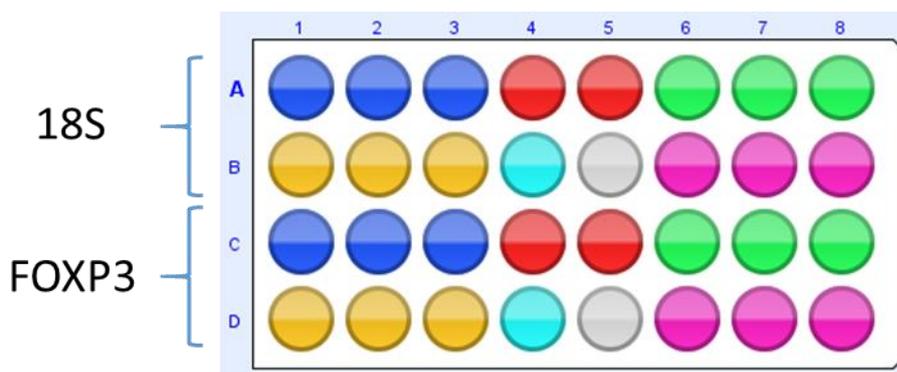
25. Evaluación de los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® en muestras clínicas

Se analizaron las muestras clínicas de ARN a partir de orina de los pacientes no trasplantados y trasplantados renales en los sistemas de RT-

qPCR con TaqMan® del gen blanco (FOXP3) y el gen de referencia (18S) para obtener los datos necesarios en el análisis estadístico. Estos ensayos se implementaron utilizando el kit *TaqMan® RNA-to-CT™ 1-Step Kit* de Applied Biosystems™, del equipo *LightCycler® Nano* de Roche.

El equipo *LightCycler® Nano* de Roche cuenta con una placa de 32 pocillos, esto permitió realizar un máximo de 32 reacciones por ensayo, lo cual fue un punto importante dentro del diseño de los ensayos.

Se diseñó cada ensayo para de la siguiente manera: tripletas de cada paciente (no trasplantado o trasplantado) en ambos sistemas (18S y FOXP3), dupletas de controles positivos y un control negativo por sistema, como se muestra en la Figura 7.



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 7. 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.

Se corrió este ensayo 3 repeticiones con las muestras de pacientes no trasplantados, y 3 con las muestras de paciente trasplantados.

Los seis ensayos se llevaron a cabo el mismo día uno a continuación de otro. El día anterior a la corrida de los ensayos, se prepararon las reacciones a partir de un sólo master mix para cada sistema, en donde se colocaron todos los reactivos excepto el ARN, se hicieron 6 alícuotas de reacciones 15X de ambos sistemas y se llevaron a congelación a -20°C . El día siguiente se ensamblaron las reacciones descongelando una alícuota de cada sistema por ensayo y colocando las muestras de ARN respectivas o agua libre de nucleasas para los controles negativos.

El objetivo del diseño de la placa y la preparación de los mix de reacción al congelarlos el día anterior es eliminar la mayor cantidad de fuentes de variabilidad garantizando la mayor homogeneidad posible de los ensayos.

La configuración de la reacción de RT-qPCR con TaqMan® de los genes 18S y FOXP3 para los ensayos con muestras clínicas de ARN a partir de orina de pacientes no trasplantados y trasplantados se muestran en las Tablas 17 y 18 respectivamente, donde se presentan las concentraciones de los reactivos utilizados, los volúmenes respectivos por reacción, y los volúmenes para el ensamblaje del máster mix. La programación del equipo estandarizada anteriormente se muestra en la Tabla 14.

A partir de los valores de Cq obtenidos se realizaron análisis estadísticos necesarios para determinar variabilidad intraensayo e interensayo. También se compararon los valores de Cq de los sistemas de los genes 18S y FOXP3 entre los pacientes no trasplantados y trasplantados.

Tabla 17.

Configuración de la reacción de RT-qPCR con TaqMan® del sistema del gen 18S para los ensayos con ARN de muestras clínicas de orina de pacientes no trasplantados y trasplantados renales.

Componente	C. Inicial	C. Final	1X (µL)	90X (µL)
TaqMan® RT-PCR Mix	2X	1X	5.00	450.00
Primer Forward	10µM	0.2µM	0.20	18.00
Primer Reverse	10µM	0.2µM	0.20	18.00
Sonda TaqMan	1000nM	100nM	1.00	90.00
TaqMan® RT Enzyme Mix	40X	1X	0.25	22.50
Agua libre de nucleasas	-	-	1.35	121.50
ARN*	2ng/µL	0.4ng/µL	2.00	-
Volumen Total (µL)			10.00	720.00

*Componente no presente en todas las reacciones. La muestra de ARN se añadió sólo en los controles positivos. El volumen que no se adicionó en el control negativo se reemplazó con agua libre de nucleasas.

Tabla 18.

Configuración de la reacción de RT-qPCR con TaqMan® del sistema del gen FOXP3 para los ensayos con ARN de muestras clínicas de orina de pacientes no trasplantados y trasplantados renales.

Componente	C. Inicial	C. Final	1X (µL)	90X (µL)
TaqMan® RT-PCR Mix	2X	1X	5.00	450.00
Primer Forward	10µM	0.5µM	0.50	45.00
Primer Reverse	10µM	0.5µM	0.50	45.00
Sonda TaqMan	1000nM	100nM	1.00	90.00
TaqMan® RT Enzyme Mix	40X	1X	0.25	22.50
Agua libre de nucleasas	-	-	0.75	67.50
ARN*	2ng/µL	0.4ng/µL	2.00	-
Volumen Total (µL)			10.00	720.00

*Componente no presente en todas las reacciones. La muestra de ARN se añadió sólo en los controles positivos. El volumen que no se adicionó en el control negativo se reemplazó con agua libre de nucleasas.

26. Análisis estadístico RT-qPCR con TaqMan® de ARN de muestras clínicas de orina

Para el análisis estadístico se utilizó el software *R* (R Core Team, 2016) y los valores de Cq de los resultados obtenidos de los ensayos de RT-qPCR con TaqMan® de los genes 18S y FOXP3 en ARN de muestras clínicas de orina.

Para determinar la variabilidad o precisión intraensayo e interensayo de los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® de 18S y FOXP3, se calcularon los coeficiente de variación (CV) de los valores de Cq obtenidos según ensayos y pacientes aplicando la Ecuación 3, y los intervalos de confianza para los coeficientes de variación con el uso de la Ecuación 4 según Martin Andres & Luna del Castillo (2004).

Ecuación 3. Cálculo del coeficiente de variación (CV).

$$CV = \frac{S}{|\bar{X}|}$$

En donde:

S: desviación estándar.

\bar{X} : media.

Ecuación 4. Cálculo del intervalo de confianza para el coeficiente de variación (CV) (Martin Andres & Luna del Castillo, 2004).

$$\widehat{CV} \pm Z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{1 + 2\widehat{CV}^2}{2(n - 1)}}$$

En donde:

\widehat{CV} : coeficiente de variación de la muestra

n: número de datos.

$Z_{\alpha/2}$: cuartil asociado al nivel de confianza estadística.

El cuartil asociado al nivel de confianza en los intervalos de confianza se determinó bajo el supuesto de distribución normal. En este caso, al 95% de confianza, el valor es de 1.96.

También se llevó a cabo un contraste de hipótesis estadística con el fin de probar si los CV de dos grupos de observaciones poseen diferencias significativas entre sí. Para ello, según Martin Andres & Luna del Castillo (2004) se contrasta:

$$H_0: CV_1 = CV_2$$

$$H_A: CV_1 \neq CV_2$$

Para ello se aplicó el estadístico de prueba definido en la Ecuación 5, y se calculó el intervalo de confianza para la diferencia de los dos valores de CV de los grupos contrastados usando la fórmula mostrada en la Ecuación 6.

Cabe señalar que, según Martin Andres & Luna del Castillo (2004), las fórmulas se pueden aplicar tras cumplir ciertas condiciones, las cuales no necesariamente cumplen los datos de los valores de Cq obtenidos, sin embargo, se las utilizó con el objetivo de analizar los resultados de manera exploratoria.

Ecuación 5. Estadístico de prueba para el contraste de hipótesis de igualdad de coeficientes de variación (CV) entre dos grupos muestrales (Martin Andres & Luna del Castillo, 2004).

$$Z_{obs} = \frac{|\widehat{CV}_1 - \widehat{CV}_2|}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1 - 1} + \frac{1}{n_2 - 1}\right) \widehat{CV}^2 [0.5 + \widehat{CV}^2]}}$$

En donde:

$$\widehat{CV} = \frac{\sqrt{n_1 - 1} \widehat{CV}_1 + \sqrt{n_2 - 1} \widehat{CV}_2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Ecuación 6. Intervalo de confianza para la diferencia de coeficientes de variación (CV) entre dos grupos muestrales (Martin Andres & Luna del Castillo, 2004).

$$(\widehat{CV}_1 - \widehat{CV}_2) \pm Z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{1}{n_1 - 1} \widehat{CV}_1^2 [0.5 + \widehat{CV}_1^2] + \frac{1}{n_2 - 1} \widehat{CV}_2^2 [0.5 + \widehat{CV}_2^2]}$$

Como parte del análisis estadístico, se planteó la hipótesis de igualdad de medias entre los valores de Cq de pacientes trasplantados y no trasplantados en el sistema 18S, para lo cual se utilizó el programa *InfoStat versión estudiantil* (Di Rienzo, y otros, 2016). En cada sistema se verificaron los supuestos de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilks modificada, y de homocedasticidad aplicando la prueba F de igualdad de varianzas. Con el fin de evaluar dicha hipótesis, se aplicó un análisis de varianza no paramétrica con la prueba de Kruskal Wallis, debido a que se determinó que los datos no siguen una distribución normal. Se verificaron todas las hipótesis y supuestos con un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0.05$).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

1. Análisis de cebadores y sondas

Las características de los cebadores y sondas utilizados para la presente investigación se muestran en la Tabla 19 y 20 respectivamente.

Tabla 19.

Características de los cebadores de los genes 18S y FOXP3.

Cebador	Secuencia 5' - 3'	Longitud	Inicio	Fin	Tm (°C)	% GC
18S F	GCCCGAAGCGTTTACTTTGA	20	929	948	59.13	50.00
18S R	TCCATTATTCCTAGCTGCGGTATC	24	1009	986	60.08	45.83
FOXP3 F	GAGAAGCTGAGTGCCATGCA	20	939	958	60.68	55.00
FOXP3 R	GGAGCCCTTGTCGGATGAT	19	1025	1007	59.17	57.89

Tabla 20.

Características de las sondas de los genes 18S y FOXP3.

Sonda	Secuencia 5'-FAM - TAMRA-3'	Longitud	Inicio	Fin	Tm (°C)	% GC
18S Pr	AAAGCAGGCCCGAGCCGCC	19	965	983	66.6	73.70
FOXP3 Pr	TGCCATTTTCCCAGCCAGGTGG	22	983	962	62.7	59.10

En la Tabla 21 se detallan los resultados del análisis de cada par de cebadores en el software *OligoAnalyzer 3.1* y en el software *Oligo Calculator*, en donde se calculó la energía libre de Gibbs (ΔG) de horquillas, homodímeros y heterodímeros posibles a formarse con los cebadores, lo cual determina la espontaneidad para formar estas estructuras secundarias no deseadas.

Tabla 21.

Valores de energía libre de Gibbs (ΔG) de estructuras secundarias de cebadores de los genes 18S y FOXP3.

Cebador	Horquillas ΔG (kcal/mol)	Homodímeros ΔG (kcal/mol)	Heterodímeros ΔG (kcal/mol)
18S F	-0.35	-3.61	-6.68
18S R	0.80	-6.34	
FOXP3 F	-0.87	-7.05, -6.34	-4.74
FOXP3 R	-0.58	-3.61	

La energía libre de Gibbs (ΔG) es la medida de espontaneidad de una reacción, que en este caso se refiere a la espontaneidad para generar horquillas, homodímeros y heterodímeros de cebadores. Los valores de ΔG límites para estructuras secundarias de cebadores son: -2 kcal/mol para horquillas con terminación 3', -3 kcal/mol para horquillas internas, -5 kcal/mol para dímeros con terminación 3', y -6 kcal/mol para dímeros internos (PREMIER Biosoft, 2016). Con valores de ΔG menores se corre el riesgo de formar estructuras secundarias que afectarían la amplificación del producto de PCR.

Para el sistema 18S, la ΔG para la formación de dímeros presentan valores de -6.34 kcal/mol (homodímero interno) y -6.68 kcal/mol (heterodímero interno), los cuales se encuentran fuera de los parámetros recomendables e indican la posible formación de dímeros de cebadores. Con respecto al sistema FOXP3, la ΔG para la formación de dímeros presentan valores de -7.05 kcal/mol (homodímero con terminación 3') y -6.34 kcal/mol (homodímero interno), los cuales se encuentran distantes de los límites sugeridos y muestran la posible formación de dímeros de primers en los sistemas.

Las características de los amplicones obtenidos y formados de los genes 18S y FOXP3 con sus respectivos cebadores sintetizados se detallan en la Tabla 22.

Tabla 22.

Características de los amplicones obtenidos de los genes 18S y FOXP3.

Amplicón	Longitud	Tm (°C)	Ta (°C)	% GC
18S	81	79.58	51.50	49.00
FOXP3	87	82.88	54.10	59.00

Los alineamientos de cebadores y sondas de los sistemas 18S y FOXP3 en sus correspondientes genes 18S (Human 18S rRNA gene) y FOXP3 (Homo sapiens forkhead box P3 FOXP3, transcript variant 1, mRNA) se encuentran en los Anexos 14 y 15 respectivamente.

A diferencia del gen 18S, los ensayos de PCR convencional con ADN humano y el par de cebadores sintetizados formaron un amplicón de mayor tamaño al formado con el ARNm, que si bien se trata de la secuencia de ADN en la que se encuentra el mismo gen FOXP3, se eliminan secuencias intrónicas dentro de la región comprendida por los cebadores. Por lo tanto luego del procesamiento del ARNm, el fragmento de 1448 pb formado con los cebadores a partir de ADN genómico se reduce a un fragmento de 87 pb en ARNm.

Las características del amplicón obtenido y formado con ADN genómico humano y los cebadores del gen FOXP3 se presentan en la Tabla 23.

Tabla 23.

Características del amplicón obtenido en ensayos de PCR con ADN humano y los cebadores del gen FOXP3.

Amplicón	Longitud	Tm (°C)	Ta (°C)	% GC
FOXP3	1448	87.30	53.30	53.00

El alineamiento de cebadores y sondas del sistema FOXP3 en el ADN humano (Homo sapiens chromosome X, GRCh38.p7) se encuentran en el Anexo 16.

En la Figura 8 se muestra la corrida electroforética de los cebadores reconstituidos de los sistemas 18S y FOXP3, que se llevaron a una concentración de 100 μ M.

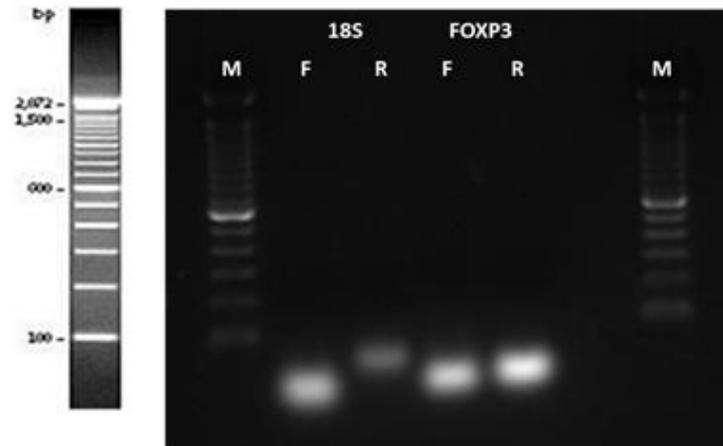


Figura 8. Evaluación cualitativa de cebadores reconstituidos de los genes 18S y FOXP3 mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

Gel de agarosa teñido con SYBR Safe. (M): Marcador 100pb de Labnet, (F): Primer Forward, (R): Primer Reverse.

2. Extracción de ADN a partir de sangre total

Dos muestras de ADN a partir de sangre total humana se aislaron y cuantificaron según lo detallado en las secciones 2 y 3 de Metodología. Los datos de cuantificación por espectrofotometría se detallan en la Tabla 24 y los espectros de cada muestra se presentan en la Figura 9. Los resultados de cuantificación mostraron concentración, radios de pureza y espectro correspondientes a ADN en buenas condiciones, tanto para la muestra C1 como para la muestra C2.

Tabla 24.

Valores de cuantificación por espectrofotometría con NanoDrop 2000™ de la extracción de ADN a partir de sangre total.

Muestra	A260	Concentración (ng/μL)	260/280	260/230
Blanco	0.004	0.2	8.14	0.27
C1	0.777	38.9	1.88	1.72
C2	0.748	37.4	1.82	1.56

Blanco: buffer de elución del ADN utilizado como blanco en el equipo, C1-C2: muestras extraídas de ADN.

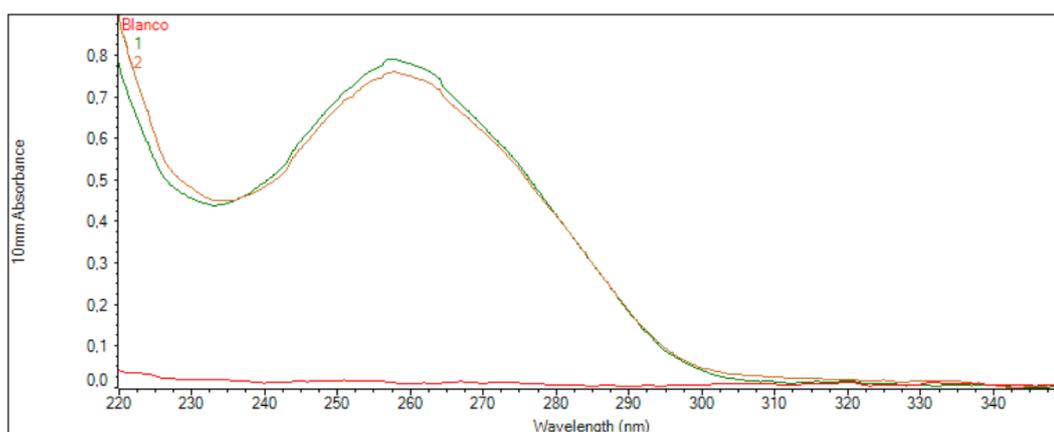


Figura 9. Espectro de muestras de ADN a partir de sangre total cuantificadas por espectrofotometría con NanoDrop 2000™.

Blanco: buffer de elución del ADN utilizado como blanco en el equipo, 1-2: muestras extraídas de ADN C1 y C2 respectivamente.

Con el fin de comprobar la presencia e integridad del ADN de las muestras se evaluó cualitativamente mediante electroforesis en gel de agarosa según las especificaciones descritas en la sección 4 de Metodología. La evaluación cualitativa del ADN aislado mediante electroforesis en gel de agarosa corroboró la presencia de ADN en ambas muestras extraídas, como se muestra en la Figura 10.

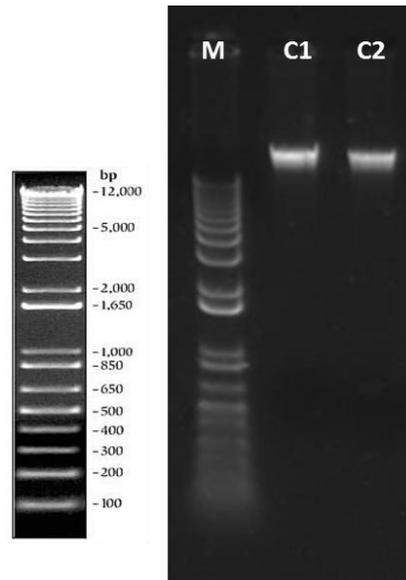


Figura 10. Evaluación cualitativa de ADN de sangre total mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Gel de agarosa teñido con SYBR Safe. (M): Marcador 1Kb Plus de Invitrogen, (C1, C2): muestras extraídas de ADN.

3. Optimización de PCR convencional

El sistema de PCR convencional para el gen FOXP3 se estandarizó luego de realizarse varios ensayos con gradiente de temperatura de annealing, variación de concentración de primers y balance de primers, hasta obtener las condiciones óptimas para la reacción del sistema, en cuanto a concentraciones de reactivos y programación del termociclador, como se muestran en la sección 5 de Metodología.

En la Figura 11 se visualiza la corrida electroforética del sistema estandarizado de PCR convencional del gen FOXP3. Se observa una banda correspondiente al fragmento amplificado (1441 pb) en ambos controles positivos (+1 y +2), el cual se sitúa levemente por debajo respecto a la altura de la banda de 1500 pb del marcador de peso molecular. Se comprueba en la electroforesis la ausencia de contaminación del ensayo en el control negativo sin ADN (C-).

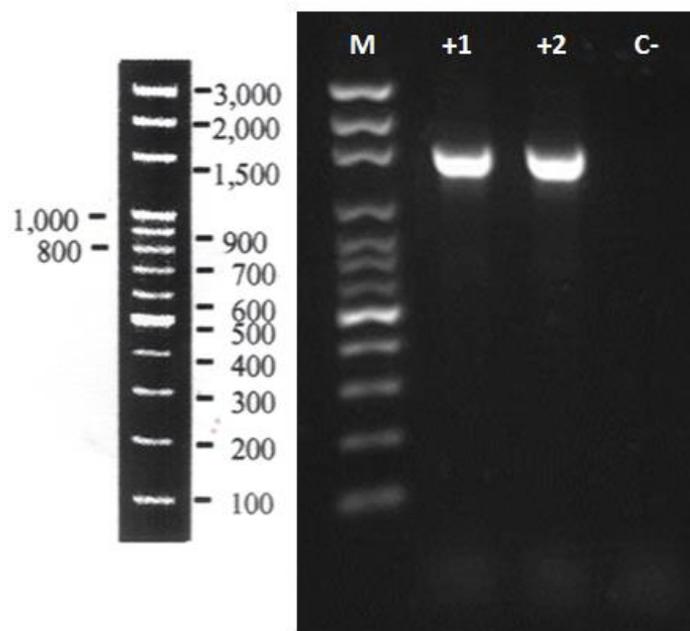


Figura 11. Resultados del sistema de PCR convencional del gen FOXP3.

Fotografía de gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR Safe. (M): Marcador de peso molecular de 100pb Labnet, (+1, +2): Controles positivos del gen FOXP3, (C-): Control negativo sin ADN.

4. Ensayo de sensibilidad analítica de PCR convencional

El ensayo de sensibilidad analítica del sistema de PCR convencional para el gen FOXP3 se llevó a cabo conforme a lo detallado en la sección 6 de Metodología, el cual permitió identificar su límite de detección.

Como resultado del ensayo, se encontró que el sistema FOXP3 es capaz de detectar y amplificar hasta una concentración de ADN de 15 pg/μL, correspondiente a la dilución 10^{-2} respecto a la concentración inicial de ADN, como se muestra en la Figura 12.

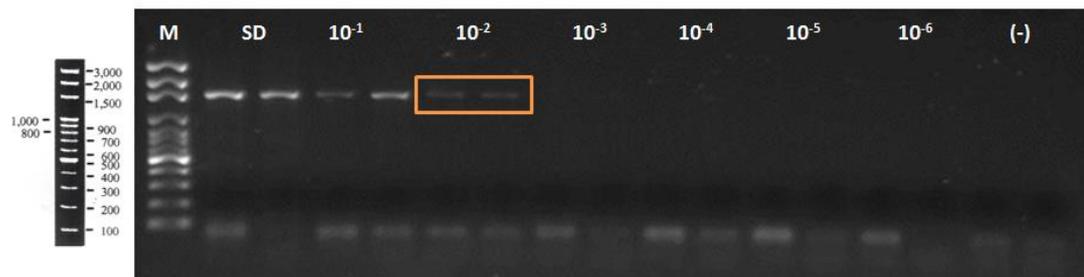


Figura 12. Sensibilidad Analítica del sistema de PCR convencional del gen FOXP3.

Fotografía de gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR Safe. (M): Marcador de peso molecular de 100pb Labnet, (SD): 1.5 ng/ μ L [ADN], (10^{-1}): 0.15 ng/ μ L [ADN], (10^{-2}): 15 pg/ μ L [ADN], (10^{-3}): 1.5 pg/ μ L [ADN], (10^{-4}): 0.15 pg/ μ L [ADN], (10^{-5}): 15 fg/ μ L [ADN], (10^{-6}): 1.5 fg/ μ L [ADN], (C-): Control negativo sin ADN. Rectángulo naranja: límite de amplificación del sistema.

