



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



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

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








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

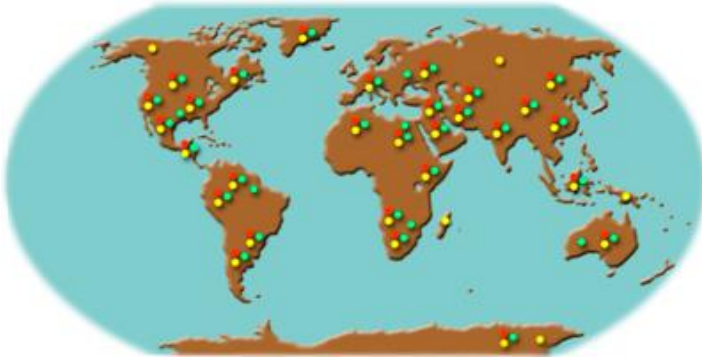
Benavides Vera Odalys Jelissa

Directora: Torres Arias, Marbel Ph.D

Sangolquí, Septiembre 2023



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

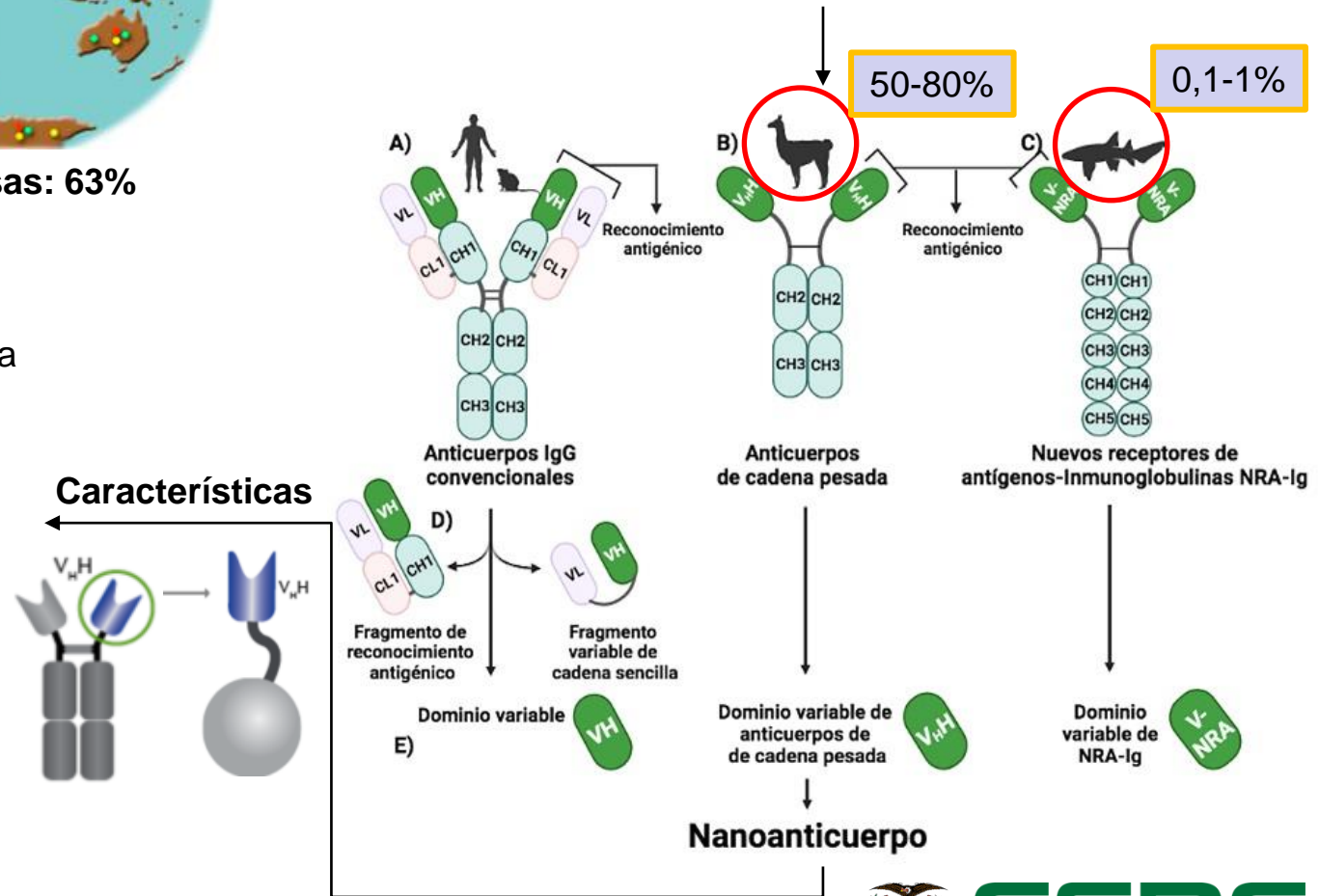


Enfermedades infecciosas: 63%