5. Extracción de ARN a partir de leucocitos de sangre

Dos muestras de ARN a partir de leucocitos, que se obtuvieron a partir de sangre total humana, se aislaron, purificaron para eliminar ADN genómico y cuantificaron antes y después de su purificación según lo detallado en las secciones 7, 8, 9 y 10 de Metodología. Los datos de cuantificación por espectrofotometría se presentan en la Tabla 25 y los espectros de cada muestra se visualizan en la Figura 13.

Tabla 25.

Valores de cuantificación por espectrofotometría con NanoDrop 8000™ de la extracción de ARN a partir de leucocitos de sangre.

Muestra	A260	Concentración (ng/ μ L)	260/280	260/230
Blanco	0.000	0.0000	0.32	0.82
A-sin	8.898	355.92	1.98	1.90
B-sin	8.525	341.00	2.06	2.17
A-con	6.420	256.79	1.80	1.62
B-con	5.653	226.12	1.88	1.74

Blanco: agua libre de RNasas utilizado como blanco en el equipo, A-sin, B-sin: muestras extraídas de ARN antes del tratamiento con DNasa, A-con, B-con: muestras extraídas de ARN después del tratamiento con DNasa.

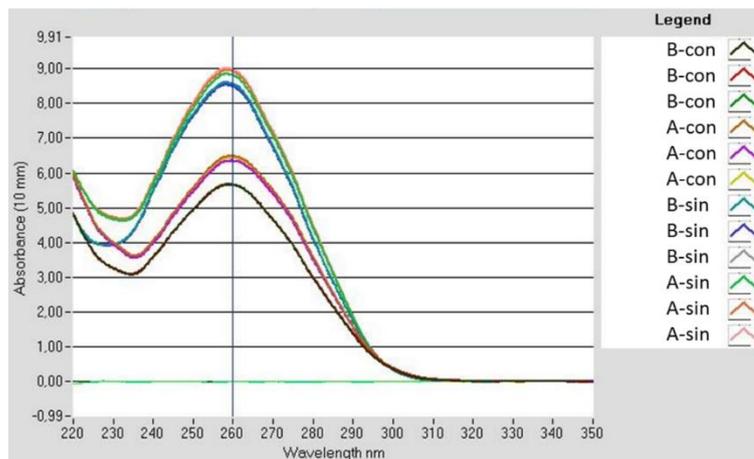


Figura 13. Espectro de muestras de ARN a partir de leucocitos de sangre cuantificadas por espectrofotometría con NanoDrop 8000™.

A-sin, B-sin: muestras extraídas de ARN antes del tratamiento con DNasa, A-con, B-con: muestras extraídas de ARN después del tratamiento con DNasa.

Los resultados de cuantificación mostraron concentración, radios de pureza y espectro correspondientes a ARN en condiciones adecuadas para sus aplicaciones posteriores, tanto para la muestra A como para la muestra B, antes y después de purificar.

Con el fin de comprobar tanto la presencia e integridad del ARN como la ausencia de ADN genómico luego de la purificación, se evaluó cualitativamente las muestras extraídas y purificadas mediante electroforesis en gel de agarosa según las especificaciones descritas en la sección 11 de Metodología. La evaluación cualitativa mediante electroforesis en gel de agarosa corroboró la presencia de ARN íntegro y la eliminación del ADN después de aplicarse el protocolo de purificación, como se muestra en la Figura 14.

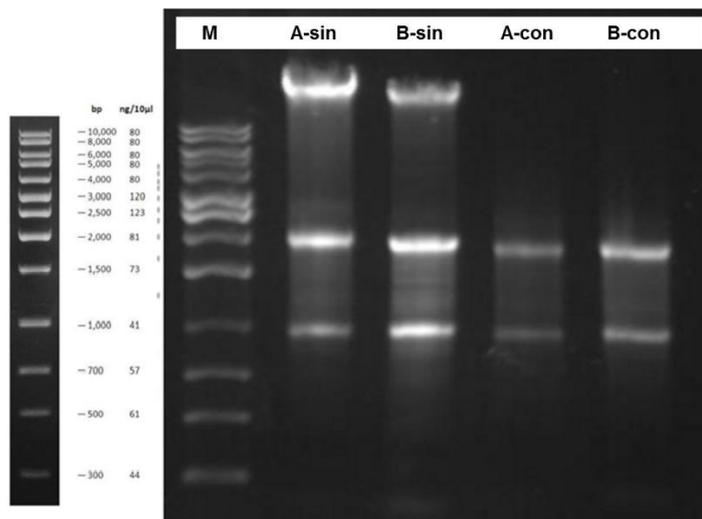


Figura 14. Evaluación cualitativa de ARN de leucocitos de sangre mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Gel de agarosa teñido con SYBR Safe. (M): Marcador 1Kb de Labnet, (A-sin, B-sin): muestras extraídas de ARN antes del tratamiento con DNasa, (A-con, B-con): muestras extraídas de ARN después del tratamiento con DNasa.

6. Optimización de RT-PCR convencional

Los sistemas de RT-PCR convencional para los genes 18S y FOXP3 se estandarizaron luego de realizarse varios ensayos con gradiente de temperatura de annealing, con variación de concentración y balance de primers, y con variación de número de ciclos, hasta obtener las condiciones óptimas para la reacción del sistema, como se muestran en la sección 12 de Metodología. Todos los ensayos para la estandarización se llevaron a cabo con el fin de eliminar la mayor cantidad de productos inespecíficos existentes en ambos sistemas.

En las Figuras 15 y 16 se visualizan las corridas electroforéticas de los sistemas estandarizados de RT-PCR convencional de los genes 18S y FOXP3 respectivamente.

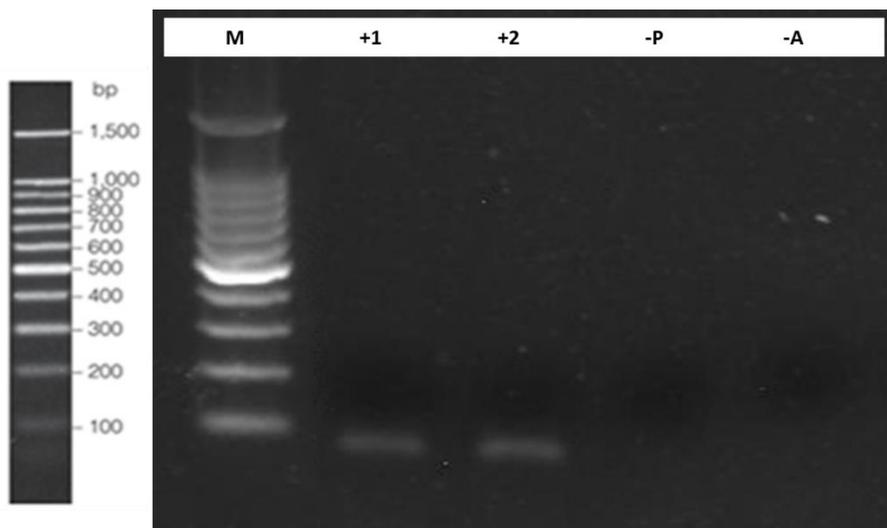


Figura 15. Resultados del sistema de RT-PCR convencional del gen 18S.

Fotografía de gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR Safe. (M): Marcador de peso molecular de 100pb Labnet, (+1, +2): Controles positivos del gen 18S, (-P): Control negativo con Taq Polimerasa sin enzima RT, (-A): Control negativo sin ADN.

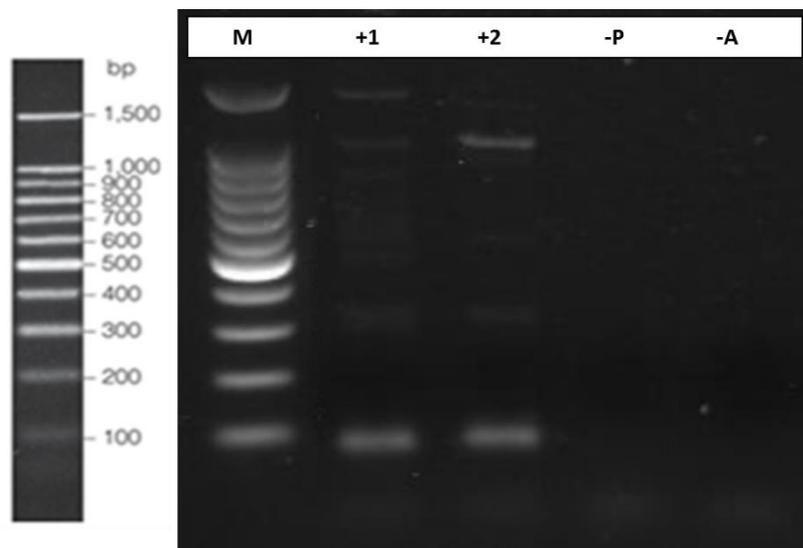


Figura 16. Resultados del sistema de RT-PCR convencional del gen FOXP3.

Fotografía de gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR Safe. (M): Marcador de peso molecular de 100pb Labnet, (+1, +2): Controles positivos del gen FOXP3, (-P): Control negativo con Taq Polimerasa sin enzima RT, (-A): Control negativo sin ADN.

En la corrida del sistema 18S, se observa una banda correspondiente al fragmento amplificado (81 pb) en ambos controles positivos (+1 y +2) que se sitúa por debajo respecto a la altura de la banda de 100 pb del marcador de

peso molecular. Para este sistema, el establecimiento de ensayos de variación de número de ciclos permitió determinar que se evitaba la degradación del fragmento reduciendo el número de ciclos de 40 a 30. El aumento de la temperatura de melting a 66°C permitió la eliminación de todos los productos inespecíficos, como se verifica en la Figura 15, en donde se llevó el sistema al límite de especificidad respecto a la temperatura de melting ya que a 68°C el sistema no amplificaba.

En la corrida del sistema FOXP3, se visualiza una banda correspondiente al fragmento amplificado (87 pb) en ambos controles positivos (+1 y +2), la cual se sitúa por debajo respecto a la altura de la banda de 100 pb del marcador de peso molecular. Contrario a lo sucedido en el sistema 18S, los ensayos de optimización, manipulando variables como temperatura de annealing, concentración de cebadores y número de ciclos, no permitieron la eliminación total de gran cantidad de productos inespecíficos formados, como se muestra en la Figura 16. Sin embargo, se fijaron estas condiciones para el sistema de RT-PCR convencional del gen FOXP3 pese a la eliminación parcial de productos inespecíficos.

Se comprueba en la electroforesis de ambos ensayos la ausencia de contaminación de la muestra de ARN con ADN genómico en el control negativo con Taq Polimerasa sin enzima RT (-P), y de contaminación del ensayo en el control negativo sin ARN (-A).

7. Extracción de ARN a partir de sedimento celular urinario

Dos muestras de ARN a partir de sedimento celular, que se recolectó a partir de orina, se aislaron, purificaron para eliminar ADN genómico y cuantificaron según lo detallado en las secciones 13, 14 y 15 de Metodología. Se partió de un volumen de 100 mL de orina por cada muestra. Los datos de cuantificación por espectrofotometría se presentan en la Tabla 26 y los espectros de cada muestra se visualizan en la Figura 17.

Tabla 26.

Valores de cuantificación por espectrofotometría con NanoDrop 2000™ de la extracción de ARN a partir de sedimento celular urinario.

Muestra	A260	Concentración (ng/μL)	260/280	260/230
Blanco	0.009	0.4	0.53	4.94
M1	0.103	4.1	1.48	1.86
M2	0.237	9.5	1.53	1.50

Blanco: agua libre de RNAsas utilizado como blanco en el equipo, M1, M2: muestras extraídas de ARN después del tratamiento con DNasa.

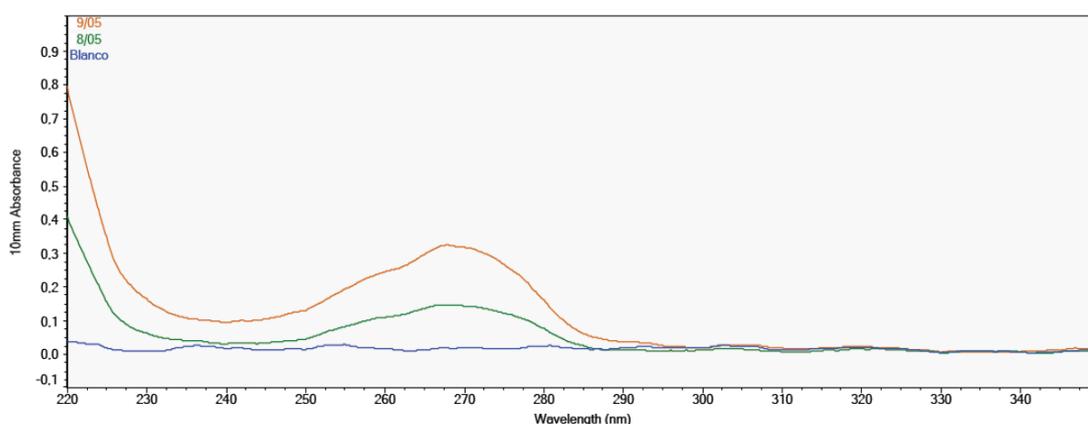


Figura 17. Espectro de muestras de ARN a partir de sedimento celular urinario cuantificadas por espectrofotometría con NanoDrop 2000™.

8/05, 9/05: muestras extraídas de ARN después del tratamiento con DNasa M1 y M2 respectivamente.

Los resultados de cuantificación mostraron una concentración baja de ARN, ratios de pureza aceptables que no bajaron de 1.50 y un espectro que indica el desplazamiento del pico de 260 nm correspondiente a ARN hacia la derecha ubicado alrededor de los 270 nm, tanto para la muestra M1 como para la muestra M2.

Para comprobar la cuantificación realizada, se evaluó cualitativamente las muestras mediante electroforesis en gel de agarosa. La evaluación cualitativa mediante electroforesis en gel de agarosa corroboró la ausencia de ARN, como se muestra en la Figura 18, lo cual se esperaba de acuerdo a la baja concentración de ARN cuantificado anteriormente.

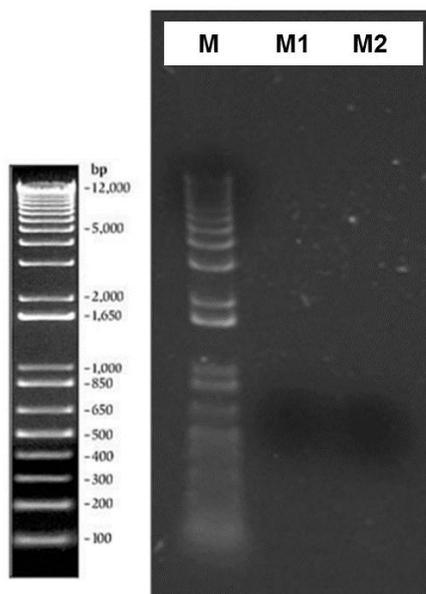


Figura 18. Evaluación cualitativa de ARN de sedimento celular urinario mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Gel de agarosa teñido con SYBR Safe. (M): Marcador 1Kb Plus de Invitrogen, (M1, M2): muestras extraídas de ARN después del tratamiento con DNasa.

Con el objetivo de comprobar la integridad de las muestras de ARN, se montó un ensayo de RT-PCR convencional del gen 18S previamente estandarizado, como se detalla en la sección 12 de Metodología. En la Figura 19 se visualiza la corrida electroforética de los resultados del ensayo de RT-PCR con la muestra de ARN de sedimento celular urinario M2.

En la corrida del sistema 18S con ARN de sedimento celular urinario, se observa una banda correspondiente al fragmento amplificado (81 pb) en ambos controles positivos (+1 y +2), la cual se sitúa por debajo respecto a la altura de la banda de 100 pb del marcador de peso molecular, con lo cual se corrobora la existencia de ARN íntegro en las muestras extraídas a partir de orina. Se comprueba en la electroforesis la ausencia de contaminación de la muestra de ARN con ADN genómico en el control negativo con Taq polimerasa sin enzima RT (-P), y la ausencia de contaminación del ensayo en el control negativo sin ARN (-A).

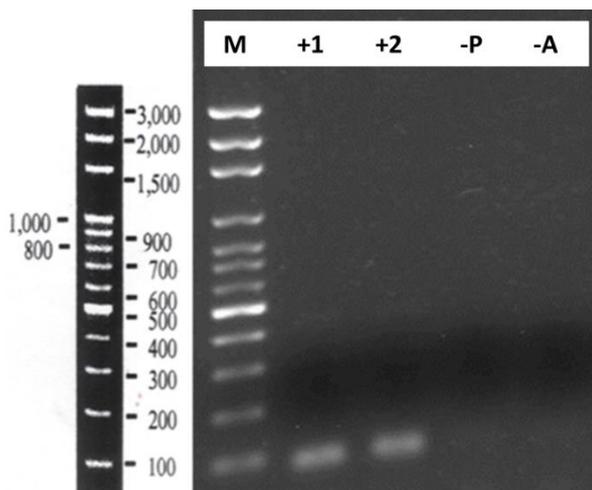


Figura 19. Ensayo de RT-PCR convencional del gen 18S con muestra de ARN de sedimento celular urinario.

Fotografía de gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR Safe. Muestra: M2. (M): Marcador de peso molecular de 100pb Labnet, (+1, +2): Controles positivos del gen 18S, (-P): Control negativo con Taq Polimerasa sin enzima RT, (-A): Control negativo sin ADN.

8. Análisis de estabilidad y almacenamiento del RNAlater

Para definir las posibles condiciones de almacenamiento de las muestras de sedimento celular recolectado de orina, se llevaron a cabo dos ensayos para comprobar si el estabilizador de ARN preparado (RNAlater) puede preservar el ARN íntegro dentro de las células del sedimento urinario, como se detalla en la sección 16 de Metodología. Se partió de un volumen de 100 mL de orina por cada muestra.

Los resultados de cuantificación de las muestras de ARN de sedimento celular urinario correspondientes al primer ensayo se presentan en la Tabla 27 y los espectros de cada muestra se visualizan en la Figura 20.

Los resultados de cuantificación son muy similares entre ellos y también respecto a extracciones de ARN anteriores en este tipo de muestras, con concentración baja de ARN, radios de pureza aceptables que no bajaron de 1.50 y un espectro que indica el desplazamiento del pico de 260 nm correspondiente a ARN hacia la derecha ubicado alrededor de los 270 nm.

Tabla 27.

Valores de cuantificación por espectrofotometría con NanoDrop 2000™ de la extracción de ARN a partir de sedimento celular urinario correspondiente al primer ensayo de RNAlater.

Muestra	A260	Concentración (ng/μL)	260/280	260/230
Blanco	0.008	0.3	-5.24	0.55
3H	0.248	9.9	1.55	1.65
2H	0.204	8.2	1.60	1.64
1H	0.204	8.2	1.68	1.54
0H	0.195	7.8	1.74	1.60

Blanco: agua libre de RNAsas utilizado como blanco en el equipo. 3H (3 horas), 2H (3 horas), 1H (1 hora), 0H (0 horas): muestras extraídas de ARN luego de la incubación a TA con RNAlater, la cuantificación se llevó a cabo después del tratamiento con DNasa.

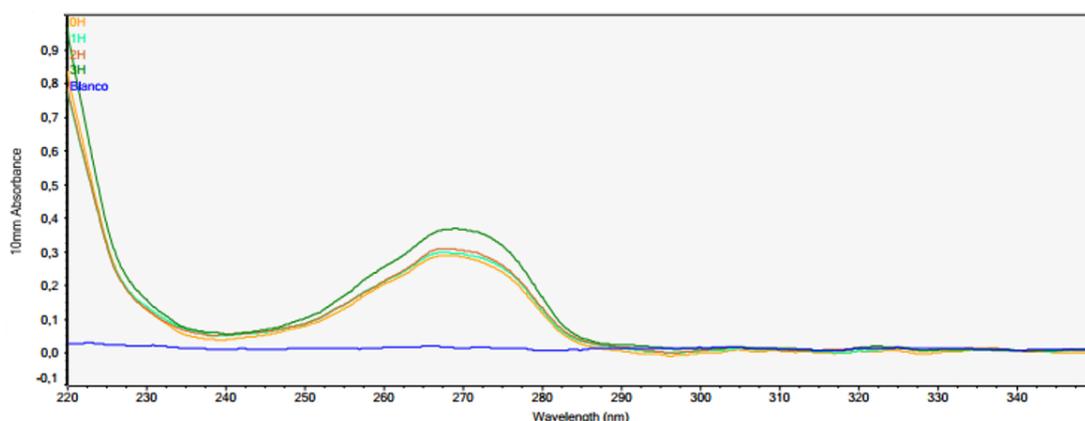


Figura 20. Espectro de muestras de ARN a partir de sedimento celular urinario cuantificadas por espectrofotometría con NanoDrop 2000™ correspondiente al primer ensayo de RNAlater.

Blanco: agua libre de RNAsas utilizado como blanco en el equipo. 3H (3 horas), 2H (3 horas), 1H (1 hora), 0H (0 horas): muestras extraídas de ARN luego de la incubación a TA con RNAlater, la cuantificación se llevó a cabo después del tratamiento con DNasa.

Con el objetivo de comprobar la integridad de las muestras de ARN, se montó un ensayo de RT-PCR convencional del gen 18S previamente estandarizado, como se detalla en la sección 12 de Metodología.

En la Figura 21 se visualiza la corrida electroforética de los resultados del ensayo de RT-PCR con las muestras de ARN de sedimento celular urinario del primer ensayo de RNAlater.

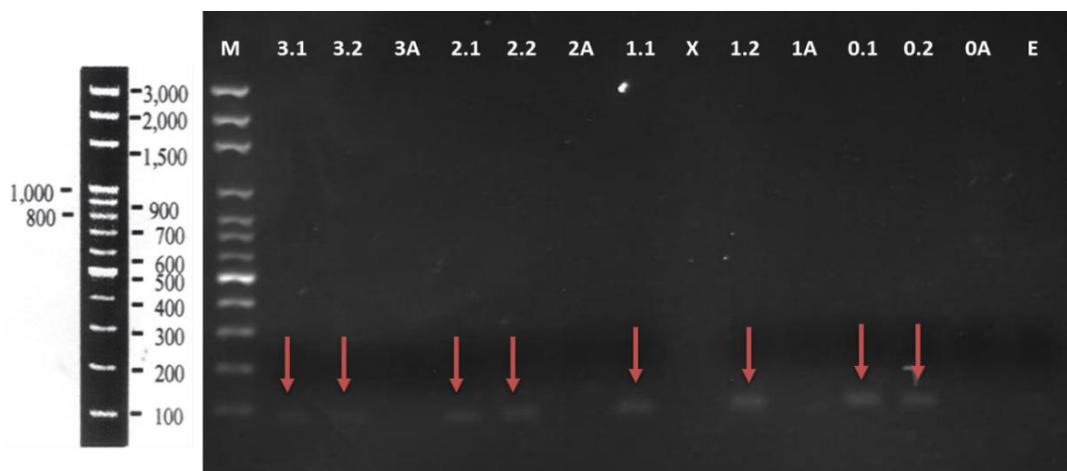


Figura 21. Ensayo de RT-PCR convencional del gen 18S con muestra de ARN de sedimento celular urinario correspondiente al primer ensayo de RNAlater. Fotografía de gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR Safe. (M): Marcador de peso molecular de 100pb Labnet. (3) 3 horas, (2) 2 horas, (1) 1 hora, (0) 0 horas: Controles positivos del gen 18S. (A): Control negativo con Taq Polimerasa sin enzima RT. (E): Control negativo sin ADN. (X): Pocillo vacío. Flechas rojas: controles positivos.

La corrida electroforética de los resultados del ensayo de RT-PCR convencional mostró que todos los controles positivos de las muestras del primer ensayo de RNAlater amplificaron. No se presentó contaminación de las muestras de ARN con ADN genómico en el control negativo con Taq polimerasa sin enzima RT (-P) y tampoco se evidenció contaminación del ensayo en el control negativo sin ARN (-A). Como resultado del ensayo se comprobó que tras un tiempo de incubación de hasta 3 horas a temperatura ambiente, el RNAlater mantiene íntegro el ARN dentro del sedimento celular urinario.

Los resultados de cuantificación de las muestras de ARN de sedimento celular urinario correspondientes al segundo ensayo se presentan en la Tabla 28, y los espectros de cada muestra se visualizan en la Figura 22.

Tabla 28.

Valores de cuantificación por espectrofotometría con NanoDrop 2000™ de la extracción de ARN a partir de sedimento celular urinario correspondiente al segundo ensayo de RNAlater.

Muestra	A260	Concentración (ng/μL)	260/280	260/230
Blanco	0.012	0.5	-31.00	0.62
12H	0.256	10.2	1.59	2.00
6H	0.209	8.3	1.65	2.58
4H	0.226	9.0	1.58	2.59
0H 80	0.162	6.5	1.65	3.12
0H	0.137	5.5	1.66	3.52

Blanco: agua libre de RNAsas utilizado como blanco en el equipo. 12H (12 horas y ultracongelación), 6H (6 horas y ultracongelación), 4H (4 hora y ultracongelación), 0H 80 (0 horas y ultracongelación), 0H (0 horas): muestras extraídas de ARN luego de la incubación a TA con RNAlater, la cuantificación se llevó a cabo después del tratamiento con DNasa.

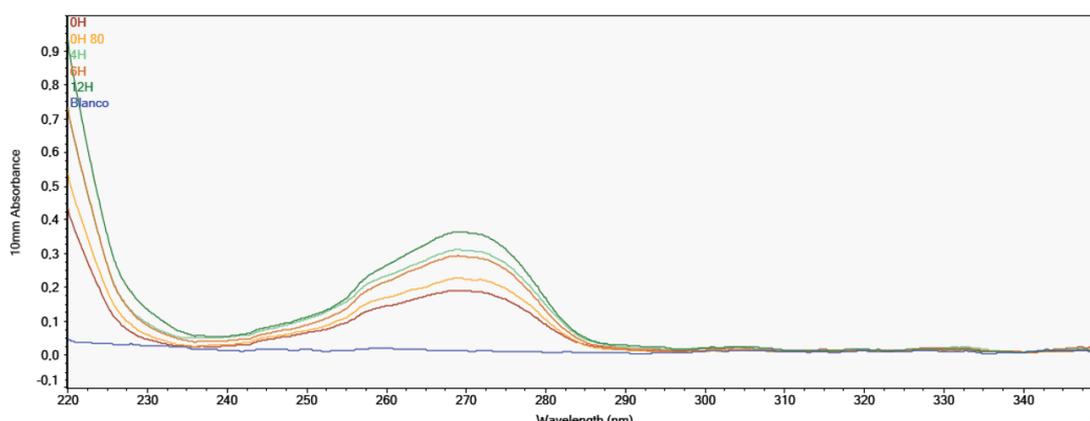


Figura 22. Espectro de muestras de ARN a partir de sedimento celular urinario cuantificadas por espectrofotometría con NanoDrop 2000™ correspondiente al segundo ensayo de RNAlater.

Blanco: agua libre de RNAsas utilizado como blanco en el equipo. 12H (12 horas y ultracongelación), 6H (6 horas y ultracongelación), 4H (4 hora y ultracongelación), 0H 80 (0 horas y ultracongelación), 0H (0 horas): muestras extraídas de ARN luego de la incubación a TA con RNAlater, la cuantificación se llevó a cabo después del tratamiento con DNasa.

Los resultados de cuantificación son muy similares entre ellos y también respecto a extracciones de ARN anteriores en este tipo de muestras respecto a concentración y radio 260/280. Sin embargo, la pureza 260/230 es alta en

la mayoría de muestras, aunque no supone un problema importante para aplicaciones posteriores. Cada muestra en este ensayo posee concentración baja de ARN, radio de pureza 260/280 aceptable que no bajó de 1.50 y un espectro que indica el desplazamiento del pico de 260 nm correspondiente a ARN hacia la derecha ubicado alrededor de los 270 nm, tal y como se obtuvo en las muestras del primer ensayo de RNAlater y extracciones anteriores de ARN a partir de sedimento celular urinario.

Al igual que en el primer ensayo de RNAlater, con el fin de comprobar la integridad de las muestras de ARN, se montó un ensayo de RT-PCR convencional del gen 18S previamente estandarizado, como se detalla en la sección 12 de Metodología. En la Figura 23 se visualiza la corrida electroforética de los resultados del ensayo de RT-PCR con las muestras de ARN de sedimento celular urinario del segundo ensayo de RNAlater.

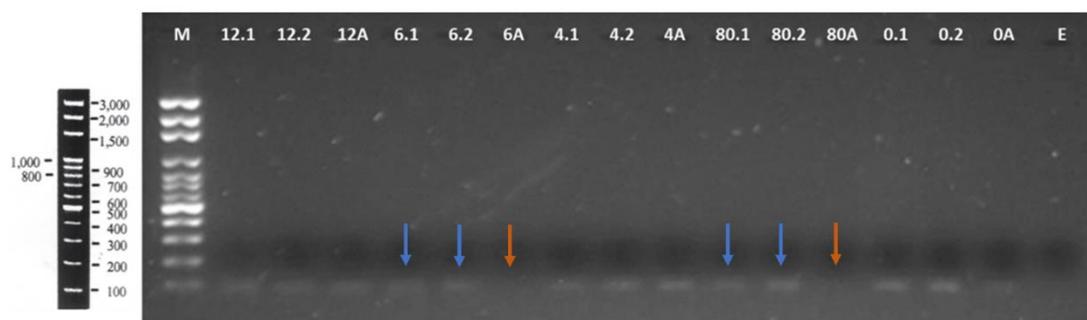


Figura 23. Ensayo de RT-PCR convencional del gen 18S con muestra de ARN de sedimento celular urinario correspondiente al segundo ensayo de RNAlater.

Fotografía de gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR Safe. (M): Marcador de peso molecular de 100pb Labnet. (12) 12 horas y ultracongelación, (6) 6 horas y ultracongelación, (4) 4 hora y ultracongelación, (80) 0 horas y ultracongelación, (0) 0 horas: Controles positivos del gen 18S. (A): Control negativo con Taq Polimerasa sin enzima RT. (E): Control negativo sin ADN. Flechas azules: controles positivos válidos, Flechas naranja: controles negativos válidos.

La corrida electroforética de los resultados del ensayo de RT-PCR convencional mostró que todas las muestras del segundo ensayo de RNAlater amplificaron. Sin embargo, se presentó amplificación en algunos controles negativos con Taq polimerasa sin enzima RT (A) y, por ende, se comprobó contaminación con ADN genómico en las muestras de ARN correspondientes

a los tiempos de incubación a temperatura ambiente de 12, 4 y 0 horas. No existió contaminación del ensayo en el control negativo sin ARN (-A). Los resultados del ensayo muestran que tras un tiempo de incubación de hasta 6 horas a temperatura ambiente, el RNAlater mantiene íntegro el ARN dentro del sedimento celular urinario. También se comprobó que el sedimento celular recolectado de orina y suspendido en RNAlater no se degrada tras someterlo a ultracongelación a una temperatura de -80°C .

9. Optimización de RT-qPCR con SYBR® Green

Los sistemas de RT-qPCR con SYBR® Green para los genes 18S y FOXP3 se estandarizaron tras realizarse varios ensayos en los que se modificó la temperatura de annealing y el número de ciclos de cada sistema, hasta llegar a las configuraciones de la reacción y programación del equipo mostradas en la sección 17 de Metodología.

Los resultados del ensayo de RT-qPCR con SYBR® Green para el gen 18S, donde se presentan los valores de Cq y las temperaturas de melting de los amplicones formados, se detallan en la Tabla 29. Las curvas de amplificación y de disociación obtenidas del ensayo del sistema 18S se muestran en las Figuras 24 y 25 respectivamente.

Tabla 29.

Resultados del ensayo de RT-qPCR con SYBR® Green para el gen 18S.

Muestra	Valor de Cq	T. de melting ($^{\circ}\text{C}$)
C1	9.571	79.38
C2	9.784	79.34
C3	9.764	79.32
C-	-	-

C1, C2, C3: Controles positivos. C-: Control negativo sin ARN.

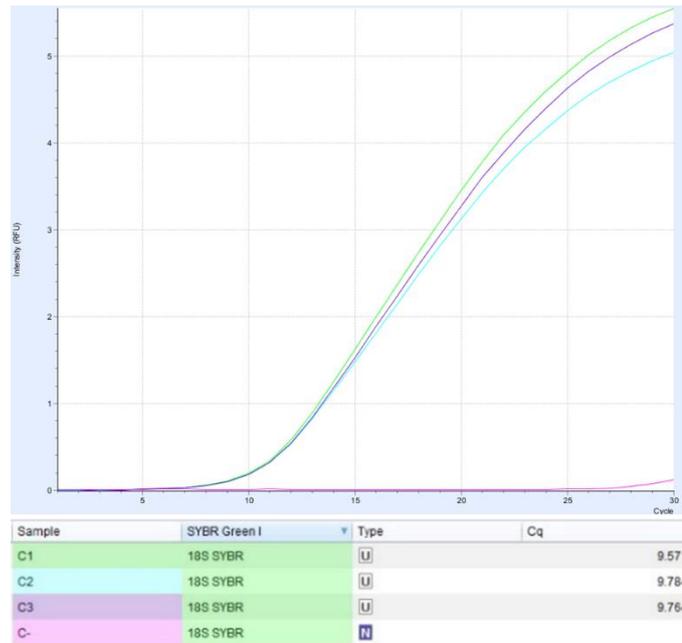


Figura 24. Curvas de amplificación y valores de Cq del ensayo de RT-qPCR con SYBR® Green para el gen 18S.

C1, C2, C3: Controles positivos. C-: Control negativo sin ARN.

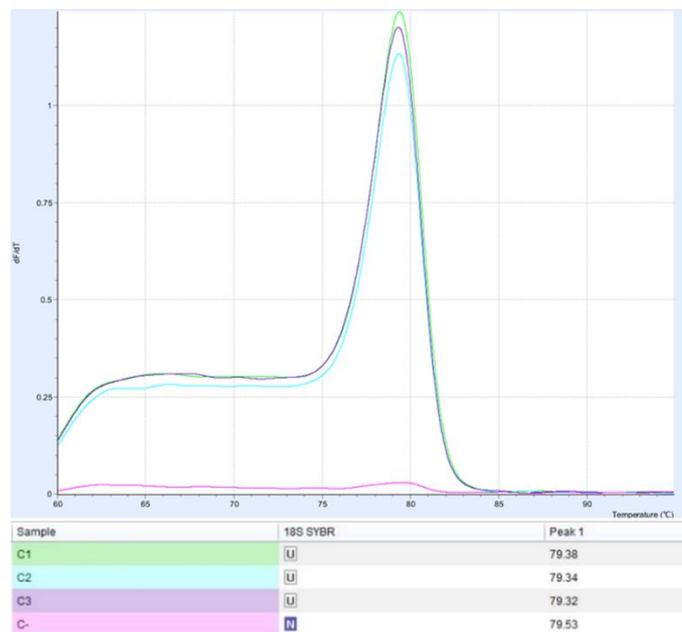


Figura 25. Curva de disociación y temperaturas de melting del ensayo de RT-qPCR con SYBR® Green para el gen 18S.

C1, C2, C3: Controles positivos. C-: Control negativo sin ARN.

En el ensayo del gen 18S, las curvas y datos muestran amplificación de los tres controles positivos (C1, C2 y C3) con un Cq muy similar, teniendo un valor de 9.706 en promedio. No se produjo amplificación del control negativo (C-), lo cual comprueba que no existió contaminación en el ensayo.

Las curvas de disociación muestran la formación de un solo amplicón con una temperatura de melting de 79.35 °C, casi igual a la temperatura de melting de 79.58 °C teórica calculada para el fragmento del gen 18S, lo que demuestra la formación del producto específico.

Los resultados del ensayo de RT-qPCR con SYBR® Green para el gen FOXP3, donde se presentan los valores de Cq y las temperaturas de melting de los amplicones formados, se detallan en la Tabla 30. Las curvas de amplificación y de disociación obtenidas del ensayo del sistema FOXP3 se muestran en la Figura 26 y 27 respectivamente.

En el ensayo del gen FOXP3, las curvas y datos muestran amplificación de los tres controles positivos (C1, C2 y C3) con un Cq muy similar, teniendo un valor de 34.340 en promedio. No se produjo amplificación del control negativo (C-), que demuestra que no existió contaminación en el ensayo.

Tabla 30.

Resultados del ensayo de RT-qPCR con SYBR® Green para el gen FOXP3.

Muestra	Valor de Cq	T. de melting (°C)	
		Amplicón	Dímeros
C1	34.607	82.74	-
C2	33.919	82.69	74.44
C3	34.495	82.70	-
C-	-	-	-

C1, C2, C3: Controles positivos. C-: Control negativo sin ARN.

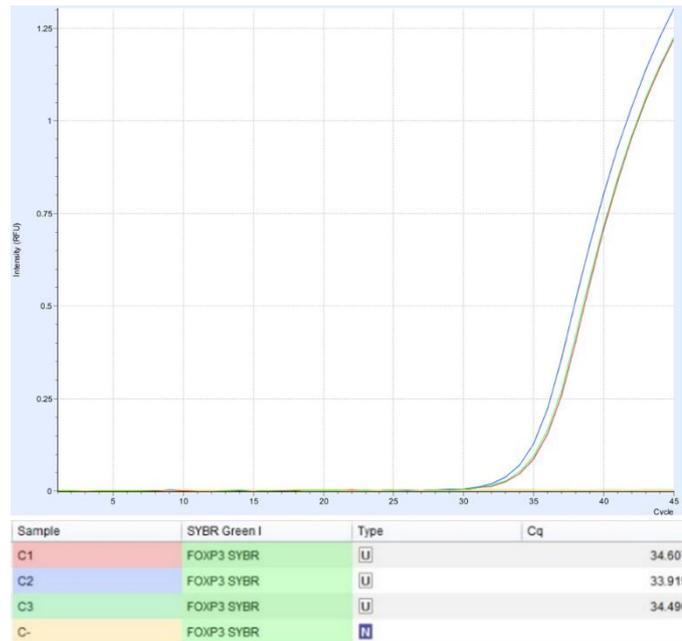


Figura 26. Curvas de amplificación y valores de Cq del ensayo de RT-qPCR con SYBR® Green para el gen FOXP3.

C1, C2, C3: Controles positivos. C-: Control negativo sin ARN.

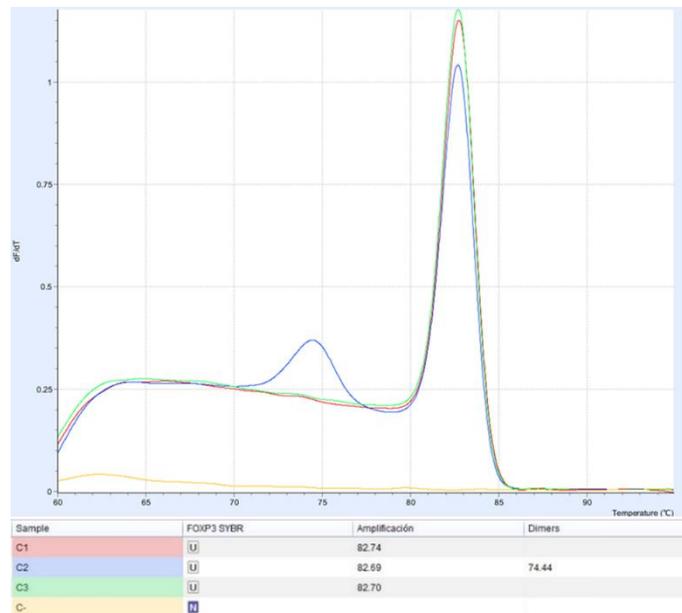


Figura 27. Curva de disociación y temperaturas de melting del ensayo de RT-qPCR con SYBR® Green para el gen FOXP3.

C1, C2, C3: Controles positivos. C-: Control negativo sin ARN.

La curva de disociación muestra la formación de un amplicón con una temperatura de melting de 82.71 °C, casi igual a la temperatura de melting de 82.88 °C teórica calculada para el fragmento del gen FOXP3, lo que demuestra la formación del producto específico. Sin embargo, también se muestra en la curva de disociación del control positivo C2 la formación de otro producto con una temperatura de melting de 74.44 °C, que se presume fue la formación de dímeros de cebadores.

En general, los sistemas de RT-qPCR con SYBR® Green de los genes 18S y FOXP3 se comportaron de manera distinta respecto a sus correspondientes sistemas en RT-PCR convencional, en donde las curvas y temperaturas de melting evidenciaron la ausencia de productos inespecíficos en ambos sistemas. Incluso se pudo bajar la temperatura de annealing a 63°C mejorando la amplificación, debido a que la temperatura de 66°C no favorecía la formación del producto específico.

10. Optimización de RT-qPCR con TaqMan®

Los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® para los genes 18S y FOXP3 se estandarizaron tras realizarse ensayos en los que se modificó el número de ciclos y se unificó la programación del equipo de ambos sistemas, hasta llegar a las configuraciones de la reacción y programación del equipo mostradas en la sección 18 de Metodología.

Los resultados del ensayo de RT-qPCR con TaqMan® para el gen 18S, donde se presentan los valores de C_q correspondientes a los amplicones formados, se detallan en la Tabla 31. Las curvas de amplificación obtenidas del ensayo del sistema 18S se muestran en la Figura 28.

En el ensayo del gen 18S, las curvas y datos muestran amplificación de los tres controles positivos (C1 18S, C2 18S y C3 18S) con un C_q muy similar, teniendo un valor de 24.695 en promedio, lo que demuestra la formación del producto específico. No se produjo amplificación del control negativo (C- 18S), que corrobora que no existió contaminación en el ensayo.

Tabla 31.

Resultados del ensayo de RT-qPCR con TaqMan® para el gen 18S.

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

C1 18S, C2 18S, C3 18S: Controles positivos. C- 18S: Control negativo sin ARN.

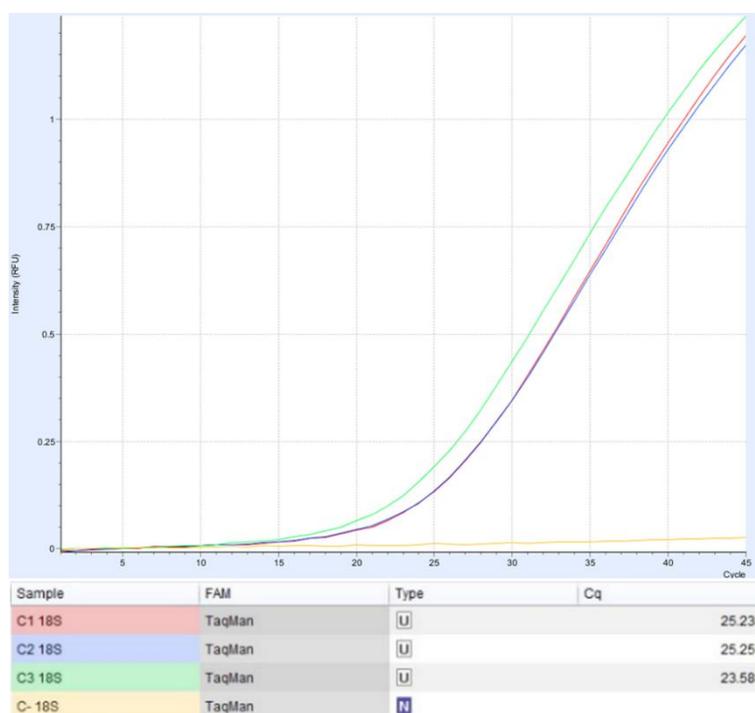


Figura 28. Curvas de amplificación y valores de Cq del ensayo de RT-qPCR con TaqMan® para el gen 18S.

C1 18S, C2 18S, C3 18S: Controles positivos. C- 18S: Control negativo sin ARN.

Los resultados del ensayo de RT-qPCR con TaqMan® para el gen FOXP3, donde se presentan los valores de Cq correspondientes a los amplicones formados, se presentan en la Tabla 32. Las curvas de amplificación obtenidas del ensayo del sistema FOXP3 se detallan en la Figura 29.

Tabla 32.

Resultados del ensayo de RT-qPCR con TaqMan® para el gen FOXP3.

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

C1 FOXP3, C2 FOXP3, C3 FOXP3: Controles positivos. C- FOXP3: Control negativo sin ARN.

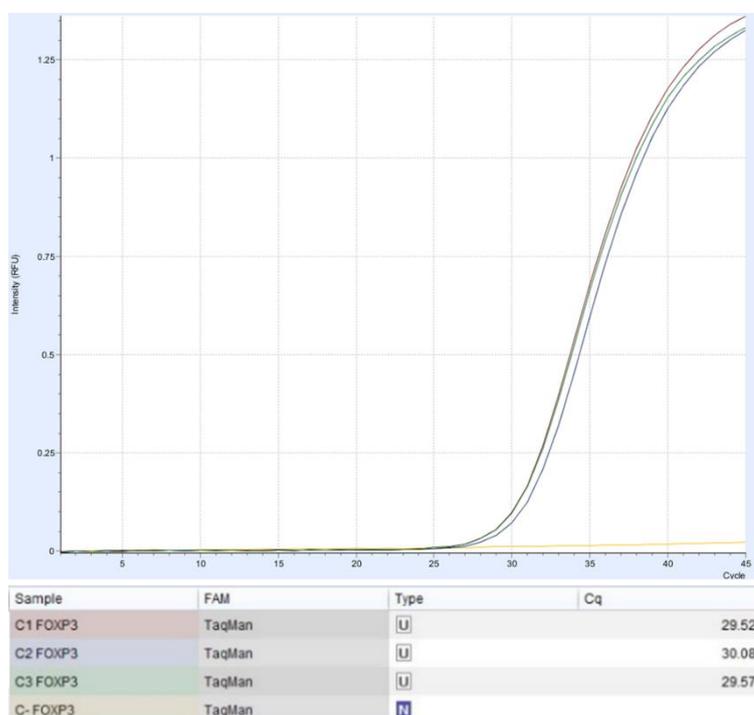


Figura 29. Curvas de amplificación y valores de Cq del ensayo de RT-qPCR con TaqMan® para el gen FOXP3.

C1 FOXP3, C2 FOXP3, C3 FOXP3: Controles positivos. C- FOXP3: Control negativo sin ARN.

En el ensayo del gen FOXP3, las curvas y datos muestran amplificación de los tres controles positivos (C1 FOXP3, C2 FOXP3 y C3 FOXP3) con un Cq muy similar, teniendo un valor de 29.727 en promedio, lo que comprueba la formación del producto específico. No se produjo amplificación del control negativo (C- FOXP3), lo cual indica que no existió contaminación en el ensayo.

Como resultado de los ensayos de optimización, los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® de los genes 18S y FOXP3 se comportaron de manera similar a sus respectivos sistemas en RT-PCR con SYBR® Green, pero con variaciones en los valores de Cq de cada sistema. Mientras el valor de Cq en el sistema TaqMan® de 18S fue más tardío, el valor de Cq en el sistema TaqMan® de FOXP3 fue más temprano, respecto a los resultados obtenidos en SYBR® Green.

11. Extracción de ARN a partir de leucocitos de sangre y cuantificación por espectrofotometría y fluorometría

La extracción, purificación y cuantificación de ARN a partir de leucocitos de sangre se llevó a cabo para verificar el valor de cuantificación dado por espectrofotometría y compararlo con el resultado en la cuantificación por fluorometría, como se especifica en la sección 19 de Metodología.

La evaluación cualitativa mediante electroforesis en gel de agarosa corroboró la presencia de ARN íntegro en la muestra y la eliminación del ADN después de aplicarse el protocolo de purificación, como se observa en la Figura 30.

Los datos de cuantificación por espectrofotometría y fluorometría se presentan en la Tabla 33 y los espectros de la muestra cuantificada por espectrofotometría se visualizan en la Figura 31.

Los resultados de cuantificación por espectrofotometría radios de pureza y espectro correspondientes a ARN en condiciones adecuadas para sus aplicaciones posteriores. Sin embargo, la concentración de la muestra antes y después de purificar es prácticamente la misma. Además, la curva se encuentra levemente desplazada a la derecha, en especial la depresión del pico alrededor de 230 nm de longitud de onda. Por otro lado, el valor de cuantificación por fluorometría muestra una concentración menor a la obtenida por espectrofotometría después de purificar.