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

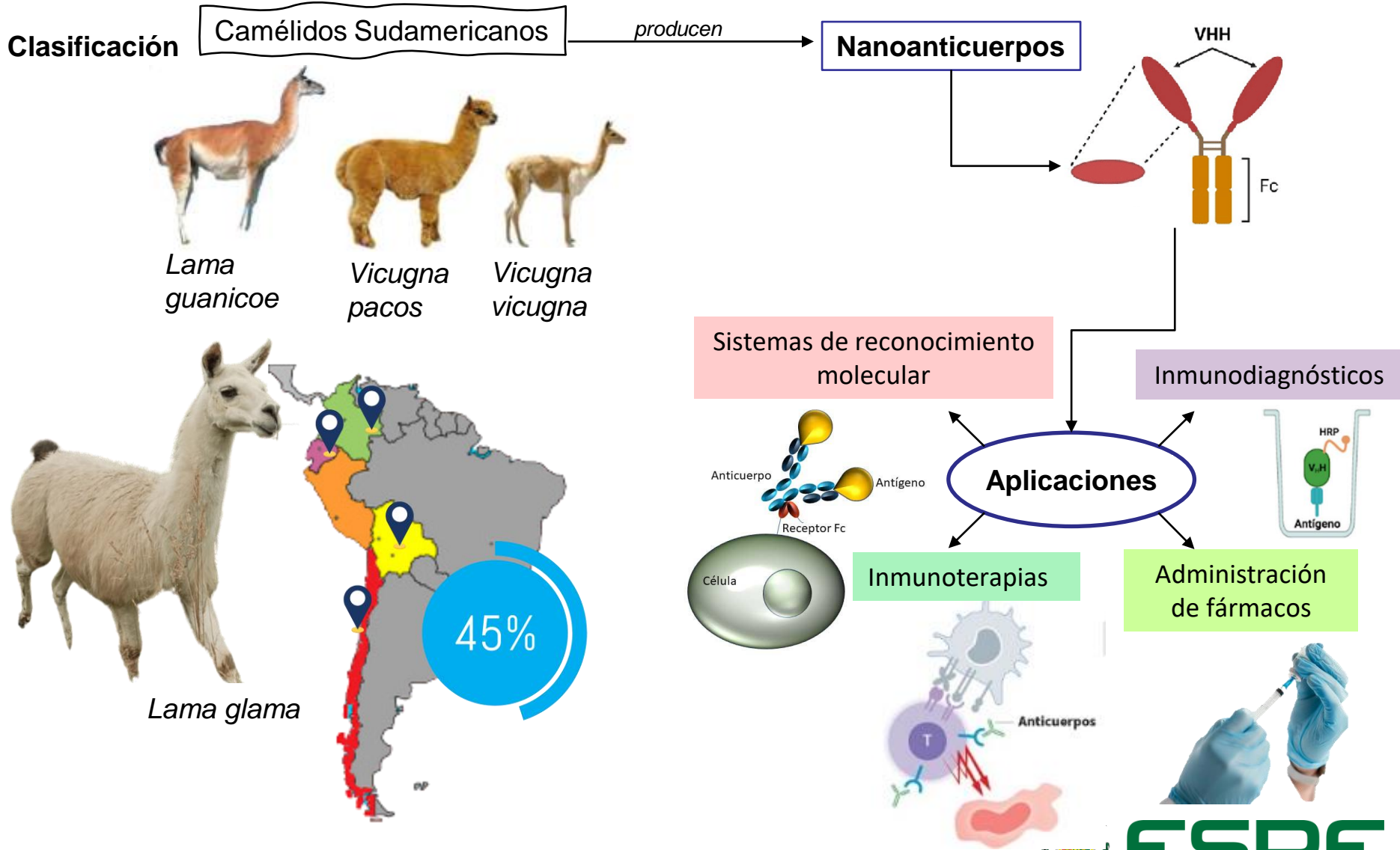
Estrategia terapéutica

Producción de nanoanticuerpos



Lama glama y aplicación de nanoanticuerpos

Introducción



Estudios clínicos

→ **Enfermedad genética: Cáncer**

✓ **Detección**

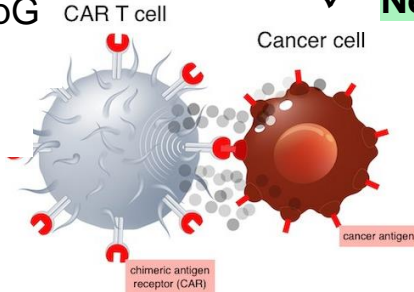
VHH contra AFP

✓ **Impedimento de su propagación**

CAPNb2/CapG

✓ **Reducir su frecuencia**

CAR-T



→ **Enfermedad por virus: Hepatitis C**

✓ **Inhibición de la replicación**

Serina proteasa VHH

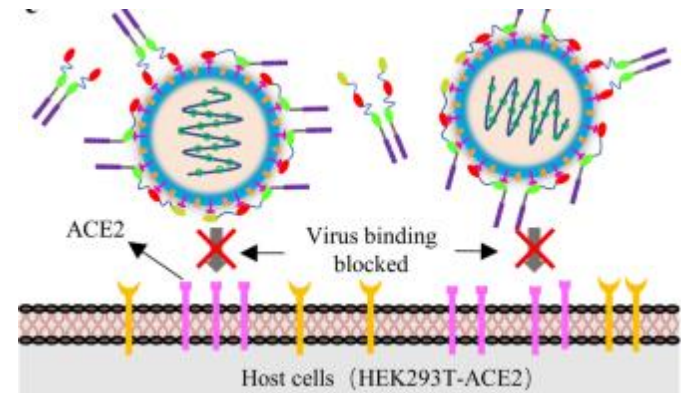
→ **Covid-19**

✓ **Neutralización del virus**

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

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

✓ **Vacuna anti-CfaE**



Producción de nanoanticuerpos



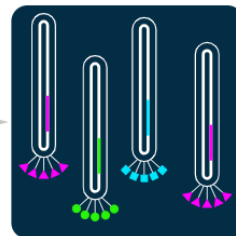
Immunizar a un camello



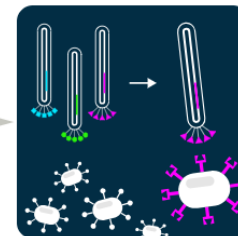
Extraer glóbulos blancos



Copiar genes para nanoanticuerpos, insertarlos en fagos