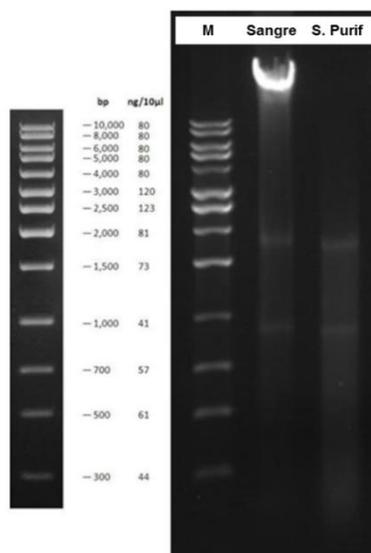


Figura 30. Evaluación cualitativa de ARN de leucocitos de sangre mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Gel de agarosa teñido con SYBR Safe. (M): Marcador 1Kb de Labnet, (Sangre): muestras extraídas de ARN antes del tratamiento con DNasa, (S. Purif): muestras extraídas de ARN después del tratamiento con DNasa.

Tabla 33.

Resultados de cuantificación por espectrofotometría con NanoDrop 2000™ y por fluorimetría con Qubit® 1.0 Fluorometer de la extracción de ARN de leucocitos de sangre.

Muestra	NanoDrop 2000™			Qubit® 1.0 Fluorometer	
	Conc. (ng/μL)	260/280	260/230	Conc. Diluida (ng/μL)	Conc. (ng/μL)
Blanco	0.5	3.25	0.41	-	-
Sangre	100.5	1.95	2.01	-	-
S. Purif	99.9	1.78	1.63	0.562	56.2

Blanco: agua libre de RNasas utilizado como blanco en el equipo, Sangre: muestra extraída de ARN antes del tratamiento con DNasa, S. Purif: muestra extraída de ARN después del tratamiento con DNasa.

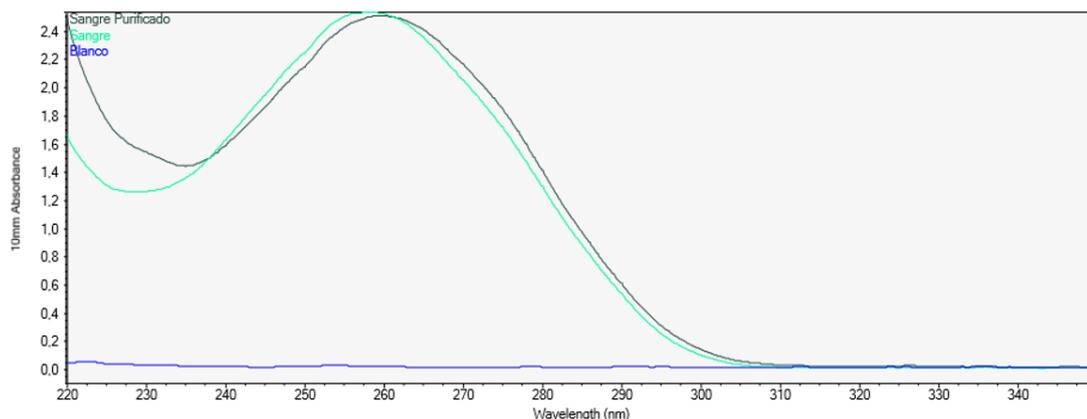


Figura 31. Espectro de muestras de ARN a partir de leucocitos de sangre cuantificadas por espectrofotometría con NanoDrop 2000™.

Blanco: agua libre de RNAsas utilizado como blanco en el equipo, Sangre: muestra extraída de ARN antes del tratamiento con DNasa, Sangre Purificado: muestra extraída de ARN después del tratamiento con DNasa.

Las imágenes de los resultados referentes a la cuantificación de ARN de leucocitos de sangre con Qubit® 1.0 Fluorometer se muestran en el Anexo 16.

12. Ensayo de sensibilidad analítica de RT-qPCR con TaqMan®

Los ensayos de sensibilidad analítica de los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® para los genes 18S y FOXP3 se llevaron a cabo conforme a lo detallado en la sección 20 de Metodología, los cuales permitieron identificar el límite de detección de cada sistema.

Como resultado del ensayo con el gen 18S, se encontró que el sistema es capaz de detectar y amplificar hasta una concentración de ARN de 1 fg/μL, correspondiente a la dilución 10^{-7} respecto a la concentración inicial de ARN, como se muestra en la Figura 32.

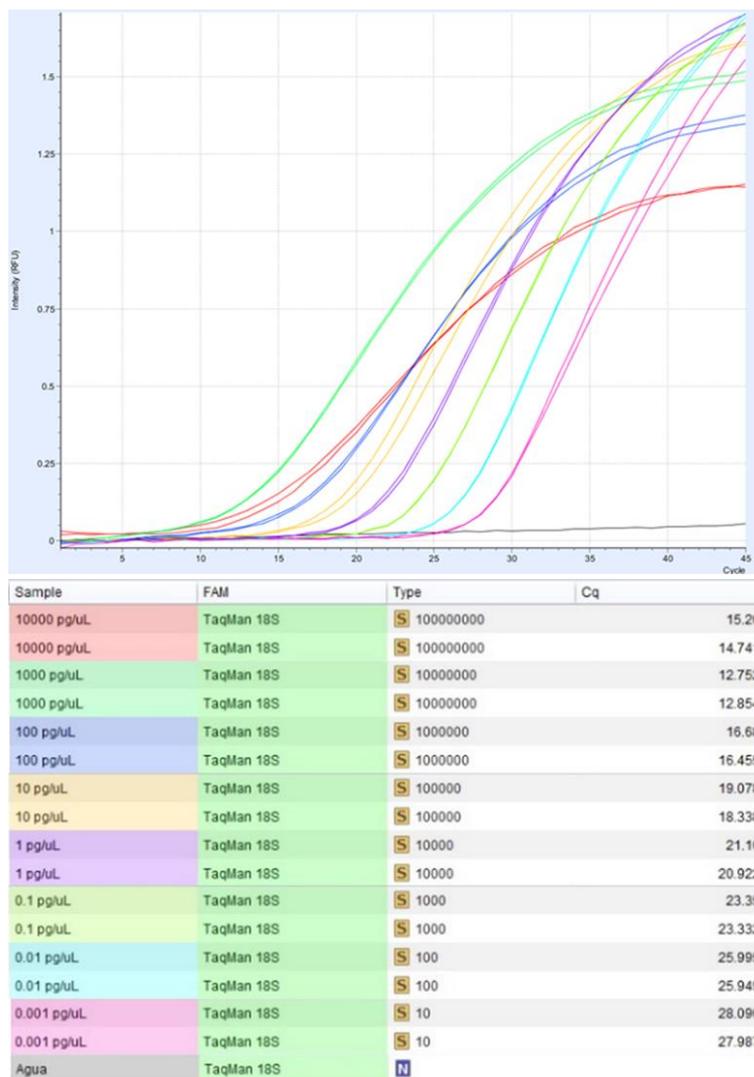


Figura 32. Curvas de amplificación y valores de Cq del ensayo de sensibilidad analítica de RT-qPCR con TaqMan® para el gen 18S.

Por otro lado, como resultado del ensayo con el gen FOXP3, se encontró que el sistema es capaz de detectar y amplificar hasta una concentración de ARN de 1 pg/μL, correspondiente a la dilución 10^{-4} respecto a la concentración inicial de ARN, como se muestra en la Figura 33.

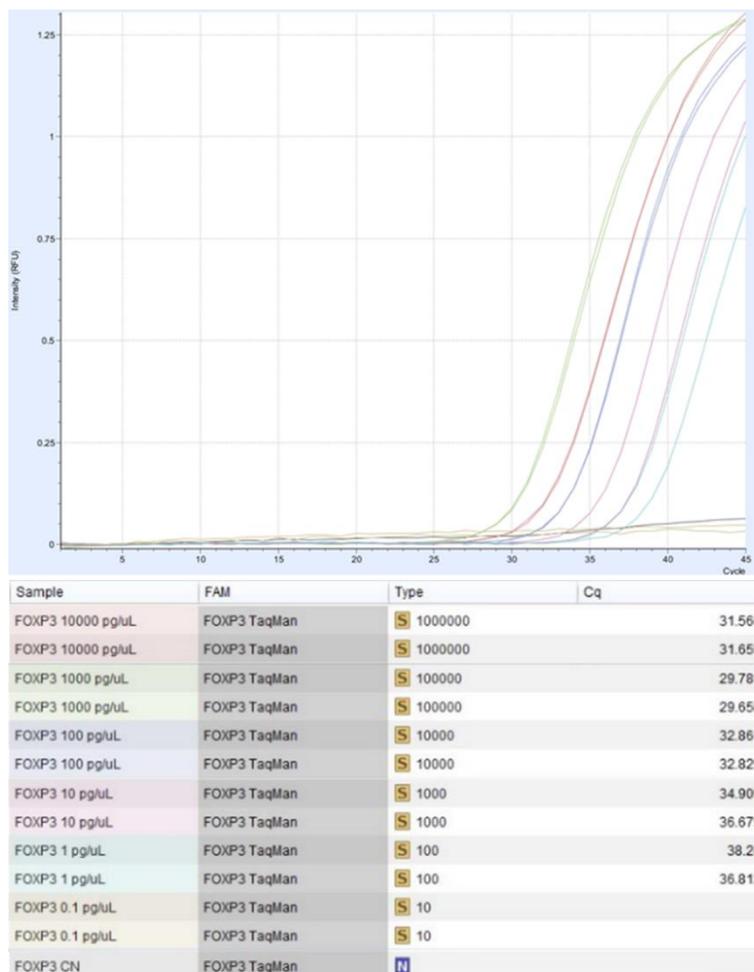


Figura 33. Curvas de amplificación y valores de Cq del ensayo de sensibilidad analítica de RT-qPCR con TaqMan® para el gen FOXP3.

13. Análisis de la eficiencia relativa de amplificación

Las eficiencias relativas de amplificación de los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® se calcularon para los sistemas 18S y FOXP3, como se detalla en la sección 21 de Metodología. Para el cálculo de las eficiencias de amplificación, se tomaron los datos de los resultados obtenidos en los ensayos de sensibilidad analítica. Sin embargo, se descartaron los Cq de las reacciones con la mayor concentración de ARN (10 ng/μL) en ambos sistemas, debido a que obtuvieron valores de Cq más tardíos respecto a las reacciones con la primera concentración diluida de ARN (1 ng/μL), como se muestra en las Figuras 32 y 33 en la sección anterior, para los sistemas 18S

y FOXP3 respectivamente. También, no se tomaron en cuenta los valores más diluidos del sistema 18S (menores a 1 pg/ μ L) para trabajar con el mismo número de diluciones que FOXP3, esto debido a que este sistema no amplificó a concentraciones iguales o menores a 0.1 pg/ μ L.

En las Tablas 34 y 35, se muestran los valores de Cq de las dupletas y Cq promedio obtenidos para cada concentración de ARN en los ensayos de los sistemas 18S y FOXP3 respectivamente. También se indican los valores calculados de logaritmos en base 10 y base 2 de las concentraciones de ARN.

Tabla 34.

Concentraciones de ARN y valores de Cq correspondientes del sistema de RT-qPCR con TaqMan® para el gen 18S.

Conc. ARN [fg/ μ L] (Q)	Cq	Cq Promedio	log ₁₀ Q	log ₂ Q
1000000	12.752	12.803	6	19.9315686
	12.854			
100000	16.680	16.5675	5	16.6096405
	16.455			
10000	19.078	18.708	4	13.2877124
	18.338			
1000	21.160	21.041	3	9.96578428
	20.922			

Tabla 35.

Concentraciones de ARN y valores de Cq correspondientes del sistema de RT-qPCR con TaqMan® para el gen FOXP3.

Conc. ARN [fg/ μ L] (Q)	Cq	Cq Promedio	log ₁₀ Q	log ₂ Q
1000000	29.781	29.7195	6	19.9316
	29.658			
100000	32.861	32.845	5	16.6096
	32.829			
10000	34.909	35.8605	4	13.2877
	36.812			
1000	38.240	37.526	3	9.96578
	36.812			

Las curvas estándar obtenidas de logaritmo en base 10 y en base 2 de la concentración de ARN inicial vs el valor de Cq promedio, incluyendo la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación (R^2), se visualizan en las Figuras 34 y 35, para el sistema 18S, y en las Figuras 36 y 37, para el sistema FOXP3, respectivamente.

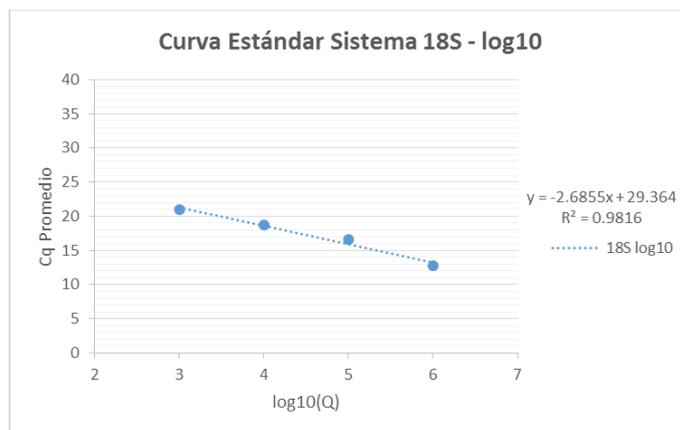


Figura 34. Curva estándar de logaritmo en base 10 de la concentración de ARN inicial vs el valor de Cq promedio del sistema de RT-qPCR con TaqMan® para el gen 18S.

En la parte derecha de la figura se presenta la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación (R^2).

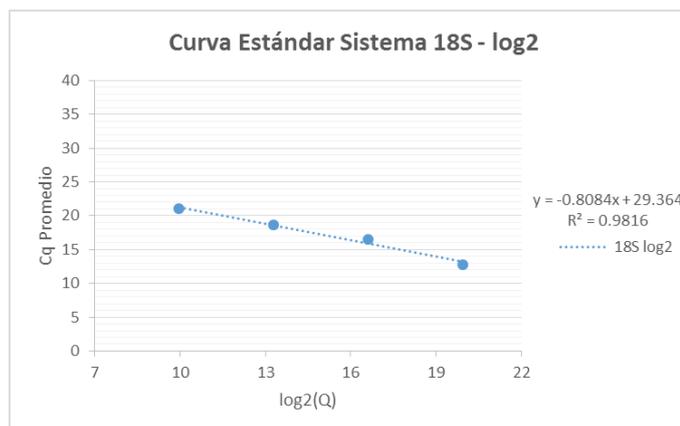


Figura 35. Curva estándar de logaritmo en base 2 de la concentración de ARN inicial vs el valor de Cq promedio del sistema de RT-qPCR con TaqMan® para el gen 18S.

En la parte derecha de la figura se presenta la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación (R^2).

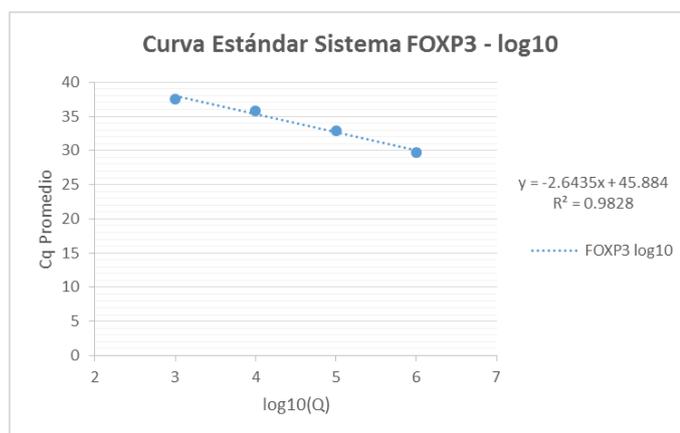


Figura 36. Curva estándar de logaritmo en base 10 de la concentración de ARN inicial vs el valor de Cq promedio del sistema de RT-qPCR con TaqMan® para el gen FOXP3.

En la parte derecha de la figura se presenta la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación (R^2).

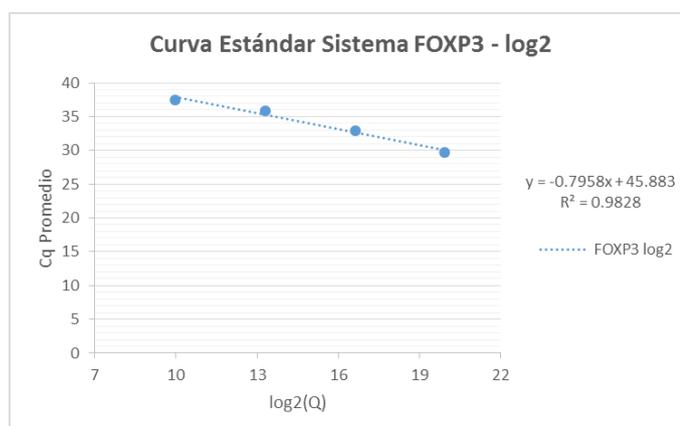


Figura 37. Curva estándar de logaritmo en base 2 de la concentración de ARN inicial vs el valor de Cq promedio del sistema de RT-qPCR con TaqMan® para el gen FOXP3.

En la parte derecha de la figura se presenta la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación (R^2).

Para el cálculo de la eficiencia de amplificación expresada en porcentaje (PEA) y en función del aumento del producto por ciclo (EA) se utilizaron las pendientes obtenidas en las ecuaciones de las gráficas Cq vs. Log₁₀ (Q) o Log₂ (Q) de cada sistema, y las Ecuaciones 1 y 2 descritas en la sección 21

de Metodología. Las eficiencias de amplificación para los sistemas 18S y FOXP3 se muestran en la Tabla 36.

Tabla 36.

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

Sistema	m (log10)	m (log2)	PEA	EA
18S	-2.6855	-0.8084	135.70	2.357
FOXP3	-2.6435	-0.7958	138.93	2.389

Para comprobar si los sistemas tenían eficiencias de amplificación similares, se construyó una gráfica ΔCq versus el logaritmo en base 10 de la concentración de ARN, como se describe en la sección 21 de Metodología. Del análisis de eficiencia relativa de amplificación de cada sistema, se descartaron los valores de Cq del sistema FOXP3 correspondientes a las concentraciones de ARN de 100, 10 y 1 fg/ μ L, debido a que el sistema FOXP3 no posee esos datos al tener una menor sensibilidad analítica. Por lo tanto, se utilizaron los valores de Cq promedio de las concentraciones de ARN en común entre ambos sistemas.

En la Tabla 37, se presentan los valores de Cq promedio de 18S y FOXP3 y los ΔCq promedio obtenidos para cada concentración de ARN. También se indican los valores calculados de logaritmos en base 10 de las concentraciones de ARN consideradas para el análisis.

Tabla 37.

Cálculo del logaritmo en base 10 de la concentración de ARN inicial y el valor de ΔCq de los sistemas 18S y FOXP3.

Conc. ARN [fg/μL] (Q)	Cq Prom. 18S	Cq Prom. FOXP3	ΔCq Prom.	log10 Q
1000000	12.803	29.7195	16.917	6
100000	16.5675	32.845	16.278	5
10000	18.708	35.8605	17.153	4
1000	21.041	37.526	16.485	3

La curva de correlación entre el logaritmo en base 10 de la concentración de ARN inicial vs el valor de Cq promedio, incluyendo la ecuación de la recta, se visualizan en la Figura 38.

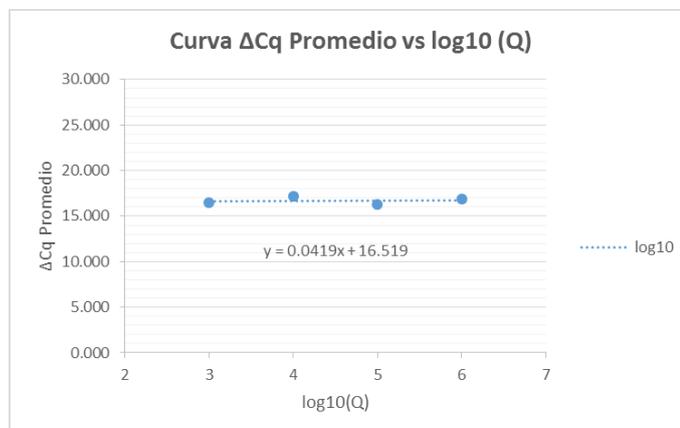


Figura 38. Curva ΔCq promedio vs. $\text{Log}_{10}(Q)$ correspondiente a los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® para los genes 18S y FOXP3.

En la figura se presenta la ecuación de la recta, incluyendo la pendiente (m).

En la ecuación de la recta formada tras la regresión lineal, se obtiene un valor de la pendiente (m) de 0.0419. Al ser el valor absoluto de la pendiente de ΔCq vs. $\text{Log}_{10}(Q)$ menor que 0.1, se concluye que las eficiencias relativas de amplificación de los sistemas 18S y FOXP3 son iguales.

14. Extracción de ARN a partir del sedimento celular de muestras clínicas de orina de pacientes no trasplantados y trasplantados renales

Las muestras de orina de pacientes no trasplantados y trasplantados renales se recolectaron y procesaron para la obtención de sedimento celular, como se especifica en las secciones 22 y 23 de Metodología. A partir del sedimento celular urinario de cada paciente, se aisló, purificó y cuantificó el ARN según lo detallado en la sección 24 de Metodología. Se partió de un volumen de 60 mL de orina por cada paciente.

Los datos de cuantificación por espectrofotometría del primer y segundo ensayo de extracción de ARN con muestras de pacientes no trasplantados renales, se presentan en la Tabla 38 y 39 respectivamente.

Tabla 38.

Valores de cuantificación por espectrofotometría con NanoDrop 2000™ del primer ensayo de extracción de ARN a partir de sedimento celular de muestras de orina de pacientes no trapiantados.

Muestra	A260	Concentración (ng/μL)	260/280	260/230
Blanco	0.008	0.3	2.88	0.37
NT1	0.400	16.0	1.65	1.57
NT2	0.082	3.3	1.61	1.39
NT3	0.491	19.6	1.51	0.92
NT4	0.040	1.6	1,86	-1.37
NT5	0.068	2.7	1.64	0.66

Blanco: buffer de elución utilizado como blanco en el equipo. NT1, NT2, NT3, NT4, NT5: muestras de ARN de orina de pacientes no trasplantados.

Tabla 39.

Valores de cuantificación por espectrofotometría con NanoDrop 8000™ del segundo ensayo de extracción de ARN a partir de sedimento celular de muestras de orina de pacientes no trapiantados.

Muestra	A260	Concentración (ng/μL)	260/280	260/230
Blanco	0.010	0.4	0.52	0.26
NT6	0.457	18.3	1.70	1.09
NT7	0.400	27.7	1.73	1.42

Blanco: buffer de elución utilizado como blanco en el equipo. NT6, NT7: muestras de ARN de orina de pacientes no trasplantados.

En el primer ensayo de aislamiento y purificación de ARN de muestras de orina de pacientes no trasplantados, se obtuvieron sólo dos muestras de ARN (NT1 y NT3) con la concentración mínima necesaria para llevar a cabo los ensayos posteriores. Se descartaron las muestras NT2, NT4 y NT5 debido a errores en la colección de la muestra de orina y a las bajas concentraciones de ARN producto de esto. Por lo tanto, se llevó a cabo un segundo ensayo con muestras de pacientes no trasplantados, en el cual se obtuvieron las dos muestras faltantes (NT6 y NT7) para los ensayos de RT-qPCR con TaqMan®.

Los resultados de cuantificación por espectrofotometría del ensayo de extracción de ARN con muestras de pacientes trasplantados renales se presentan en la Tabla 40.

Tabla 40.

Valores de cuantificación por espectrofotometría con NanoDrop 2000™ del ensayo de extracción de ARN a partir de sedimento celular de muestras de orina de pacientes trasplantados.

Muestra	A260	Concentración (ng/μL)	260/280	260/230
Blanco	-0.009	-0.3	0.78	-7.83
T1	0.332	13.3	1.49	1.31
T2	0.403	16.1	1.52	1.49
T3	0.260	10.4	1.44	3.12
T4	0.209	8.3	1,48	1.89
T5	0.212	8.5	1.46	2.66

Blanco: buffer de elución utilizado como blanco en el equipo. T1, T2, T3, T4, T5: muestras de ARN de orina de pacientes trasplantados.