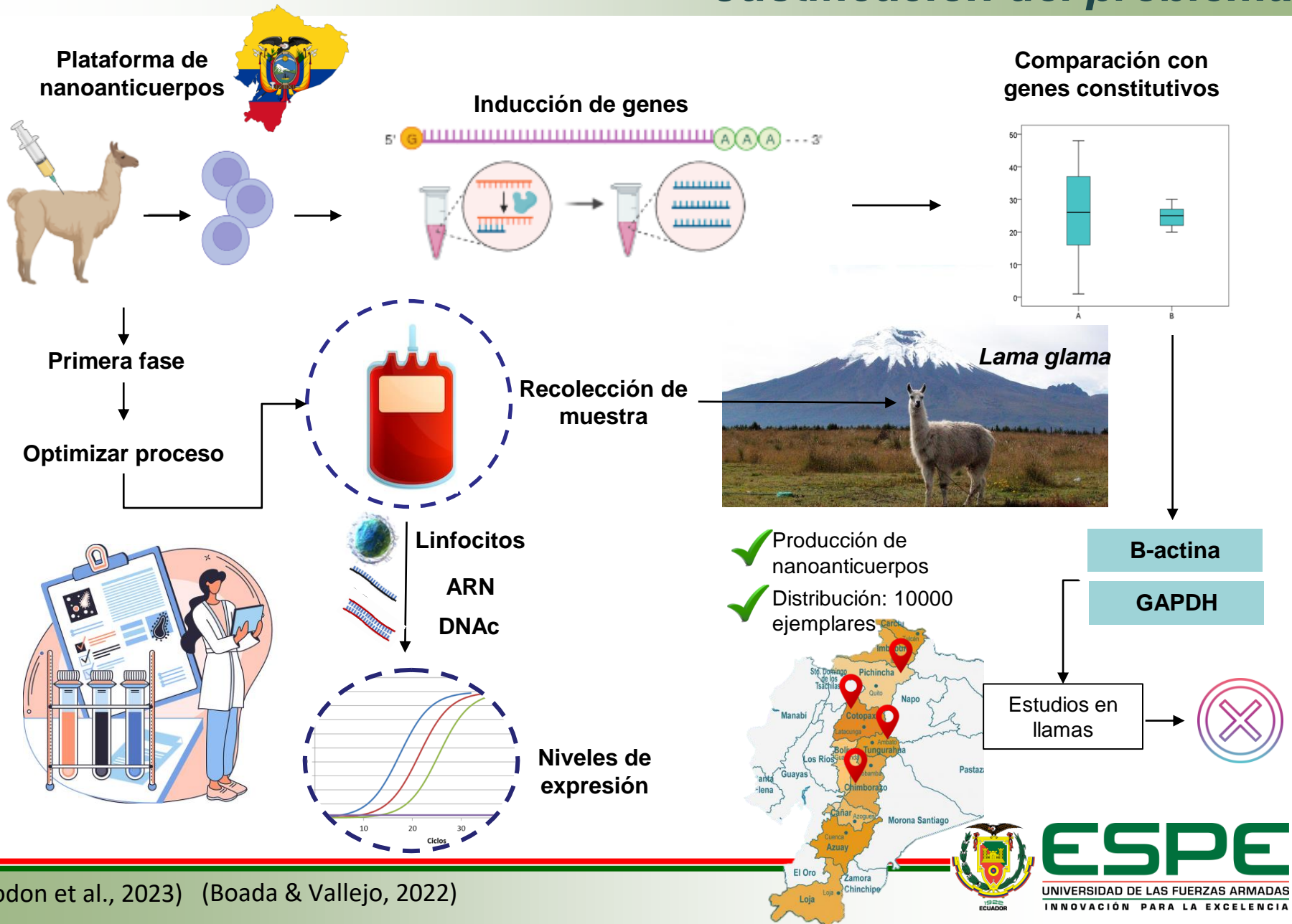


Generar fagos que expresen nanoanticuerpos



Tamizar en busca de los nanoanticuerpos deseados

Justificación del problema

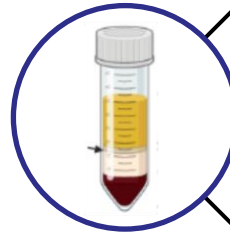


Objetivo general

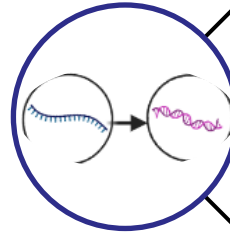
Expresar de forma génica a B-actina y GAPDH por el método de reacción de cadena de polimerasa cuantitativa (qPCR) a partir de linfocitos de *Lama glama* para el análisis de los niveles de expresión de los genes de interés.



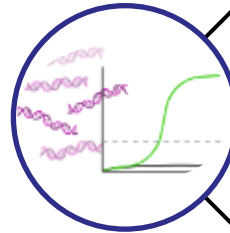
Objetivo específicos



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



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

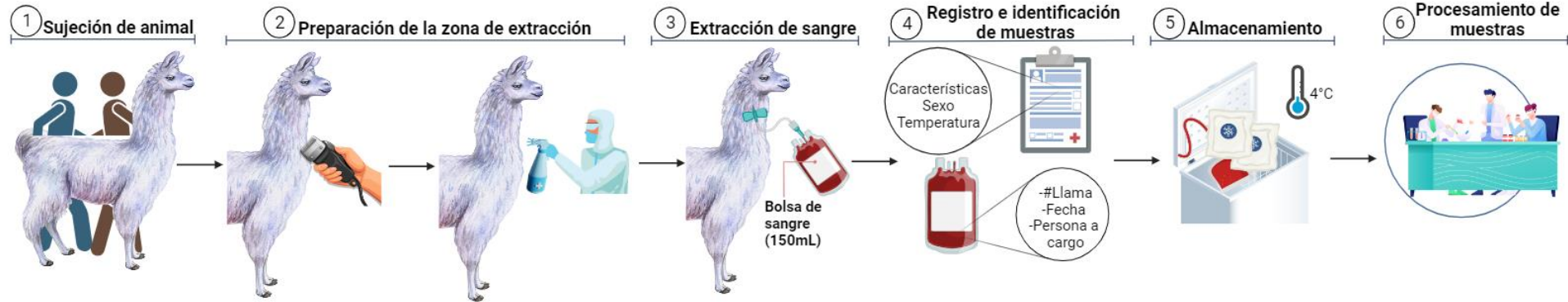


Analizar Delta ct mediante PCR cuantitativa (qPCR) a fin de verificar los niveles de expresión de los genes B-actina y GAPDH.