En el ensayo de aislamiento de ARN a partir de orina de pacientes trasplantados, todas las muestras extraídas contaban con la concentración mínima necesaria para llevar a cabo los ensayos posteriores. Por lo tanto se tomaron las cuatro muestras con mayor concentración de ARN (T1, T2, T3 y T5) para los ensayos de RT-qPCR con TaqMan®.

Los espectros obtenidos en los ensayos de cuantificación por espectrofotometría de muestras de ARN a partir de sedimento celular de orina de pacientes no trasplantados y trasplantados con NanoDrop se muestran en el Anexo 18.

15. Evaluación de los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® en muestras clínicas

La evaluación de los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® del gen blanco FOXP3 y el gen de referencia 18S se llevó a cabo en 8 muestras clínicas de ARN a partir de orina, de las cuales 4 muestras correspondieron a pacientes no trasplantados (NT1, NT3, NT6 y NT7), y 4 a pacientes trasplantados renales (T1, T2, T3 y T5). Se estableció un total de 6 ensayos según el diseño experimental detallado en la sección 25 de Metodología.

En la Tabla 41, se presentan los valores de Cq resultados de los ensayos 1 y 3, que corresponden a la evaluación de los sistemas de RT-qPCR con

TaqMan® de los genes 18S y FOXP3 en las muestras clínicas de ARN de orina de los 4 pacientes no trasplantados que fueron evaluados.

Tabla 41.

Valores de Cq resultados de los ensayos 1 y 3 correspondientes a la evaluación de los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® de los genes 18S y FOXP3 en muestras clínicas de ARN de orina de pacientes no trasplantados.

Paciente	Repetición	Ensayo 1		Ensayo 3	
		18S	FOXP3	18S	FOXP3
NT1	1	19.313	-	19.502	-
	2	19.208	-	19.298	-
	3	18.169	-	18.403	-
NT3	1	28.537	-	28.934	-
	2	28.795	-	29.025	-
	3	29.084	-	28.949	-
NT6	1	19.154	-	19.180	-
	2	19.199	-	19.071	-
	3	18.650	-	18.764	-
NT7	1	18.281	-	19.305	-
	2	18.710	-	19.455	-
	3	18.709	-	19.371	-
C+ (Sangre)	1	12.892	29.724	13.489	30.642
	2	12.319	29.653	13.328	30.393
C- (Agua)	1	-	-	-	-

NT1, NT3, NT6, NT7: muestras de ARN de orina de pacientes no trasplantados.

Los resultados de los ensayos con muestras de ARN de pacientes no trasplantados indican amplificación del producto en todas las tripletas de los pacientes en el sistema 18S con valores similares entre las repeticiones de cada muestra. Por otro lado, ninguna de las muestras de pacientes no trasplantados mostró formación del amplicón en el sistema FOXP3.

Los controles positivos (C+), con ARN de sangre, amplificaron conforme a lo esperado para cada sistema. Los controles negativos (C-), con agua libre de nucleasas, no presentaron amplificación, demostrando que no existió contaminación en ninguno de los ensayos.

En la Tabla 42, se presentan los valores de Cq resultados de los ensayos 4, 5 y 6, que corresponden a la evaluación de los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® de los genes 18S y FOXP3 en las muestras clínicas de ARN de orina de los 4 pacientes trasplantados que fueron evaluados.

Tabla 42.

Valores de Cq resultados de los ensayos 4, 5 y 6 correspondientes a la evaluación de los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® de los genes 18S y FOXP3 en muestras clínicas de ARN de orina de pacientes trasplantados.

Paciente	Repetición	Ensayo 4		Ensayo 5		Ensayo 6	
		18S	FOXP3	18S	FOXP3	18S	FOXP3
T1	1	17.586	-	17.807	-	17.735	-
	2	17.513	-	17.831	-	17.811	-
	3	17.289	-	16.922	-	16.953	-
T2	1	13.730	-	14.360	-	14.206	-
	2	14.333	-	14.605	-	14.217	-
	3	14.468	-	14.255	-	14.287	-
T3	1	16.751	30.502	16.918	30.833	16.859	30.904
	2	16.719	-	16.788	30.675	16.782	-
	3	16.259	30.902	16.103	30.478	16.497	30.315
T5	1	18.427	-	18.484	-	18.466	-
	2	18.677	-	18.847	-	19.081	-
	3	18.598	-	18.807	-	19.060	-
C+ (Sangre)	1	12.982	30.219	13.040	30.157	14.995	30.509
	2	13.730	30.202	12.896	30.029	13.759	30.873
C- (Agua)	1	-	-	-	-	-	-

T1, T2, T3, T5: muestras de ARN de orina de pacientes trasplantados.

Los resultados de los ensayos con muestras de ARN de pacientes trasplantados indican amplificación del producto en todas las trietas de los pacientes en el sistema 18S con valores muy similares entre las repeticiones de cada muestra. Por otro lado, únicamente la muestra del paciente trasplantado T3 mostró formación del amplicón en el sistema FOXP3. Sin embargo, se obtuvieron valores de Cq en 7 de las 9 reacciones en los tres ensayos, amplificándose la trieta de reacciones de esta muestra sólo en el ensayo 5.

Los controles positivos (C+), con ARN de sangre, amplificaron conforme a lo esperado para cada sistema. Los controles negativos (C-), con agua libre de nucleasas, no presentaron amplificación, demostrando que no existió contaminación en ninguno de los ensayos.

Los gráficos de amplificación y valores de Cq correspondientes de los resultados de los ensayos de evaluación de los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® de los genes 18S y FOXP3 en muestras clínicas de ARN de orina, se presentan en los Anexos 19 y 20, para los ensayos 1 y 3 de pacientes no trasplantados, y en los Anexos 21, 22 y 23, para los ensayos 4, 5 y 6 en pacientes trasplantados respectivamente.

Los resultados de los ensayos 4 y 6, pese a no reportar un valor de Cq las reacciones sin amplificación de la muestra T3 en el sistema FOXP3, si forman aparentes curvas de amplificación que no llegan al mismo nivel de fluorescencia meseta respecto a las demás repeticiones (ver Anexo 21 y 23).

16. Análisis estadístico de resultados de RT-qPCR con TaqMan® en ARN de muestras clínicas de orina

16.1. Sistema del gen 18S

Para analizar los datos obtenidos de los ensayos de RT-qPCR con TaqMan® del gen 18S sobre los pacientes no trasplantados y trasplantados, se los representó gráficamente para cada paciente y ensayo, como se muestra en la Figura 39.

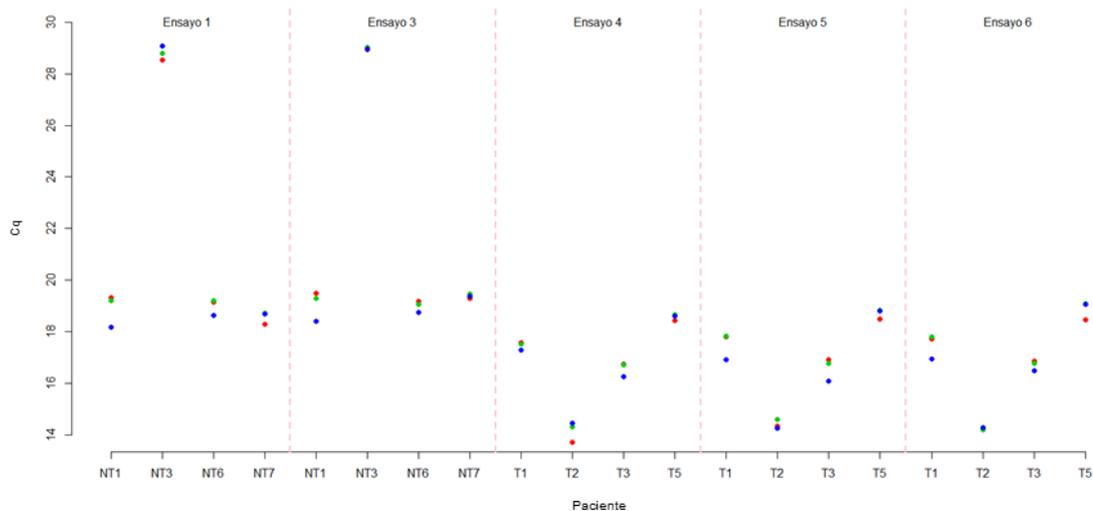


Figura 39. Gráfico de valores de Cq resultados de cada paciente de los ensayos 1, 3, 4, 5 y 6 correspondientes a la evaluación de los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® del gen 18S en muestras clínicas de ARN de orina.

Como se observa en la Figura 39, los valores de Cq del paciente no trasplantado NT3 son completamente diferentes al resto de pacientes tanto no trasplantados como trasplantados, pese a que gráficamente se puede inferir que hay poca variabilidad entre sus repeticiones. En la Figura 40, se representan los resultados de cada ensayo según cada paciente con sus réplicas sin tomar en cuenta los datos del paciente no trasplantado NT3.

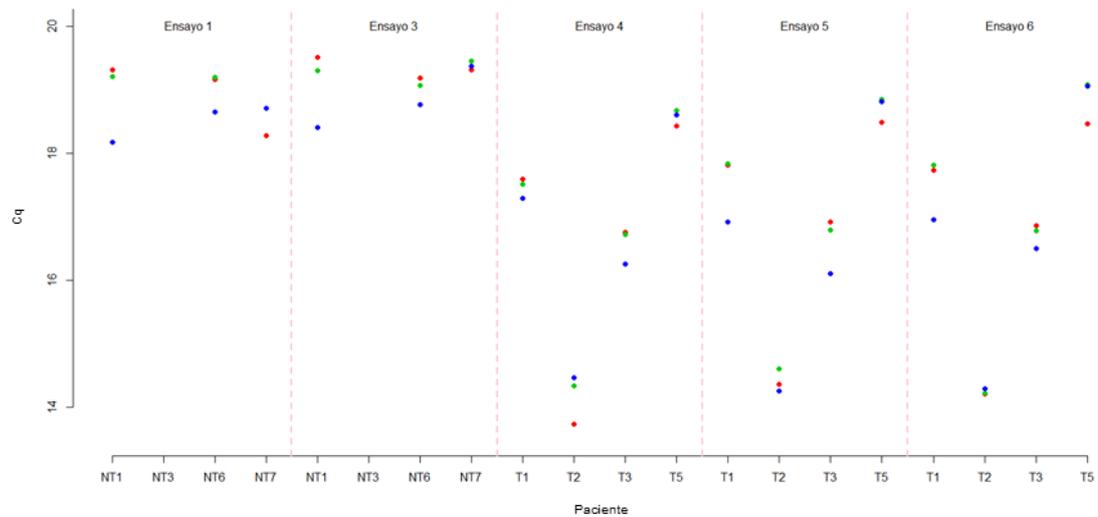


Figura 40. Gráfico de valores de Cq resultados de cada paciente, excepto el paciente NT3, de los ensayos 1, 3, 4, 5 y 6 correspondientes a la evaluación de los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® del gen 18S en muestras clínicas de ARN de orina.

Los valores de Cq, de manera gráfica, muestran poca variación entre réplicas de cada paciente en cada ensayo. Además, se evidencia cierta diferencia entre los Cq de los pacientes trasplantados y no trasplantados.

Como primer análisis para definir la variabilidad intraensayo del sistema 18S, se calcularon los coeficientes de variación (CV) con su correspondiente intervalo de confianza al 95% de los valores de Cq obtenidos de cada paciente según cada ensayo, como se describe en la sección 26 de Metodología, los cuales se muestran en la Tabla 43.

Tabla 43.

Coeficientes de variación (CV) e intervalos de confianza al 95% por paciente y ensayo de los resultados de RT-qPCR con TaqMan® del sistema 18S en ARN de muestras clínicas de orina.

Ensayo	Paciente	Límite Inferior	CV	Límite Superior
1	NT1	-0.948	0.033	1.015
	NT3	-0.971	0.009	0.990
	NT6	-0.964	0.016	0.996
	NT7	-0.967	0.013	0.993
2	NT1	-0.950	0.031	1.012
	NT3	-0.978	0.002	0.982
	NT6	-0.969	0.011	0.991
	NT7	-0.976	0.004	0.984
4	T1	-0.971	0.009	0.989
	T2	-0.953	0.028	1.008
	T3	-0.964	0.017	0.997
	T5	-0.973	0.007	0.987
5	T1	-0.951	0.030	1.010
	T2	-0.968	0.012	0.993
	T3	-0.954	0.026	1.007
	T5	-0.969	0.011	0.991
6	T1	-0.954	0.027	1.008
	T2	-0.977	0.003	0.983
	T3	-0.969	0.011	0.992
	T5	-0.962	0.019	0.999
CV Promedio (Intraensayo)			0.016	

Se observa en la Tabla 43 que los intervalos de confianza no son confiables debido a la poca cantidad de datos por CV calculado (tres repeticiones), sin embargo, los valores de CV son bajos, los cuales no superan el 3.3%. Se determinó una variabilidad intraensayo para el sistema 18S de 1.6%.

En la Figura 41, se representan los valores de CV calculados del sistema 18S por paciente y ensayo mostrados en la Tabla 43.

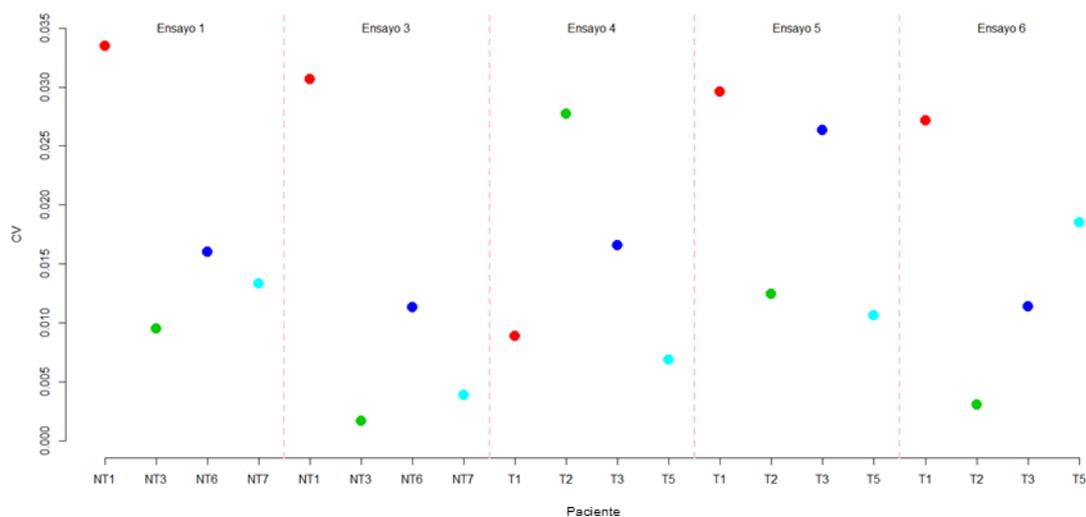


Figura 41. Coeficientes de variación (CV) por paciente y ensayo de los resultados de RT-qPCR con TaqMan® del sistema 18S en ARN de muestras clínicas de orina.

En la Figura 41 se observa que existe un comportamiento similar entre la distribución de los CV de todos los ensayos, en donde se aprecia CV cercanos a 0% y a 3.5% en cada ensayo, los cuales de por sí son porcentajes bajos de variabilidad.

A continuación, se contrastaron los CV de cada ensayo en cada paciente, como se describe en la sección 26 de Metodología. Los valores p resultados de la prueba de hipótesis para la diferencia de CV de dos ensayos de cada paciente y sus intervalos de confianza al 95% de los CV contrastados se muestran en la Tabla 44.

Los valores-p obtenidos resultado del contraste de cada ensayo en cada paciente muestran que no existen diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) en la variabilidad entre ensayos según cada paciente. En la Figura 42 se presentan las diferencias de CV con sus intervalos de confianza calculados y mostrados en la Tabla 44.

Tabla 44.

Prueba de hipótesis para la diferencia de coeficientes de variación (CV) de cada ensayo en cada paciente del sistema 18S e intervalos de confianza al 95% de los CV contrastados.

Paciente	Ensayo I	Ensayo II	p-valor	CV I	CV II	Lim Inf	Dif CV	Lim Sup
NT1	1	3	0.525	0.033	0.031	-0.042	0.003	0.047
NT3	1	3	0.838	0.009	0.002	-0.002	0.008	0.017
NT6	1	3	0.596	0.016	0.011	-0.015	0.005	0.024
NT7	1	3	0.781	0.013	0.004	-0.004	0.009	0.023
T1	4	5	0.777	0.009	0.030	-0.051	-0.021	0.010
	4	6	0.763	0.009	0.027	-0.046	-0.018	0.010
	5	6	0.524	0.030	0.027	-0.037	0.002	0.042
T2	4	5	0.704	0.028	0.012	-0.015	0.015	0.045
	4	6	0.871	0.028	0.003	-0.003	0.025	0.052
	5	6	0.803	0.012	0.003	-0.003	0.009	0.022
T3	4	5	0.626	0.017	0.026	-0.040	-0.010	0.021
	4	6	0.603	0.017	0.011	-0.015	0.005	0.025
	5	6	0.712	0.026	0.011	-0.013	0.015	0.043
T5	4	5	0.619	0.007	0.011	-0.016	-0.004	0.009
	4	6	0.741	0.007	0.019	-0.031	-0.012	0.008
	5	6	0.649	0.011	0.019	-0.029	-0.008	0.013

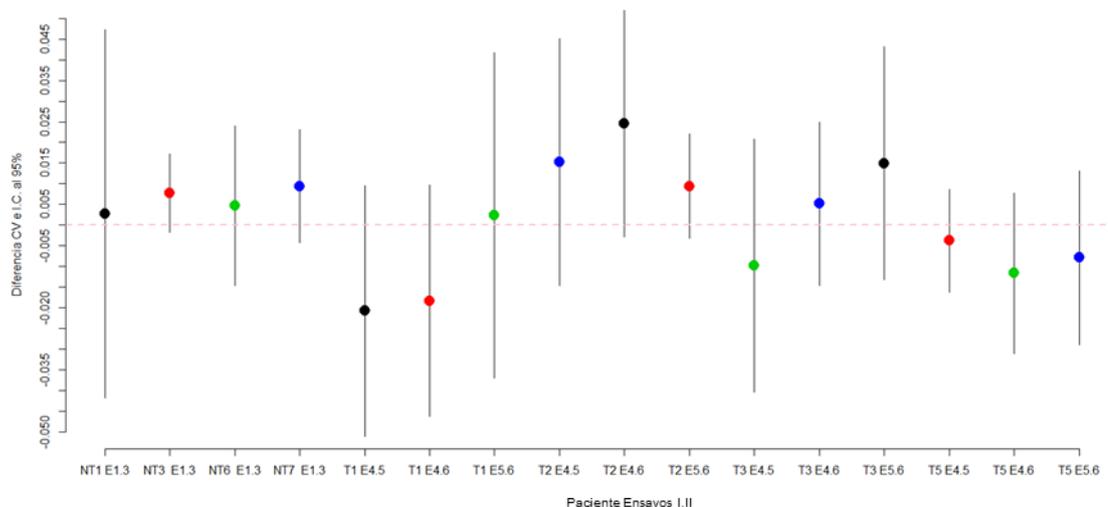


Figura 42. Diferencias de coeficientes de variación (CV) entre ensayos según cada paciente del sistema 18S y sus intervalos de confianza al 95%.

Cabe mencionar que, como se observa en la Figura 42, los intervalos de confianza de la diferencia de CV incluyen al valor 0, con lo cual se ratifica la ausencia de diferencias significativas entre los CV contrastados. Por lo tanto, no existen diferencias en la variabilidad generada en los diferentes ensayos de cada paciente en el sistema de RT-qPCR con TaqMan® del gen 18S a partir de ARN extraído de muestras clínicas de orina.

Con el fin de evaluar los CV de los ensayos para el sistema 18S se trabajó con los promedios de las repeticiones respecto a cada paciente en cada ensayo, lo cual se observa en la Tabla 45.

Tabla 45.

Promedios de las repeticiones de Cq resultados de RT-qPCR con TaqMan® del sistema 18S en ARN de muestras clínicas de orina.

Paciente	Ensayo	Cq Promedio
NT1	1	18.897
	3	19.068
NT3	1	28.805
	3	28.969
NT6	1	19.001
	3	19.005
NT7	1	18.567
	3	19.377
	4	17.463
T1	5	17.520
	6	17.500
	4	14.177
T2	5	14.407
	6	14.237
	4	16.576
T3	5	16.603
	6	16.713
	4	18.567
T5	5	18.713
	6	18.869

Para definir la variabilidad interensayo del sistema 18S, se calcularon los coeficientes de variación (CV) con su correspondiente intervalo de confianza al 95% de los promedios de Cq obtenidos en cada ensayo, los cuales se muestran en la Tabla 46.

Tabla 46.

Coeficientes de variación (CV) e intervalos de confianza al 95% por ensayo de los resultados de RT-qPCR con TaqMan® del sistema 18S en ARN de muestras clínicas de orina.

Ensayo	Límite Inferior	CV	Límite Superior
1	-0.609	0.234	1.077
3	-0.613	0.227	1.068
4	-0.698	0.112	0.922
5	-0.701	0.108	0.918
6	-0.695	0.116	0.926
CV Promedio (Interensayo)		0.159	

Se visualiza en la Tabla 46 que nuevamente los intervalos de confianza son inverosímiles debido a la poca cantidad de datos por CV calculado (4 promedios). En el caso de los ensayos 1 y 3, los CV son de 23.4% y 22.7% respectivamente, los cuales demuestran una variabilidad importante, sin embargo, estos CV fueron calculados considerando los valores promedio de Cq del paciente no trasplantado NT3, en cual verificamos que sus valores son completamente diferentes respecto a los generados con las muestras de pacientes tanto trasplantados como no trasplantados. Los ensayos 4, 5 y 6 presentan coeficientes de variación aceptables de 11.2%, 10.8% y 11.6% respectivamente. Se determinó una variabilidad interensayo para el sistema 18S de 15.9%.

Sin tomar en cuenta los valores del paciente NT3, el CV de los ensayos 1 y 3 se reduce de forma drástica a 1.2% y 1.04% respectivamente, valores considerados de baja variabilidad. En este caso, la variabilidad interensayo para el sistema 18S también se reduce de manera importante a 7.16%.

En la Figura 43, se representan los valores de CV calculados del sistema 18S por ensayo mostrados en la Tabla 46.

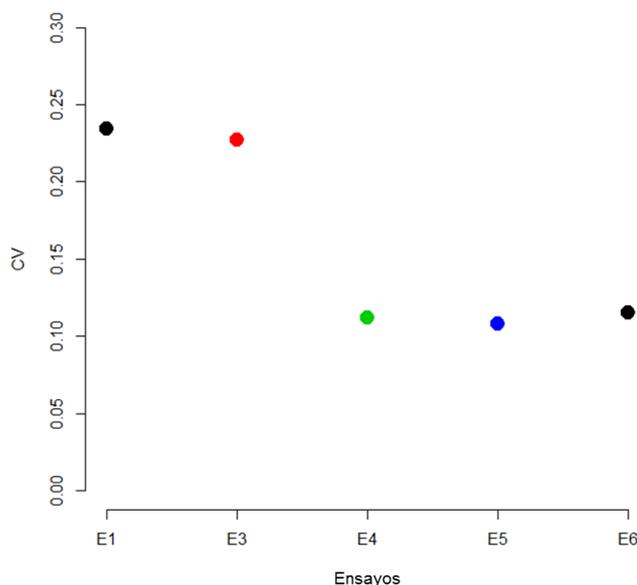


Figura 43. Coeficientes de variación (CV) por ensayo de los resultados de RT-qPCR con TaqMan® del sistema 18S en ARN de muestras clínicas de orina.

En la Figura 43 se nota una diferencia marcada entre las variabilidades de los ensayos con muestras de pacientes no trasplantados (E1 y E3) y con muestras de pacientes trasplantados (E4, E5 y E6), aunque también se visualiza una diferencia mínima entre las variabilidades de los ensayos corridos con los mismos grupos de muestras.

Para comprobar si las diferencias de variabilidades son estadísticamente significativas, se contrastaron los CV de cada ensayo. Los valores p resultados de la prueba de hipótesis para la diferencia de CV de dos ensayos y sus intervalos de confianza al 95% de los CV contrastados se presentan en la Tabla 47.

Los valores-p obtenidos resultado del contraste de cada ensayo muestran que no existen diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) en la variabilidad entre ensayos. En la Figura 44 se visualizan las diferencias de CV con sus intervalos de confianza calculados y mostrados en la Tabla 47.