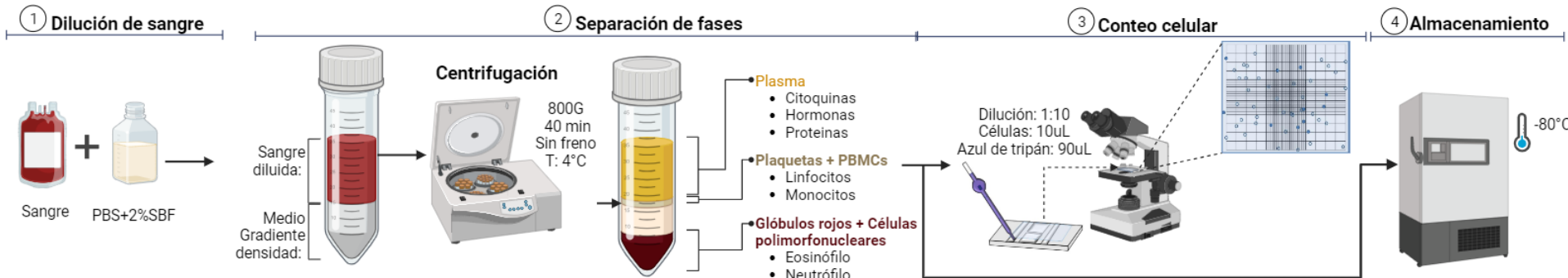
Hipótesis

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

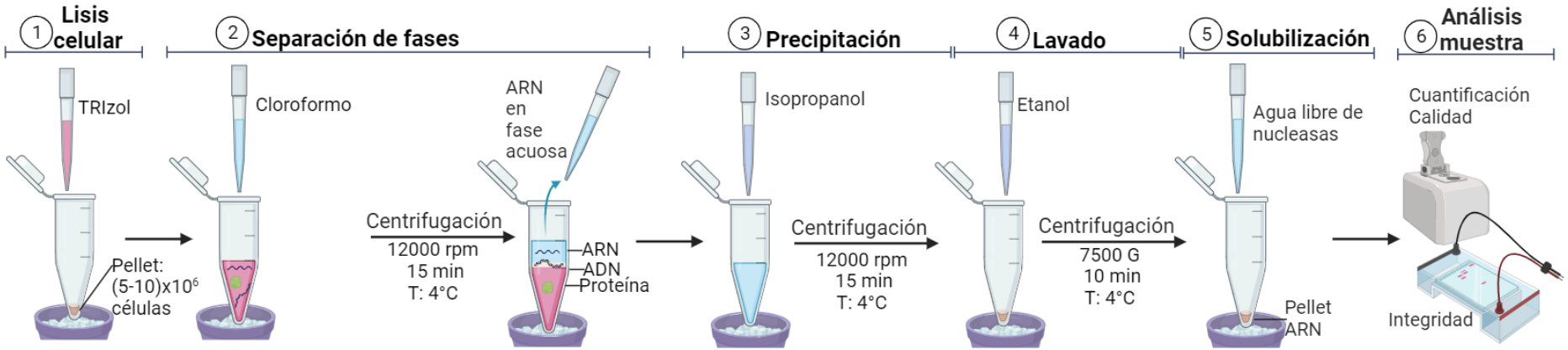
Toma de muestra a partir de llama



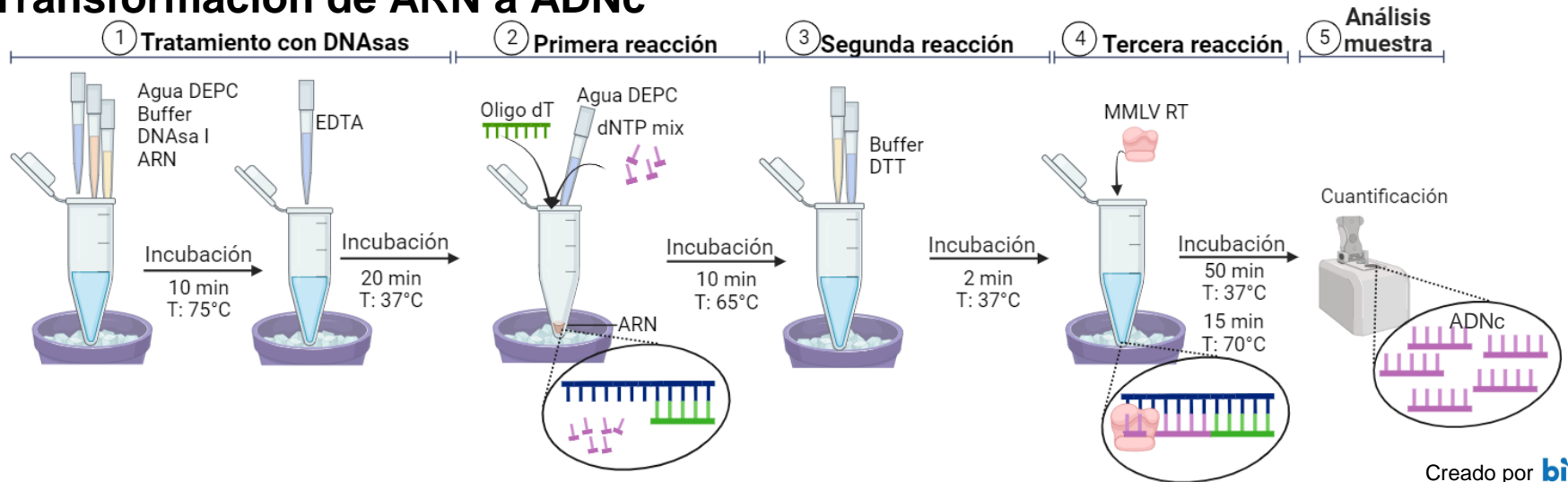
Purificación y cuantificación de linfocitos