Tabla 47.

Prueba de hipótesis para la diferencia de coeficientes de variación (CV) de cada ensayo del sistema 18S e intervalos de confianza al 95% de los CV contrastados.

Ensayo I	Ensayo II	p-valor	CV I	CV II	Lim Inf	Dif CV	Lim Sup
1	3	0.505	0.234	0.227	-0.268	0.007	0.282
	4	0.629	0.234	0.112	-0.095	0.123	0.340
	5	0.634	0.234	0.108	-0.090	0.126	0.342
	6	0.624	0.234	0.116	-0.100	0.119	0.337
3	4	0.625	0.227	0.112	-0.096	0.116	0.327
	5	0.631	0.227	0.108	-0.091	0.119	0.329
	6	0.620	0.227	0.116	-0.101	0.112	0.325
4	5	0.507	0.112	0.108	-0.123	0.003	0.130
	6	0.507	0.112	0.116	-0.134	-0.004	0.127
5	6	0.513	0.108	0.116	-0.136	-0.007	0.121

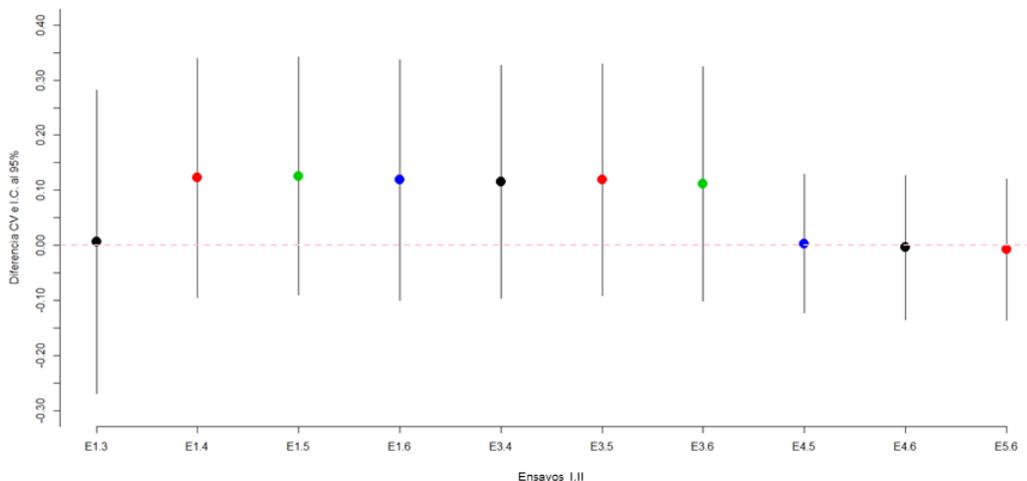


Figura 44. Diferencias de coeficientes de variación (CV) entre ensayos según del sistema 18S y sus intervalos de confianza al 95%.

Como se puede ver en la Figura 44, los intervalos de confianza de la diferencia de CV en este caso también incluyen al valor 0, con lo cual se corrobora la ausencia de diferencias significativas entre los CV contrastados. Por tal motivo, no existen diferencias en la variabilidad presente entre los

ensayos totales en el sistema de RT-qPCR con TaqMan® del gen 18S en ARN de muestras clínicas de orina.

Antes de plantearse la hipótesis de igualdad de medias entre los valores de Cq de pacientes trasplantados y no trasplantados en el sistema 18S según lo detallado en la sección 26 de Metodología, se verificaron los supuestos de normalidad y de homocedasticidad de las subpoblaciones.

Primero se realizó una prueba de Shapiro-Wilks modificada, para conocer si los valores de Cq de los grupos de pacientes no trasplantados y trasplantados siguen una distribución normal, mediante las hipótesis estadísticas:

H₀: Los valores de Cq proceden de una distribución normal.

H_A: Los valores de Cq no proceden de una distribución normal.

El resultado de la prueba de Shapiro-Wilks modificada realizada en InfoStat se muestra en la Tabla 48, en donde se aprecia que el valor-p < 0.001, para ambos grupos de pacientes (trasplantados y no trasplantados), es menor que $\alpha = 0.05$. Por lo tanto, se rechaza la H₀ y se afirma que los valores de Cq de los grupos de pacientes no trasplantados y trasplantados no proceden de una distribución normal.

Tabla 48.

Resultado de la prueba de Shapiro-Wilks modificado en Infostat de los valores de Cq de pacientes trasplantados y no trasplantados en el sistema 18S.

Condición del Paciente	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
No Trasplantados	Valor de Cq	24	21.46	4.4	0.59	<0.0001
Trasplantados	Valor de Cq	36	16.78	1.67	0.87	<0.0001

Luego se llevó a cabo una prueba F, para determinar si las varianzas entre valores de Cq de los grupos de pacientes no trasplantados y trasplantados son iguales, mediante las hipótesis estadísticas:

$$H_0: \sigma_{NT}^2 = \sigma_T^2$$

$$H_A: \sigma_{NT}^2 \neq \sigma_T^2$$

El resultado de la prueba F realizada en InfoStat se presenta en la Tabla 49, en donde se aprecia que el valor-p < 0.001 es menor que $\alpha = 0.05$. Por lo tanto, se rechaza la H_0 y se afirma que las varianzas entre los grupos de pacientes no trasplantados y trasplantados son diferentes.

Tabla 49.

Resultado de la prueba F de igualdad de varianzas en Infostat de los valores de Cq de pacientes trasplantados y no trasplantados en el sistema 18S.

Variable	G(1)	G(2)	n(1)	n(2)	Var(1)	Var(2)	F	p	Prueba
Valor Cq	No Tras	Tras	24	36	19.32	2.79	6.92	<0.0001	Bilateral

Tras haber verificado que los datos no cumplen los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se implementó una prueba no paramétrica, en este caso la prueba de Kruskal-Wallis, planteándose las hipótesis estadísticas:

$$H_0: \mu_{NT} = \mu_T$$

$$H_A: \mu_{NT} \neq \mu_T$$

El resultado de la prueba de Kruskal-Wallis realizada en InfoStat se presenta en la Tabla 50, en donde se aprecia que el valor-p < 0.001 es menor que $\alpha = 0.05$. Se determina el rechazo de la H_0 y la existencia de diferencias significativas entre las medias entre los valores de Cq de pacientes trasplantados y no trasplantados en el sistema 18S.

Tabla 50.

Resultado de Kruskal-Wallis en Infostat de los valores de Cq de pacientes trasplantados y no trasplantados en el sistema 18S.

Variable	Condición Paciente	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Valor de Cq	No Trasplantados	24	21.46	4.4	19.25	34.1	<0.0001
Valor de Cq	Trasplantados	36	16.78	1.67	16.92		

En la Tabla 51 se muestra la clasificación de los grupos pacientes trasplantados y no trasplantados representados por letras, las cuales indican diferencias significativas, a partir de los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis. La clasificación indica que la media de los valores de Cq de pacientes trasplantados es más temprano que la de pacientes no trasplantados.

Tabla 51.

Clasificación de los grupos a partir de los resultados de Kruskal-Wallis en Infostat de los valores de Cq de pacientes trasplantados y no trasplantados en el sistema 18S.

Tratamiento	Ranks
Trasplantados	19.75 A
No Trasplantados	46.63 B

En la Figura 45 se presenta un diagrama de caja y bigotes de los valores de Cq resultados de pacientes trasplantados y no trasplantados, en donde se evidencia que los datos del paciente NT3 son considerados valores atípicos. A la vez también se evidencia una diferencia entra los Cq de pacientes trasplantados y no trasplantados al no superponerse los rangos intercuartílicos.

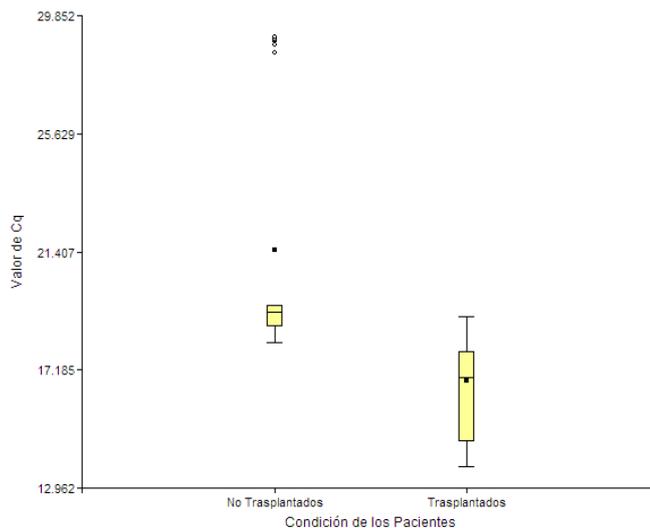


Figura 45. Gráfico de cajas y bigotes de valores de Cq resultados del sistema de RT-qPCR con TaqMan® del gen 18S en muestras clínicas de ARN de orina pacientes trasplantados y no trasplantados.

Omitiendo los datos del paciente NT3, el gráfico de cajas se normaliza y la media aparece dentro del rango intercuartílico. Aun así, existen diferencias entre los Cq de ambos grupos de pacientes, como se muestra en la Figura 46.

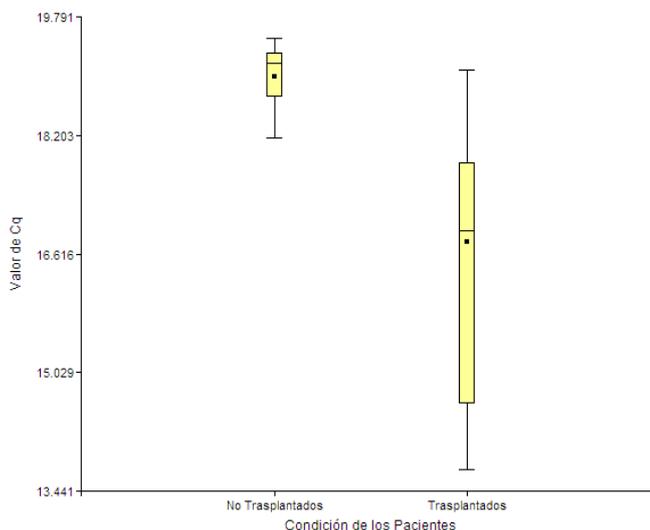


Figura 46. Gráfico de cajas y bigotes de valores de Cq resultados del sistema de RT-qPCR con TaqMan® del gen 18S en muestras clínicas de ARN de orina pacientes trasplantados y no trasplantados sin datos atípicos.

Como comprobación, se implementó una prueba de Kruskal-Wallis sin tomar en cuenta los datos del paciente NT3. El resultado de la prueba realizada en InfoStat se presenta en la Tabla 52, en donde, al igual que con los datos del paciente NT3, se aprecia que el valor- $p < 0.001$ es menor que $\alpha = 0.05$. Se corrobora el rechazo de la H_0 y la existencia de diferencias significativas de las medias entre los valores de Cq de pacientes trasplantados y no trasplantados en el sistema 18S.

Tabla 52.

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		

16.2. Sistema del gen FOXP3

Los datos obtenidos de los ensayos de RT-qPCR con TaqMan® del gen FOXP3 sobre los pacientes no trasplantados y trasplantados fueron insuficientes para probar las hipótesis evaluadas en el sistema 18S.

Los valores de Cq obtenido se los representó gráficamente para cada ensayo, como se muestra en la Figura 47.

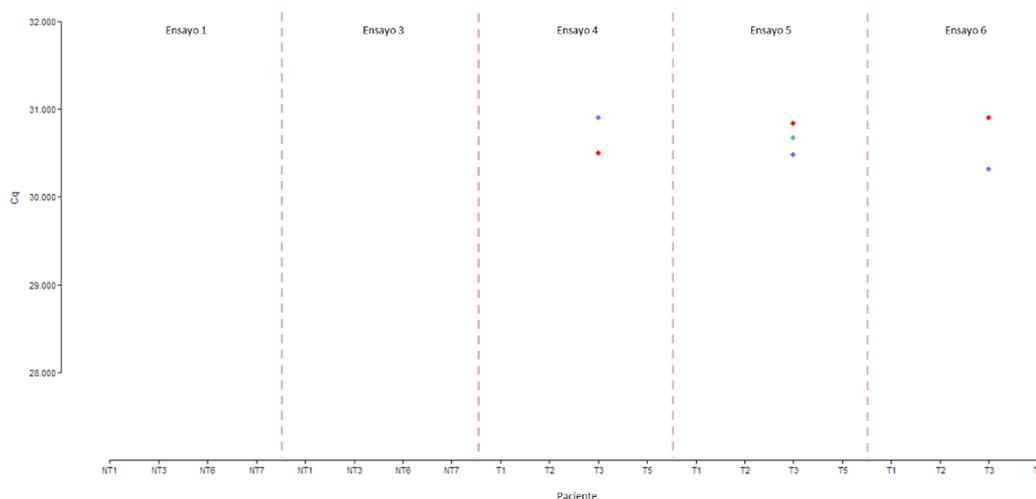


Figura 47. Gráfico de valores de Cq resultados de cada paciente de los ensayos 1, 3, 4, 5 y 6 correspondientes a la evaluación de los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® del gen FOXP3 en muestras clínicas de ARN de orina.

El paciente trasplantado T3 fue el único que presentó valores de Cq, y sólo se obtuvieron en 7 de los 9 ensayos totales corridos, que corresponde a un 77.78%. Sin embargo, como se observa en la Figura 47, los valores de Cq del paciente T3 muestran poca variación entre réplicas de cada ensayo, y también entre ensayos.

Se calculó la media, desviación estándar y coeficiente de variación (CV) de los valores de Cq obtenidos del paciente T3 según cada ensayo, los cuales se muestran en la Tabla 53.

Tabla 53.

Media, desviación estándar y coeficiente de variación (CV) por ensayo de los valores de Cq resultados de RT-qPCR con TaqMan® del sistema FOXP3 del paciente trasplantado T3.

Paciente	Ensayo	Media	D.E.	CV
T3	4	30.70	0.28	0.0092
	5	30.66	0.18	0.0058
	6	30.61	0.42	0.0136
Promedio		30.66	0.29	0.0095

En la Tabla 53 se comprueba que los valores de CV son bajos, los cuales no superan el 1.36%. Se determinó una variabilidad promedio para el paciente T3 en el sistema FOXP3 de 0.95%, sin tomar en consideración los datos no obtenido en dos de los ensayos.

En la Figura 48 se representan los valores de CV calculados por ensayo del sistema FOXP3 del paciente trasplantado T3 mostrados en la Tabla 52.

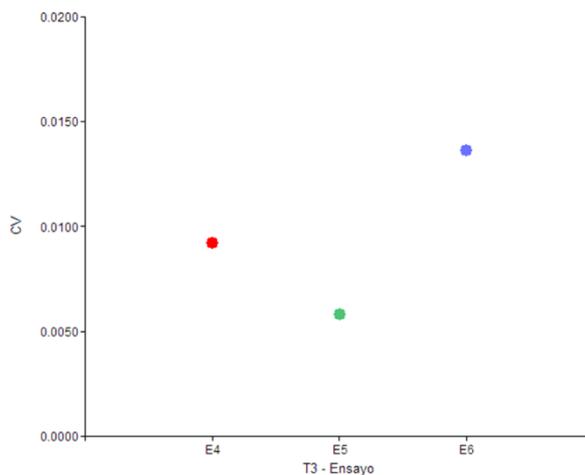


Figura 48. Coeficientes de variación (CV) por ensayo de los valores de Cq resultados de RT-qPCR con TaqMan® del sistema FOXP3 del paciente trasplantado T3.

En la Figura 48 se comprueba que los CV son similares en los tres ensayos, con valores entre 0.5% y 1.5%, los cuales son porcentajes bajos de variabilidad.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

Los ensayos de PCR en general dependen de varios factores para que la reacción trabaje al máximo, entre los que se destacan un ácido nucleico plantilla íntegro, una enzima polimerasa con reactivos en buenas condiciones y un sistema de cebadores diseñados de tal manera que mantengan un equilibrio óptimo entre especificidad y eficiencia de amplificación. Refiriéndonos de forma puntual en ensayos de qPCR, es importante utilizar un par de cebadores que sean muy específicos, no formen dímeros de cebadores, generen amplicones cortos, y garanticen la obtención de resultados reproducibles y consistentes (Thornton & Basu, 2011). Las características analizadas de sondas y primers de los sistemas 18S y FOXP3 utilizados en este proyecto muestran que cumplen de manera general con los parámetros estándares recomendados para su síntesis. Pese a ello, los valores de energía libre de Gibbs (ΔG) de ambos cebadores se manejan con probabilidad de formación de dímeros. Sin embargo, investigaciones realizadas por Muthukumar (2005), Afaneh (2010) y sus respectivos colaboradores, en donde se probaron los sistemas 18S y FOXP3 con las mismas secuencias de cebadores y sondas, no se reportaron inconvenientes de especificidad y eficiencia. A partir de los resultados positivos obtenidos en ambas investigaciones por estos sistemas en la detección de los genes 18S y FOXP3 en ARN de orina, y frente a la posible formación de estructuras secundarias, se optó por usarlos para el presente estudio.

Los ensayos de optimización de los sistemas de RT-PCR convencional de 18S y FOXP3 con el kit SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase presentaron una formación aleatoria de varios productos inespecíficos. Moser y otros (2012) evaluaron varios sistemas “one-step” en dos ensayos de RT-PCR convencional para la amplificación de un fragmento del gen MS2 ARN (60pb) y de influenza A ARN (60pb) respectivamente. Para los ensayos con el kit SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase, si bien los resultados

fueron positivos con el gen MS2 ARN, en los ensayos con el gen influenza A ARN se amplificaron varias bandas espurias o falsas, principalmente de un tamaño mayor del producto específico. Esta formación de varios productos inespecíficos concuerda con el comportamiento de los sistemas 18S y FOXP3, en donde de igual manera existe una formación variable de amplicones de una reacción a otra. Para futuras optimizaciones de sistemas de RT-PCR convencional se recomienda evaluar la posibilidad de trabajar con otros kits comerciales “one-step” con mejores resultados respecto a la formación de productos extraños (Moser, y otros, 2012) o implementar ensayos de RT-PCR convencional “two-step”.

La curva de disociación del ensayo de RT-qPCR con SYBR® Green del gen FOXP3 presentó un pico en una de las tres reacciones (C2), aparte del correspondiente al amplicón, con una temperatura de melting de 74.44 °C. Este pico indica la formación de dímeros de cebadores. Comparando los picos del fragmento del gen FOXP3, se observó que el pico del control C2 es más pequeño comparado con los otros controles positivos, como se observa en la Figura 27. Brisson, Tan, Park, & Hamby (2000) determinaron que en ensayos con tendencia a formar dímeros de cebadores, la cantidad a producirse de “primer-dimers” depende de la concentración del material nucleico plantilla objetivo. En estas reacciones, si el ADN o ARN plantilla se encuentra en una baja concentración predomina la formación de dímeros de primers, no obstante, con una concentración alta de plantilla la formación del amplicón predomina (Brisson, Tan, Park, & Hamby, 2000). Por lo tanto, la concentración final de ARN en la reacción C2 del ensayo de RT-qPCR con SYBR® Green del gen FOXP3 pudo haber sido menor respecto a un error en homogenización. Sin embargo, esto nos permitió inferir que la concentración de ARN para todos los controles positivos es limitada o la concentración de los cebadores es excesiva, por lo que levemente favorece a la formación de dímeros de primers en lugar de una completa afinidad a amplificar el fragmento de interés. Esta aseveración coincide con el análisis de los cebadores, en donde se determinó la posibilidad de formación de dímeros en ambos sistemas.

En ensayos de sensibilidad analítica es importante determinar de manera exacta la concentración íntegra de ARN para exhibir el verdadero comportamiento de los sistemas respecto a la concentración de ARN y sus límites de detección respectivos. La cuantificación por fluorometría con Qubit® RNA BR aplica un método por colorantes de unión que permite la detección específica de ARN, contrario a la cuantificación por espectrofotometría con Nanodrop 2000™, en donde se mide el valor de absorbancia en una longitud de onda de 260 nm correspondiente tanto a ARN como a ADN y oligonucleótidos. Por lo tanto, en muestras con ADN y ARN no es posible distinguir la concentración específica entre uno y el otro. Sin embargo, una de las ventajas de la cuantificación por espectrofotometría es la capacidad de indicar la presencia de contaminación, en donde se analiza tanto los picos formados en el espectro UV como los ratios de pureza 260/280 y 260/230 (Thermo Fisher Scientific, Qubit® Fluorometer vs. Competitors, 2016). Tomando en cuenta las características de ambos métodos para definir la concentración de ARN, se analizaron las cantidades de ARN antes y después del tratamiento con el kit TURBO DNA-free™ kit, las cuales permanecieron prácticamente iguales según espectrofotometría y se redujeron a la mitad según fluorometría.

Luego de varios análisis se optó por descartar el valor de concentración por espectrofotometría. La cuantificación por espectrofotometría presenta un valor antes de purificar con DNasa correspondiente a la cantidad conjunta de ADN y ARN. En la corrida electroforética de las muestras de ARN antes y después de purificar se comprobó la eliminación total de ADN, por lo tanto lo más probable es obtener una concentración por espectrofotometría menor después de purificar, pero el valor cuantificado fue prácticamente igual. La posible degradación de una parte del ARN y la dilución del material nucleico al adicionar los reactivos en el tratamiento con DNasa son otros motivos que cuestionan la igualdad en concentraciones de ARN antes y después del proceso de eliminación del ADN genómico de la muestra. Además, el desplazamiento de la curva hacia la derecha del espectro UV después de la purificación de la muestra de ARN de leucocitos, como se muestra en la Figura 31, indica una posible interferencia de uno de los reactivos del kit TURBO

DNA-free™ kit en la cuantificación por espectrofotometría, debido a que el protocolo sugerido por el fabricante no comprende una purificación completa post-tratamiento. Entonces, se puede determinar que la concentración de ARN medida por el equipo Qubit® se relaciona mejor con la cantidad real e íntegra de ARN en la muestra. Se sugiere que la cuantificación de ARN siempre se lleve a cabo tanto por espectrofotometría como por fluorometría para garantizar información sobre concentración y condiciones de la muestra.

Los ensayos de sensibilidad analítica de ambos sistemas, 18S y FOXP3, mostraron una inhibición importante en las reacciones de RT-qPCR con TaqMan® con una concentración de 10 ng/μL, en donde se obtuvieron valores de C_q más tardíos respecto a las reacciones con la primera concentración diluida de ARN (1 ng/μL). El kit utilizado para eliminar ADN de muestras de ARN, TURBO DNA-free™ kit, menciona la posibilidad de inconvenientes en ensayos de RT-PCR que coloquen un volumen de muestra tratada con el kit mayor al 20%, debido a que los componentes del TURBO DNase Buffer y el DNase Inactivation Reagent pueden interferir con la reacción (Ambion™, 2012). Para estos ensayos se utilizó una muestra de ARN de 56.2 ng/μL, la cual fue tratada previamente con el kit TURBO DNA-free™. Según la configuración de la reacción y la concentración de ARN, el volumen de la muestra original representó casi el 20% respecto al volumen total de la reacción de RT-qPCR en los ensayos con una concentración de 10 ng/μL, lo que explicaría la inhibición de estas reacciones en los ensayos de sensibilidad analítica de ambos sistemas. Por lo tanto, conforme la cantidad de ARN disminuye en cada dilución, también lo hace la contaminación producto del tratamiento con el kit, y con eso las reacciones diluidas se comportaron según lo esperado, como se observa en la Figura 32 y 33.

Las eficiencias de amplificación en porcentaje de los sistemas 18S y FOXP3 fueron de 135.70% y 138.93% respectivamente, con valores de pendiente de -2.6855 y -2.6435. Sistemas con una eficiencia de amplificación mayor al 90% ofrecen generalmente óptimos resultados, aunque si el porcentaje es mayor al 100% de eficiencia sugiere que existe la amplificación de más de un producto en la reacción (Brisson, Tan, Park, & Hamby, 2000). Estos resultados concuerdan con la posibilidad que existe de formación de

dímeros de cebador en ambos sistemas según los valores de ΔG calculados, y según la presencia de dímeros en el ensayo de RT-qPCR con SYBR® Green del gen FOXP3. Por otro lado, eficiencias de amplificación sobre el 100%, cuyo valores de pendiente son mayores a -3.32, podrían también indicar problemas en la muestra de material nucleico (Applied Biosystems, 2008). Por tal motivo, existe la probabilidad de interferencia de los componentes del TURBO DNase Buffer y el DNase Inactivation Reagent en las reacciones dentro de los ensayos de sensibilidad analítica de los genes 18S y FOXP3 con la concentración de ARN diluida. Pese a los posibles inconvenientes mencionados, se demostró la igualdad de eficiencias de amplificación entre los sistemas 18S y FOXP3. Sin embargo, se recomienda optimizar los ensayos para construir nuevas curvas estándar de cada sistema y obtener eficiencias de amplificación cercanas al 100%.

El ARN extraído a partir de sedimento urinario normalmente presenta espectros de absorbancia que indican una mala calidad y una importante degradación que caracterizan dichas muestras, incluso con muestras frescas y en sitios de gran experiencia en aislamiento de ARN a partir de orina (Keslar, y otros, 2013). Los rendimientos generales de extracción de ARN con el kit PureLink® RNA Mini Kit oscilaron entre 1.23 y 3.06 ng de ARN por mL de orina procesada con un radio 260/280 entre 1.48 y 1.53. Estos resultados son similares a los obtenidos por Keslar y otros (2013), que reportaron rendimientos de aislamiento de ARN con el mismo kit utilizado de 1.86 - 4.40 ng de ARN por mL de orina procesada con un radio 260/280 de 1.5 - 2.5.

El robot MagPurix 12 System utiliza perlas magnéticas para llevar a cabo una extracción automatizada de ácidos nucleicos de diversas muestras (Zinexts, 2014), sin embargo, no se tienen resultados sobre rendimientos de extracción de ARN a partir de orina en otras investigaciones ni en las especificaciones generales del equipo o el kit. A pesar de eso, los rendimientos de aislamiento de ARN de orina en el proyecto fueron mejores comparados con los resultados de la extracción con el kit Purelink™ RNA Mini Kit, con valores que oscilaron entre 4.15 y 13.85 ng de ARN por mL de orina procesada con un radio 260/280 entre 1.44 y 1.73. El robot MagPurix 12 System presentó resultados satisfactorios en el aislamiento de ARN de orina

de pacientes y, al ser un método estandarizado y automático de extracción, se recomienda su uso en obtención de ARN de muestras clínicas.

Para el caso de las muestras de orina, con el fin de purificar el ARN luego del tratamiento con TURBO DNAsa, se aplicó el protocolo de extracción con fenol/cloroformo. Desjardins & Conklin (2010) manifiestan que en el caso de una extracción con Fenol, la contaminación residual por este reactivo puede ser indicada por espectrofotometría al generar un espectro anormal entre 220 y 240 nm, acompañado con un desplazamiento del pico de absorbancia del ARN de 260 nm hacia 280 nm. Todos los resultados de cuantificación de ARN extraído y purificado a partir de orina indican una contaminación con fenol. A pesar de ello, la presencia del contaminante parece no inhibir la amplificación en los ensayos de los sistemas de RT-PCR convencional. Es importante que el proceso de purificación con fenol/cloroformo sea optimizado para evitar restos de fenol en muestras de ARN e inconvenientes que ello conllevaría para aplicaciones posteriores en futuros proyectos.

El aislamiento de ARN de células urinarias con la suficiente cantidad y calidad siempre ha sido un obstáculo para análisis de expresión génica. Considerando que el ARN es una molécula con una alta susceptibilidad a degradarse, la extracción de cantidades adecuadas de ARN de con altos índices de pureza a partir de sedimento celular urinario es un proceso complicado y las dificultades se incrementan al tener que transportar o almacenar las muestras de células urinarias para su extracción posterior (Medeiros, y otros, 2003). RNAlater es una solución de estabilización ampliamente utilizado para preservar el ARN dentro de tejidos y células durante varios días a temperatura ambiente y en ultracongelación (Medeiros, y otros, 2003) (Grotzer, y otros, 2000). Mediante ensayos de RT-PCR para detección de 18S ARNr, se comprobó que el ARN se mantiene íntegro y funcional hasta un tiempo de 6 horas a temperatura ambiente, y también en ultracongelación a -80°C por un tiempo no menor a una semana. Una investigación realizada por Medeiros y otros (2003), aparte de comprobar que la adición de RNAlater al sedimento celular urinario mantiene íntegro el ARN en ultracongelación a -70°C , determinaron que mejora el aislamiento de ARN a partir de células urinarias y facilita la medición de los ARNm de baja

abundancia en las muestras. Esto constituye un punto positivo en investigaciones con biomarcadores urinarios, sabiendo que el biomarcador FOXP3 ARNm es un gen de baja presencia en una muestra de ARN de orina. Entonces, se puede aseverar que el uso de RNAlater en muestras de sedimento celular urinario facilita el almacenamiento de muestras celulares urinarias para la obtención de ARN de buena calidad y cantidad.

El protocolo utilizado para procesar las muestras clínicas de orina para la obtención de células urinarias en el proyecto no utilizó RNAlater debido a que la extracción de ARN se la realizó inmediatamente obtenido el sedimento. Se recomienda evaluar los tiempos máximos de preservación del ARN de orina con RNAlater a temperatura ambiente ya que por falta de recursos no se logró llegar al tiempo límite de duración del material nucleico. También se sugiere analizar si el RNAlater mejora la obtención de ARN a partir de células urinarias, según lo concluido por Medeiros y otros (2003), en la extracción con el robot MagPurix.

Para el sistema del gen 18S evaluado con ARN de muestras clínicas de orina, se obtuvo una variabilidad intraensayo aceptable de 1.6% respecto al criterios de aceptación estrictos de hasta 4% (Hanneman S. , Cox, Green, & Kang, 2011) o permisibles de hasta 10% (Karlen, McNair, Perseguers, Mazza, & Mermod, 2007). Además, realizando un análisis exploratorio de contrastes sobre los CV, se encontró que no hay diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) entre las variaciones de los diferentes ensayos respecto a cada paciente y entre ensayos, a pesar de la variabilidad dada por las muestras de ARN. Por lo tanto, se comprobó que el sistema de RT-qPCR con TaqMan® del gen 18S en muestras clínicas de orina es preciso y reproducible.

Pese a la utilización de un gen de referencia en la mayoría de investigaciones, actualmente existen mejores métodos de normalización de expresión génica que son recomendados en estudios de biomarcadores para AR, que comprenden el uso de curvas estándar para cuantificación absoluta y normalización de la cantidad total de ARN. Pese a eso, el uso conjunto de estos procedimientos de normalización con un gen de referencia es necesario para minimizar los efectos del ARN y su degradación. Como ya se argumentó

anteriormente, el ARN es propenso a la degradación, en especial a partir de muestras de orina (Medeiros, y otros, 2003). Este efecto se vio reflejado en la variación de los valores de Cq en el sistema del gen de referencia 18S tanto en pacientes trasplantados como en pacientes no trasplantados. Un ejemplo dentro de la investigación fueron los valores de Cq del paciente no trasplantado NT3, que se consideraron valores atípicos atribuidos a una reducción importante de la cantidad de ARN por degradación. Dada esta variación, los resultados arrojaron un 15.9% de variabilidad biológica interensayo, la cual no es aceptable considerando el criterio de aceptación de hasta 15% de CV interensayo (Karlen, McNair, Perseguers, Mazza, & Mermod, 2007). Cabe señalar que se tuvo un CV biológico interensayo de 7.16% sin tomar en cuenta al paciente NT3, lo que demuestra la importancia de tomar en cuenta la degradación de ARN en muestras de orina y de usar un gen normalizador que reduzca el efecto de degradación de ARN, funcionando como contrapeso frente a la reducción de cantidad de ARN de ambos genes (target y de referencia), lo que garantiza un resultado estable (Galichon, y otros, 2016).

El ARN ribosomal 18S es ampliamente utilizado como gen de normalización de la expresión del gen target en análisis RT-qPCR debido a su expresión poco variable en tejidos, células y frente a tratamientos experimentales (Kozera & Rapacz, 2013), incluso en sinnúmero de estudios de biomarcadores para rechazo agudo renal, incluyendo FOXP3 ARNm (Afaneh, y otros, 2010) (Muthukumar, y otros, 2005) (Suthanthiran, y otros, 2013). Normalizar con un gen de referencia garantiza la corrección de sesgos, la calidad y la reproducibilidad del análisis RT-qPCR (Galichon, y otros, 2016). Sin embargo, los genes de referencia deben ser escogidos con cuidado y según la situación, debido a la creciente evidencia que los genes de referencia habituales, como 18S, presentan inconsistencias, y necesitan ser reevaluados con enfoques profundos y sistemáticos (Dundas & Ling, 2012). Considerando que 18S es un habitual gen de referencia, se analizaron los valores de Cq de los ensayos en muestras clínicas. En la Figura 39 y 40 se evidenció gráficamente una diferencia entre los Cq de los pacientes trasplantados y no

trasplantados en el sistema 18S, por lo que se decidió que debía comprobarse si era significativa.

La prueba de Kruskal-Wallis, llevada a cabo sobre los valores de Cq de los ensayos del sistema 18S, demostró diferencias significativas de las medias entre los valores de Cq de pacientes trasplantados y no trasplantados en el sistema 18S, con un valor-p menor a 0.001 ($\alpha = 0.05$). Se determinó con la clasificación de grupos que los valores de Cq de los pacientes trasplantados son más tempranos, lo que determina una mayor cantidad de ARN del gen 18S ARNr en este grupo de pacientes. Varios estudios recientes notaron que el número de copias de 18S ARNr fue más alto en pacientes con rechazo agudo (AR) que en pacientes que no presentan AR según biopsia, determinando que los niveles de ARN de 18S se asociaron con el diagnóstico de AR (Suthanthiran, y otros, 2013) (Matignon, y otros, 2014) (Galichon, y otros, 2016). Tomando en cuenta los resultados totales, los investigadores concluyeron que 18S rRNA, en lugar de considerarse un gen de referencia, puede ser un marcador de diagnóstico para AR y cuestionando su utilización como gen de referencia en estas investigaciones. Galichon y otros (2016) manifestaron que los niveles de expresión de biomarcadores de AR normalizados con genes de referencia convencionales, como es el caso de 18S ARNr, pueden no detectar variaciones de los genes target expresados por células que pueden variar en número y tipo. Este es el caso de los biomarcadores de linfocitos T infiltrados en procesos de inflamación. Dados los resultados de los ensayos, el análisis estadístico y los nuevos criterios sobre el gen 18S ARNr en rechazo agudo renal, se sugiere que se trabaje con un nuevo gen como normalizador en lugar de 18S, y también que se estudie la expresión de 18S ARNr como un posible biomarcador de rechazo agudo renal en lugar de aplicarlo como gen de referencia.

En el proceso de AR, los linfocitos T CD4+ y T CD8+ se infiltran en el riñón trasplantado, donde liberan citocinas y quimiocinas, produciendo apoptosis, ya sea de forma directa o indirecta (Nankivell & Al, 2010). Varios autores afirman que al igual que las células T citotóxicas se infiltran en el aloinjerto renal para generar una respuesta inmunológica destructiva, también lo hacen los linfocitos T reguladores para suprimir dicha respuesta (Wang,

Ioan-Facsinay, van der Voort, Huizinga, & Toes, 2007). La infiltración de las células Treg también es relevante en la aceptación del riñón trasplantado (Noris, y otros, 2007). Por lo tanto, como resultados generales en los ensayos de RT-qPCR con TaqMan® del gen FOXP3, se esperaba que no se detecte el gen en muestras de ARN de pacientes no trasplantados renales, lo cual si se cumplió en todos los ensayos de pacientes no trasplantados de la investigación. Por otro lado, se esperaba la presencia del gen FOXP3 en muestras de ARN de pacientes trasplantados debido a la infiltración de los linfocitos T reguladores en el aloinjerto que, según investigaciones, es lo esperado independientemente de la cantidad de expresión de FOXP3 en cada muestra. Sin embargo, sólo 1 de 4 muestras de pacientes trasplantados fue el sistema capaz de detectar el sistema.

El paciente trasplantado T3 fue el único que presentó valores de Cq en el sistema FOXP3, aunque sólo se obtuvieron Cq en 7 de las 9 reacciones totales corridas en los tres ensayos (77.78%). Dos reacciones de RT-qPCR del paciente T3, una en cada uno de los ensayos 4 y 6, no arrojaron un Cq resultado para el gen FOXP3, sin embargo, las gráficas de amplificación (ver Anexo 21 y 23) de estas reacciones muestran aparentes curvas de amplificación cuyas mesetas no llegan al mismo nivel de fluorescencia respecto a las demás repeticiones. Varias fuentes e investigaciones afirman que un ARN plantilla de baja calidad y con presencia de inhibidores puede impedir que las reacciones de RT-qPCR lleguen a un nivel alto de fluorescencia de meseta, lo cual puede afectar tanto la eficiencia de amplificación como la fluorescencia acumulada de la reacción (Guescini, Sisti, Rocchi, Stocchi, & Stocchi, 2008) (Ferrell, 2011) (Bio-Rad, 2011). Al existir un contaminante en la muestra, disminuyen los niveles de fluorescencia de meseta y un desplazamiento de la curva de amplificación hacia la derecha en la parte inferior del punto de inflexión. Como resultado se tienen curvas menos empinadas y ausente de simetría respecto a las curvas sin inhibición. Curvas similares con una meseta menor a la esperada se presentan en ensayos con reactivos o ARN plantilla limitantes producido por la degradación de los mismos (Guescini, Sisti, Rocchi, Stocchi, & Stocchi, 2008). En ambas reacciones sin un Cq del paciente T3, las curvas de amplificación presentan

este tipo de mesetas, por lo que el equipo posiblemente no las consideró como positivas debido a dichas mesetas son muy bajas. Tomando en cuenta que la variabilidad promedio de Cq para el paciente T3 en el sistema FOXP3, sin considerar los datos no obtenidos en dos de los ensayos, es de 0.95%, se cree que el mejoramiento de la calidad del ARN extraído a partir de sedimento urinario es necesario para confirmar un CV intraensayo aceptable del sistema FOXP3 optimizado y evitar la fuga de información importante en ensayos con este tipo de muestras.

RT-qPCR es una técnica con alta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad en la determinación de expresión génica. Pese a ello y a diferencia de 18S ARNr cuya expresión es alta en muestras de orina, biomarcadores relacionados con inmunidad como FOXP3 poseen cantidades bajas de ARN, lo cual limita el número de genes diana analizables con RT-qPCR (Galichon, y otros, 2016) (Noutsias, y otros, 2008). Como resultado de sensibilidad analítica, el sistema de RT-qPCR con TaqMan® del gen FOXP3 es capaz de detectar y amplificar hasta una concentración de ARN de 1 pg/μL. Sin embargo, cabe mencionar que los ensayos para determinar sensibilidad analítica tanto para el gen 18S como para el gen FOXP3 se realizaron en sangre. Como se ha venido analizando anteriormente, las muestras de orina poseen bajos rendimientos de extracción de ARN en cantidad y calidad, con tendencias a degradarse. Además, todas las muestras extraídas a partir de sedimento urinario mostraron contaminación con fenol producto del proceso de purificación, el cual puede generar un efecto inhibitorio (Tichopad, Didier, & Pfaffl, 2004). Frente a todo lo mencionado anteriormente, es acertado pensar que en muestras de orina existió una mayor dificultad en la detección y amplificación de gen FOXP3, tanto por una menor cantidad del ARNm de FOXP3 en muestras de orina comparado con sangre, como por la reducción de la sensibilidad analítica del sistema frente a muestras de ARN de orina por la presencia de inhibidores de PCR. Por lo tanto se considera que el sistema RT-qPCR con TaqMan® del gen FOXP3 necesita un aumento en la sensibilidad analítica para ser validado en muestras clínicas de orina de pacientes trasplantados renales.

Guescini y otros (2008) argumentaron que una etapa de preamplificación ayuda a aumentar la sensibilidad en ensayos de RT-qPCR para genes de baja abundancia. Además, en varias investigaciones de biomarcadores de poca presencia en el ARN de sedimento urinario, incluyendo FOXP3, se aplican procesos de preamplificación para establecer mayor cantidad de ADNc para una posterior medición de expresión génica (Muthukumar, y otros, 2005) (Keslar, y otros, 2013) (Suthanthiran, y otros, 2013) (Galichon, y otros, 2016). A partir de esto, se recomienda la implementación de una etapa de preamplificación a los ensayos RT-qPCR del gen FOXP3 para lograr la detección, amplificación y medición de su expresión en muestras de ARN de orina de pacientes trasplantados renales en proyectos a futuro.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- La optimización de los ensayos de RT-PCR convencional de 18S y FOXP3 con el kit SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase presentaron una formación aleatoria de productos inespecíficos que no permitieron la optimización total de los sistemas.
- La concentración de ARN de sangre medida por fluorimetría con el equipo Qubit se relaciona mejor con la cantidad real e íntegra de ARN en la muestra, comparado con la medición por espectrofotometría con el equipo NanoDrop.
- La medición de la concentración de ARN a partir de sangre por espectrofotometría reveló interferencias de uno de los reactivos del kit TURBO DNA-free™ kit en la cuantificación.
- Los ensayos de sensibilidad analítica de los sistemas de RT-qPCR con TaqMan® de 18S y FOXP3 mostraron inhibición de las reacciones con una concentración de 10 ng/μL por uno o varios reactivos de TURBO DNA-free™ kit.
- Las eficiencias de amplificación en porcentaje de los sistemas RT-qPCR con TaqMan® de 18S y FOXP3 fueron de 135.70% y 138.93% respectivamente, comprobando posible formación de dímeros de cebadores o problemas en la muestra de ARN extraído a partir de sangre.
- El protocolo estandarizado de aislamiento de ARN a partir de orina con el kit PureLink® RNA Mini Kit obtuvo rendimientos de extracción que oscilaron entre 1.23 y 3.06 ng de ARN por mL de orina procesada, y con un ratio 260/280 entre 1.48 y 1.53.

- El robot MagPurix 12 System presentó mejores resultados, respecto al kit PureLink® RNA Mini Kit, en el aislamiento de ARN de orina, con valores que oscilaron entre 4.15 y 13.85 ng de ARN por mL de orina procesada, y con un radio 260/280 entre 1.44 y 1.73.
- Los resultados totales de extracción de ARN a partir de orina indicaron rendimientos de extracción variables dependiendo del método, baja calidad de ARN con tendencia a degradarse, y presencia de contaminación con fenol debido al proceso de purificación.
- Mediante ensayos de RT-PCR convencional para detección de 18S ARNr, se comprobó que, con el uso del estabilizante RNAlater, el ARN se mantiene íntegro y funcional a temperatura ambiente hasta un tiempo de 6 horas, y en ultracongelación a -80°C por un tiempo no menor a una semana.
- 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 ($\alpha = 0.05$) entre las variaciones (CV) de Cq de los diferentes ensayos respecto a cada paciente y entre ensayos generales.
- El ARN extraído a partir de sedimento celular urinario es propenso a la degradación, lo cual se vio reflejado en la variación de los valores de Cq en el sistema del gen de referencia 18S tanto en pacientes trasplantados como no trasplantados.
- El análisis estadístico (prueba de Kruskal Wallis) mostró diferencias significativas (p-valor < 0.0001) 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 en muestras clínicas de orina fue capaz de detectar el gen FOXP3 ARNm en sólo una muestra de ARN correspondiente a uno de los pacientes trasplantados.

- El equipo LightCycler® Nano determinó sólo un 77.78% de las reacciones del paciente T3, único detectado por el sistema RT-qPCR con TaqMan® de FOXP3, como positivas a la expresión del gen FOXP3 ARNm, debido a la baja calidad y presencia de inhibidores de PCR en la muestra de ARN.
- 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.

CAPÍTULO 6

RECOMENDACIONES

- Debido a los inconvenientes comprobados que genera el kit SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase, de Invitrogen, para futuras optimizaciones de sistemas de RT-PCR convencional, se recomienda trabajar con otros kits comerciales “one-step” que no formen productos inespecíficos aleatorios u optimizar ensayos de RT-PCR convencional “two-step”.
- Se sugiere implementar un proceso de purificación luego del tratamiento de muestras de ARN de sangre con TURBO DNA-free™ kit para eliminar los reactivos residuales que interfieren en la cuantificación de ARN y ensayos de RT-qPCR.
- Basado en los ensayos de cuantificación, se debería determinar la concentración de ARN tanto por espectrofotometría como por fluorometría para garantizar datos reales sobre concentración y condiciones de pureza de las muestras.
- Dados los posibles inconvenientes revelados de cada sistema en las eficiencias de amplificación, 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%.
- Tras determinar las diferencias cuantitativas y cualitativas de ARN entre muestras extraídas a partir de sangre y orina, se sugiere de ser posible determinar una sensibilidad analítica de ambos sistemas en muestras de ARN de sedimento urinario.
- El proceso de purificación con fenol/cloroformo debería ser optimizado para minimizar o eliminar totalmente restos de fenol en muestras de ARN y con ello minimizar la posibilidad de inhibición en ensayos de RT-qPCR.

- Se debería evaluar los tiempos máximos de preservación del ARN de orina con RNAlater a temperatura ambiente ya que por falta de recursos no se llegó al tiempo límite de duración del ARN con el estabilizante, y se considera importante conocer su comportamiento para su aplicación.
- Conociendo de resultados que apoyan la idea, se recomienda analizar si el RNAlater mejora la obtención de ARN a partir de células urinarias en la extracción con el robot MagPurix 12 System.
- Dadas las posibles variaciones de expresión encontradas en el proyecto y comprobadas en otras investigaciones, se cree necesario trabajar con un nuevo gen como normalizador en lugar de 18S para estudios de biomarcadores urinarios de rechazo agudo renal.
- 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 en lugar de aplicarlo como gen de referencia.
- 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.
- Una etapa de preamplificación se debería implementar a los ensayos RT-qPCR del gen FOXP3 para garantizar la detección, amplificación y medición de su expresión en muestras de ARN de orina de pacientes trasplantados renales.
- Es necesario confirmar un CV intraensayo e interensayo aceptable del sistema FOXP3 tras mejorar las condiciones del ensayo y ARN mencionadas anteriormente.

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

- A. Martin Andres, J. L. (2004). *Bioestadística para las Ciencias de la Salud*. Granada: Norma - Capitel.
- Afaneh, C., Muthukumar, T., Lubetzky, M., Ding, R., Snopkowski, C., Sharma, V., . . . Suthanthiran, M. (2010). Urinary Cell Levels of mRNA for OX40, OX40L, PD-1, PD-L1 or PD-L2 and Acute Rejection of Human Renal Allografts. *Transplantation*, 90(12), 1381-1387.
- Agodoa, L., Eknoyan, G., Ingelfinger, J., Keane, W., Mauer, M., Mitch, W., . . . Wilcox, C. (1999). Assessment of structure and function in progressive renal disease. *Kidney International Supplement*, 63, S144-S150.
- Aguilera, P., Ruiz Tachiquín, M., Rocha Munive, M., Pineda Olvera, B., & Chánez Cárdenas, M. (2004). PCR en tiempo real. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología*, 175-201.
- Akhtar, F., Rana, T., Kazi, J., Zafar, N., Hashmi, A., Bhatti, S., . . . Rizvi, A. (1998). Correlation between biopsies and noninvasive assessment of acute graft dysfunction. *Transplantation Proceeding*, 30(7), 3069.
- Alegre, M., Leemans, J., Le Moine, A., Florquin, S., De Wilde, V., Chong, A., & Goldman, M. (2008). The multiple facets of toll-like receptors in transplantation biology. *Transplantation*, 86(1), 1-9.
- Al-Lamki, R., Wang, J., Skepper, J., Thiru, S., Pober, J., & Bradley, J. (2001). Expression of tumor necrosis factor receptors in normal kidney and rejecting renal transplants. *Laboratory Investigation*, 81(11), 1503-1515.
- Ambion™. (5 de Octubre de 2012). *TURBO DNA-free™ kit*. Obtenido de Thermo Fisher Scientific Inc.: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_055740.pdf

- Ambion™ by Life Technologies™. (17 de Octubre de 2012). *TURBO™ DNase*. Obtenido de Thermo Fisher Scientific Inc.: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4393900B.pdf>
- Ambion™ Life Technologies™. (14 de Junio de 2012). *PureLink® RNA Mini Kit*. Obtenido de Thermo Fisher Scientific Inc.: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink_rna_mini_kit_man.pdf
- Applied Biosystems. (2008). *Guide to Performing Relative Quantitation of Gene*. Obtenido de Applied Biosystems: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042380.pdf
- Aquino-Dias, E., Joelsons, G., da Silva, D., Berdichewski, R., Ribeiro, A., Veronose, F., . . . Manfro, R. (2008). Non-invasive diagnosis of acute rejection in kidney transplants with delayed graft function. *Kidney International*, 73, 877-884.
- Barry, M., & Bleackley, R. (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nature Reviews Immunology*, 2, 401-409.
- Batsford, S., Dickenmann, M., Dürmüller, U., Hopfer, H., Gudat, F., & Mihatsch, M. (2011). Is monitoring of FOXP3 Treg cells in renal transplants during acute cellular rejection episodes useful? *Clinical Nephrology*, 75(2), 101-106.
- Beckingham, I., Nicholson, M., & Bell, P. (1994). Analysis of factors associated with complications following renal transplant needle core biopsy. *British Association of Urological Surgeons*, 73(1), 13-15.
- Bennett, C., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M., Ferguson, P., Whitesell, L., . . . Ochs, H. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature genetics*, 27(1), 20-21.

- Biomarkers Definitions Working Group. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 69(3), 89-95.
- Bio-Rad. (2011). *Real-Time PCR Doctor - High Resolution Melt (HRM) Analysis Experiments*. Obtenido de Bio-Rad Laboratories, Inc.: <http://www.bio-rad.com/es-ec/applications-technologies/real-time-pcr-doctor-high-resolution-melt-hrm-analysis-experiments#gel2>
- Bonsib, S., Abul-Ezz, S., Ahmad, I., Young, S., Ellis, E., Schneider, D., & Walker, P. (2000). Acute rejection-associated tubular basement membrane defects and chronic allograft nephropathy. *Kidney International*, 58(5), 2206-2214.
- Briscoe, D., Alexander, S., & Lichtman, A. (1998). Interactions between T lymphocytes and endothelial cells in allograft rejection. *Current Opinion in Immunology*, 10, 525-531.
- Brisson, M., Tan, L., Park, R., & Hamby, K. (2000). *Identification of Nonspecific Products Using Melt-Curve Analysis on the iCycler iQ Detection System*. Obtenido de Bio-Rad Laboratories, Inc.: http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_2684.pdf
- Bunnag, S., Allanach, K., Jhangri, G., Sis, B., Einecke, G., Mengel, M., . . . Halloran, P. (2008). FOXP3 Expression in Human Kidney Transplant Biopsies Is Associated with Rejection and Time Post Transplant but Not with Favorable Outcomes. *American Journal of Transplantation*, 8(7), 1423-1433.
- Bustin, S. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, 25(2), 169-193.
- Carrión Monsalve, D. M., Espinoza Manzano, C. D., & Flores Enderica, C. G. (2012). *Sobrevida y complicaciones del paciente con injerto renal de donante cadavérico vs. donante vivo, controlados en el hospital "José*

Carrasco Arteaga" (IESS). Cuenca. 2007 marzo 2012. Tesis. Obtenido de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/3433>

Cecka, J. (1998). The UNOS Scientific Renal Transplant Registry. *Clinical Transplants*, 1-16.

Clinica Alemana. (s.f.). *Biopsia Renal Percutánea*. Obtenido de Clinica Alemana:

<https://portal.alemana.cl/wps/wcm/connect/Internet/Home/medicos-y-especialidades/Nefrologia/Procedimientos/Biopsia+Renal+Percutanea>

Clinical Trials in Organ Transplantation. (2009). *Urine collection and processing*. Obtenido de National Institute of Allergy and Infectious Diseases:

http://www.ctotstudies.org/SOP_urine_collection_for_RNA_isolation.pdf

Clinical Trials in Organ Transplantation CTOT. (2009). *RNA Isolation from Urine Pellet*. Obtenido de National Institute of Allergy and Infectious Diseases: http://www.ctotstudies.org/SOP_urine_RNA_isolation.pdf

Collins, B. (1 de Octubre de 2015). *Renal Transplantation*. Obtenido de Medscape: <http://emedicine.medscape.com/article/430128-overview>

Colvin, R. (2007). Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(4), 1046-1056.

Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(5), 299-305.

de la Fuente, J. R., & Rodríguez-Carranza, R. (1996). *La educación médica y la salud en México*. México DF: Siglo XXI.

Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. (2016). *InfoStat versión 2016*. Obtenido de Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina: <http://www.infostat.com.ar>

- Ding, R., Li, B., Muthukumar, T., Dadhania, D., Medeiros, M., Hartono, C., . . . Suthanthiran, M. (2003). CD103 mRNA levels in urinary cells predict acute rejection of renal allografts. *Transplantation*, *75*(8), 1307-1312.
- Djamali, A., Kaufman, D., Ellis, T., Zhong, W., Matas, A., & Samaniego, A. (2014). Diagnosis and Management of Antibody-Mediated Rejection: Current Status and Novel Approaches. *American Journal of Transplantation*, *14*, 255-271.
- Dundas, J., & Ling, M. (2012). Reference genes for measuring mRNA expression. *Theory in Biosciences*, *131*, 215-223.
- Early Detection Research Network. (5 de Octubre de 2011). *NCI-EDRN Urine Processing Protocol*. Obtenido de National Cancer Institute: https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjp1d-qgNvNAhXFqx4KHdU8C5IQFggiMAE&url=http%3A%2F%2Fdownload.lww.com%2Fwolterskluwer_vitalstream_com%2FPermaLink%2FPDM%2FA%2FPDM_2011_10_05_RUBIN_200255_SDC1.doc&
- Ely, L., Burrows, S., Purcell, A., Rossjohn, J., & McCluskey, J. (2008). T-cells behaving badly: structural insights into alloreactivity and autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*, *20*, 575-580.
- Ferrell, C. (5 de Mayo de 2011). *qPCR Troubleshooting*. Obtenido de LGC Biosearch Technologies: <http://blog.biosearchtech.com/TheBiosearchTechBlog/bid/63622/qPCR-Troubleshooting>
- Fontenot, J., Gavin, M., & Rudensky, A. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology*, *4*(4), 330-336.
- Furness, P., & Taub, N. (2001). International variation in the interpretation of renal transplant biopsies: report of the CERTPAP Project. *Kidney International*, *60*(5), 1998-2012.

- Galichon, P., Amrouche, L., Hertig, A., Brocheriou, I., Rabant, M., Xu-Dubois, Y.-C., . . . Anglicheau, D. (2016). Urinary mRNA for the diagnosis of renal allograft rejection: the issue of normalization. *American Journal of Transplantation*.
- Gambineri, E., Torgerson, T., & Ochs, H. (2003). Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Current Opinion in Rheumatology*, 15(4), 430-435.
- Geddes, C., Woo, Y., & Jardine, A. (2002). The impact of delayed graft function on the long-term outcome of renal transplantation. *Journal of nephrology*, 15(1), 17-21.
- González Parias, J. L., Duque Giraldo, V., & Velásquez-Lopera, M. (2010). FOXP3: Controlador maestro de la generación y función de las células reguladoras naturales. *Inmunología*, 29(2), 74-84.
- Grotzer, M., Patti, R., Georger, B., Eggert, A., Chou, T., & Phillips, P. (2000). Biological stability of RNA isolated from RNA-later-treated brain tumor and neuroblastoma xenografts. *Medical and Pediatric Oncology*, 34, 438 – 442.
- Gudmundsdottir, H., & Turka, L. (2001). A closer look at homeostatic proliferation of CD4+ T cells: costimulatory requirements and role in memory formation. *The Journal of Immunology*, 167, 3699-3707.
- Guescini, M., Sisti, D., Rocchi, M., Stocchi, L., & Stocchi, V. (2008). A new real-time PCR method to overcome significant quantitative inaccuracy due to slight amplification inhibition. *BMC Bioinformatics*, 9, 326.
- Gulanikar, A., MacDonald, A., Sungurtekin, U., & Belitsky, P. (1992). The incidence and impact of early rejection episodes on graft outcome in recipients of first cadaver kidney transplants. *Transplantation*, 53(2), 323-328.

- Haas, M., Sis, B., Racusen, L., Solez, K., Glotz, D., Colvin, R., . . . Nickleleit, V. (2014). Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *American Journal of Transplantation, 14*(2), 272-283.
- Hagerty, D., & Allen, P. (1992). Processing and presentation of self and foreign antigens by the renal proximal tubule. *Journal of Immunology, 148*(8), 2324-2330.
- Halloran, P. (2004). Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *The New England Journal of Medicine, 351*, 2715-2729.
- Hanneman, S. K., Cox, C. D., Green, K. E., & Kang, D.-H. (2011). Estimating Intra- and Inter-Assay Variability in Salivary Cortisol. *Biological Research for Nursing, 13*(3), 243-250.
- Hanneman, S., Cox, C., Green, K., & Kang, D. (2011). Estimating Intra- and Inter-Assay Variability in Salivary Cortisol. *Biological Research for Nursing, 13*(3), 243-250.
- Hariharan, S., Johnson, C., Bresnahan, B., Taranto, S., McIntosh, M., & Stablein, D. (2000). Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *The New England Journal of Medicine, 342*(9), 605-612.
- Harper, A., McBride, M., & Ellison, M. (1999). The UNOS OPTN waiting list, 1988-1998. *Clinical transplants, 71-82*.
- Hartono, C., Muthukumar, T., & Suthanthiran, M. (2010). Noninvasive Diagnosis of Acute Rejection of Renal Allografts. *Current opinion in organ trasplantation, 35-41*.
- Heid, C., Stevens, J., Livak, K., & Williams, P. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome research, 6*(10), 986-994.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology, 11*(9), 1026-1030.

- Hoffmann, S., Hale, D., Kleiner, D., Mannon, R., Kampen, R., Jacobson, L., . . . Kirk, A. (2005). Functionally significant renal allograft rejection is defined by transcriptional criteria. *American Journal of Transplantation*, 5(3), 573-581.
- Hori, S., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299(5609), 1057-1061.
- Huraib, S., Goldberg, H., Katz, A., Cardella, C., deVeber, G., Cook, G., & Uldall, P. (1989). Percutaneous needle biopsy of the transplanted kidney: technique and complications. *American Journal of Kidney Diseases*, 14(1), 13-17.
- Invitrogen™, Life Technologies™. (2012). *PureLink® Genomic DNA Kits*. Obtenido de Thermo Fisher Scientific Inc.: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink_genomic_man.pdf
- Jiang, H., & Chess, L. (2006). Regulation of Immune Responses by T Cells. *The New England Journal of Medicine*, 354, 1166-1176.
- Kaneku, H., & Terasaki, P. (2006). Thirty year trend in kidney transplants: UCLA and UNOS Renal Transplant Registry. *Clinical Transplants*, 1-27.
- Karlen, Y., McNair, A., Perseguers, S., Mazza, C., & Mermod, N. (2007). Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics*, 8, 131.
- Keslar, K., Lin, M., Zmijewska, A., Sigdel, T., Tran, T., Ma, L., . . . Fairchild, R. (2013). Multicenter evaluation of a standardized protocol for noninvasive gene expression profiling. *American Journal of Transplantation*, 13(7), 1891-1897.
- Kim, I., Bedi, D., Denecke, C., Ge, X., & Tullius, S. (2008). Impact of innate and adaptive immunity on rejection and tolerance. *Transplantation*, 86(7), 889-894.

- Kozera, B., & Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, 54(4), 391–406.
- Kumbala, D., & Zhang, R. (2013). The Essential Concept of Transplant Immunology for Clinical Practice. *World Journal of Transplantation*, 3, 113-118.
- Larsen, C., Morris, P., & Austyn, J. (1990). Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens: a novel pathway for initiation of rejection. *The Journal of Experimental Medicine*, 171(1), 307-314.
- Lesko, L., & Atkinson, A. J. (2001). Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development and regulatory decision making: criteria, validation, strategies. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 41, 347-366.
- Li, B., Hartono, C., Ding, R., Sharma, V., Ramaswamy, R., Qian, B., . . . Suthanthiran, M. (2001). Noninvasive Diagnosis of Renal-Allograft Rejection by Measurement of Messenger RNA for Perforin and Granzyme B in Urine. *The New England Journal of Medicine*, 344, 947-954.
- Livak, K., & Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lo, D., Kaplan, B., & Kirk, A. (2014). Biomarkers for kidney transplant rejection. *Nature Reviews Nephrology*, 10, 215-225.
- Martin Andres, A., & Luna del Castillo, J. (2004). *Bioestadística para las Ciencias de la Salud*. Granada: Norma - Capitel.
- Matas, A., Sibley, R., Mauer, M., Sutherland, D., Simmons, R., & Najarian, J. (1983). The value of needle renal allograft biopsy. I. A retrospective study of biopsies performed during putative rejection episodes. *Annals of surgery*, 197(2), 226-237.

- Matas, A., Smith, J., Skeans, M., Thompson, B., Gustafson, S., Schnitzler, M., . . . Kasiske, B. (2014). OPTN/SRTR 2012 Annual Data Report: Kidney. *American Journal of Transplantation*, 14(S1), 11-44.
- Matignon, M., Ding, R., Dadhania, D., Mueller, F., Hartono, C., Snopkowski, C., . . . Muthukumar, T. (2014). Urinary Cell mRNA Profiles and Differential Diagnosis of Acute Kidney Graft Dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(7), 1586–1597.
- Mayo Clinic Staff. (24 de Enero de 2015). *Tests and Procedures: Kidney transplant*. Obtenido de Mayo Foundation for Medical Education and Research: <http://www.mayoclinic.org/tests-procedures/kidney-transplant/basics/definition/prc-20014007?p=1>
- Medeiros, M., Sharma, V., Ding, R., Yamaji, K., Li, B., Muthukumar, T., . . . Suthanthiran, M. (2003). Optimization of RNA yield, purity and mRNA copy number by treatment of urine cell pellets with RNA later. *Journal of Immunological Methods*, 279, 135– 142.
- Meier-Kriesche, H.-U., Schold, J., Srinivas, T., & Kaplan, B. (2004). Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *American Journal of Transplantation*, 4(3), 378–383.
- Molecular Probes™ Life Technologies™. (16 de Febrero de 2015). *Qubit® RNA BR Assay Kit*. Obtenido de Thermo Fisher Scientific Inc.: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Qubit_RNA_BR_Assay_UG.pdf
- Morris, P. (2004). Transplantation — A Medical Miracle of the 20th Century. *The New England Journal of Medicine*, 351, 2678-2680.
- Moser, M. J., DiFrancesco, R. A., Gowda, K., Klingele, A. J., Sugar, D. R., Stocki, S., . . . Schoenfeld, T. W. (2012). Thermostable DNA Polymerase from a Viral Metagenome Is a Potent RT-PCR Enzyme. *PLoS ONE*, 7(6).

- Muller, P., Janovjak, H., Miserez, A., & Dobbie, Z. (2002). Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques*, 32(6), 1372-1379.
- Muthukumar, T., Dadhania, D., Ding, R., Snopkowski, C., Naqvi, R., Lee, J., . . . Suthanthiran, M. (2005). Messenger RNA for FOXP3 in the Urine of Renal-Allograft Recipients. *The New England Journal of Medicine*, 353, 2342-2351.
- Nankivell, B., & Al, S. (2010). Rejection of the Kidney Allograft. *The New England Journal of Medicine*, 363, 1451-1462.
- Nankivell, B., Borrows, R., Fung, C., O'Connell, P., Allen, R., & Chapman, J. (2003). The natural history of chronic allograft nephropathy. *The New England Journal of Medicine*, 349, 2326-2333.
- Naqvi, R., Jafri, S. B., Imani, Z., Mubarak, M., & Muzaffar, R. (2011). Urine immune profiling by measurement of multiple cytokine/chemokine mRNA levels in renal allograft dysfunction. *Open Journal of Immunology*, 1(3), 87-96.
- Nickerson, P. (2009). Post-transplant monitoring of renal allografts: are we there yet? *Current opinion in immunology*, 21(5), 563-568.
- Noris, M., Casiraghi, F., Todeschini, M., Cravedi, P., Cugini, D., Monteferrante, G., . . . Remuzzi, G. (2007). Regulatory T cells and T cell depletion: Role of immunosuppressive drugs. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18, 1007 –1018.
- Noutsias, M., Rohde, M., Block, A., Klippert, K., Lettau, O., Blunert, K., . . . Kotsch, K. (2008). Pre-amplification techniques for real-time RT-PCR analyses of endomyocardial biopsies. *BMC Molecular Biology*, 9, 3.
- Opelz, G. (1997). Critical evaluation of the association of acute with chronic graft rejection in kidney and heart transplant recipients. The Collaborative Transplant Study. *Transplantation proceedings*, 28(1-2), 73-76.

- Persson, R., Garde, A., AM, H., K, O., & B, L. (2008). Seasonal variation in human salivary cortisol concentration. *Chronobiology International*, 25, 923-937.
- Pfaffl, M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 2002-2007.
- PREMIER Biosoft. (2016). *PCR Primer Design Guidelines*. Obtenido de PREMIER Biosoft: http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html
- R Core Team. (2016). *R: A language and environment for statistical computing*. Obtenido de R Foundation for Statistical Computing: <https://www.r-project.org/>
- Robertson, H., & Kirby, J. (2003). Post-transplant renal tubulitis: the recruitment, differentiation and persistence of intra-epithelial T cells. *American Journal of Transplantation*, 3, 3-10.
- Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 22, 531-562.
- Sakaguchi, S. (2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature Immunology*, 6(4), 345-352.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., & Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *The Journal of Immunology*, 155(3), 1151-1164.
- Saludemia. (s.f.). *Biopsia renal*. Obtenido de Saludemia: <http://www.saludemia.com/-/prueba-biopsia-renal>
- Sayegh, M., & Carpenter, C. (2004). Transplantation 50 Years Later — Progress, Challenges, and Promises. *The New England Journal of Medicine*, 351, 2761-2766.

- Schwartz, R. (2005). Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nature immunology*, 6(4), 327-330.
- Solez, K., Colvin, R., Racusen, L., Haas, M., Sis, B., Mengel, M., . . . Mihatsch, M. (2008). Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *American Journal of Transplantation*, 8(4), 753-760.
- Sorof, J., Vartanian, R., Olson, J., Tomlanovich, S., Vincenti, F., & Amend, W. (1995). Histopathological concordance of paired renal allograft biopsy cores. Effect on the diagnosis and management of acute rejection. *Transplantation*, 60(11), 1215-1219.
- Suchin, E., Langmuir, P., Palmer, E., Sayegh, M., Wells, A., & Turka, L. (2001). Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. *The Journal of Immunology*, 166, 973-981.
- Suthanthiran, M., Schwartz, J., Ding, R., Abecassis, M., Dadhania, D., Samstein, B., . . . Han, L. (2013). Clinical Trials in Organ Transplantation 04 (CTOT-04) Study Investigators : Urinary-cell mRNA profile and acute cellular rejection in kidney allografts. *The New England Journal of Medicine*, 369, 20-31.
- Tatapudi, R., Muthukumar, T., Dadhania, D., Ding, R., Li, B., Sharma, V., . . . Suthanthiran, M. (2004). Noninvasive detection of renal allograft inflammation by measurements of mRNA for IP-10 and CXCR3 in urine. *Kidney International*, 65(6), 2390-2397.
- Terasaki, P. (2003). Humoral theory of transplantation. *American Journal of Transplantation*, 3(6), 665-673.
- Terasaki, P., Cecka, J., Gjertson, D., & Takemoto, S. (1995). High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. *The New England Journal of Medicine*, 333(6), 333-336.
- Thermo Fisher Scientific. (Octubre de 2010). *NanoDrop 8000 Spectrophotometer*. Obtenido de Thermo Fisher Scientific Inc.:

<http://www.nanodrop.com/Library/nd-8000-v2.2%20-users-manual-8.5%20x%2011.pdf>

Thermo Fisher Scientific. (2016). *Qubit® Fluorometer vs. Competitors*. Obtenido de Thermo Fisher Scientific Inc.: <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit/qubit-fluorometer/qubit-vs-competitors.html>

Thermo Scientific™. (2009). *NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer*. Obtenido de Thermo Fisher Scientific Inc.: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/NanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf>

Thornton, B., & Basu, C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 39(2), 145–154.

Tichopad, A., Didier, A., & Pfaffl, M. (2004). Inhibition of real-time RT–PCR quantification due to tissue-specific contaminants. *Molecular and Cellular Probes*, 18, 45–50.

Ting, Y.-T., Coates, T., Walker, R., & Alexander, M. (2012). Urinary tubular biomarkers as potential early predictors of renal allograft rejection. *Nephrology*, 17, 11-16.

Tonelli, M., Wiebe, N., Knoll, G., Bello, A., Browne, S., Jadhav, D., . . . Gill, J. (2011). Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. *American Journal of Transplantation*, 11(10), 2093-2109.

Trowsdale, J., & Parham, P. (2004). Mini-review: defense strategies and immunity-related genes. *Journal of immunology*, 34, 7-17.

UC San Diego Health Sciences. (s.f.). *Erythrocyte Lysis - Protocols*. Obtenido de University of California:

<https://healthsciences.ucsd.edu/research/moores/shared-resources/flow-cytometry/protocols/Pages/erythrocyte-lysis.aspx>

- Vella, J., Vos, L., Carpenter, C., & Sayegh, M. (1997). Role of indirect allorecognition in experimental late acute rejection. *Transplantation*, *64*, 1823-1828.
- Veronese, F., Rotman, S., Smith, R., Pelle, T., Farrell, M., Kawai, T., . . . Colvin, R. (2007). Pathological and clinical correlates of FOXP3+ cells in renal allografts during acute rejection. *American journal of transplantation*, *7*(4), 914-922.
- Wang, J., Ioan-Facsinay, A., van der Voort, E., Huizinga, T., & Toes, R. (2007). Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *European Journal of Immunology*, *37*(1), 129–138.
- Williams, W., Taheri, D., Tolkoff-Rubin, N., & Colvin, R. (2012). Clinical role of the renal transplant biopsy. *Nature reviews. Nephrology*, *8*(2), 110-121.
- Womer, K., Sayegh, M., & Auchincloss, H. J. (2001). Involvement of the direct and indirect pathways of allorecognition in tolerance induction. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, *356*, 639-647.
- Wong, M., & Medrano, J. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, *39*, 75-85.
- Wood, K., & Goto, R. (2012). Mechanisms of rejection: current perspectives. *Transplantation*, *93*(1), 1-10.
- Wyburn, K., Jose, M., Wu, H., Atkins, R., & Chadban, S. (2005). The role of macrophages in allograft rejection. *Transplantation*, *80*, 1641-1647.
- Yuan, J., Reed, A., Chen, F., & Stewart, C. J. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*, *7*, 85.
- Zha, Y., Ghobrial, R., Busuttil, R., & Kupiec-Weglinski, J. (1999). Th1 and Th2 cytokines in organ transplantation: paradigm lost? *Critical Reviews in Immunology*, *19*, 155-172.

- Zhang, R. (2014). Clinical Management of Kidney Allograft Dysfunction. *Open Journal of Organ Transplant Surgery*, 4(2), 7-14.
- Zhang, R., Kumar, P., Ramcharan, T., & Reisin, E. (2004). Kidney Transplantation: The Evolving Challenges. *The American Journal of the Medical Sciences*, 328, 156-161.
- Zheng, X., Sanchez-Fueyo, A., Sho, M., Domenig, C., Sayegh, M., & Strom, T. (2003). Favorably tipping the balance between cytopathic and regulatory T cells to create transplantation tolerance. *Immunity*, 19(4), 503-514.
- Zhou, W., Medof, M., Heeger, P., & Sacks, S. (2007). Graft-derived complement as a mediator of transplant injury. *Current Opinion in Immunology*, 19(5), 569-576.
- Zinexts. (01 de Enero de 2014). *MagPurix Extraction Kit Handbook*. Obtenido de Zinexts Life Science Corporation;; <http://www.sopachem.com/lifesciences/wp-content/uploads/2014/09/MagPurix-Extraction-Kit-Handbook.pdf>
- Zorn, E., Miklos, D., Floyd, B., Mattes-Ritz, A., Guo, L., Soiffer, R., . . . Ritz, J. (2004). Minor histocompatibility antigen DBY elicits a coordinated B and T cell response after allogeneic stem cell transplantation. *The Journal of Experimental Medicine*, 199(8), 1133-1142.
- Zou, Y., Stastny, P., Süsal, C., Döhler, B., & Opelz, G. (2007). Antibodies against MICA Antigens and Kidney-Transplant Rejection. *The New England Journal of Medicine*, 357, 1293-1300.