Aislamiento de ARN a partir de linfocitos



Transformación de ARN a ADNc



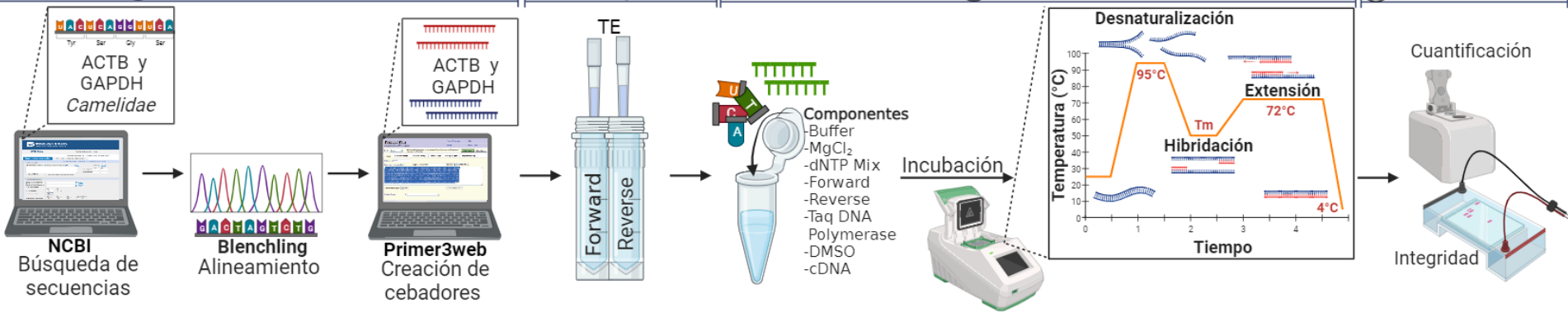
Diseño de cebadores y PCR punto final

① Diseño de cebadores

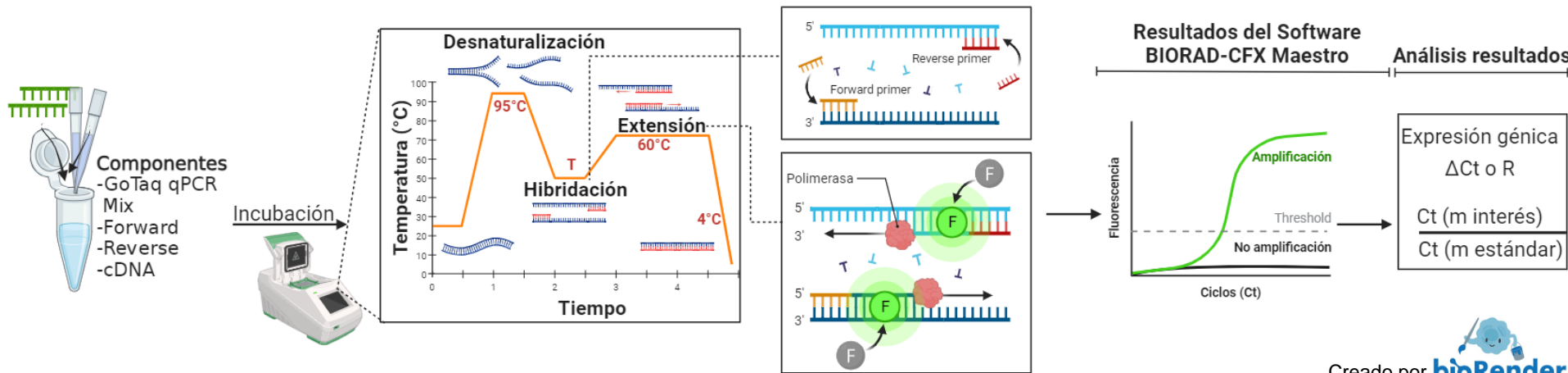
② Resuspensión

③ PCR

④ Análisis muestra



Técnica RT-qPCR



Creado por bioRender

Análisis estadístico



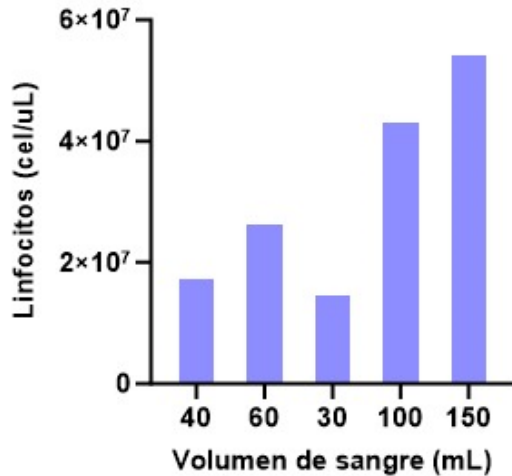
-T-test
-ANOVA de dos vías



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Obtención de linfocitos a partir de sangre de llama

Número de linfocitos con respecto al volumen de sangre extraída



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



Características de cada muestreo de llamas

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

Comparación de número de linfocitos entre especies de la familia Camelidae

Linfocitos en *Lama glama* (150mL): 5×10^7



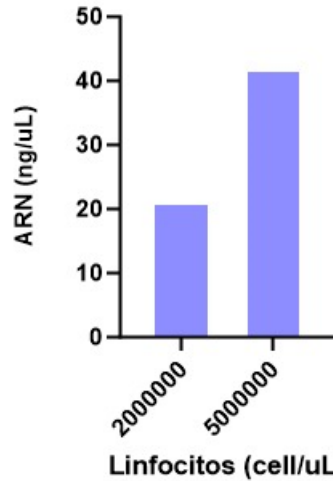
Linfocitos en *Vicugna pacos* (1L): $3,55$ a $2,76 \times 10^8$

Linfocitos en alpaca (150mL): $4,14 \times 10^7$



Aislamiento de ARN a partir de linfocitos

Evaluación de ARN obtenido con respecto al número de linfocitos



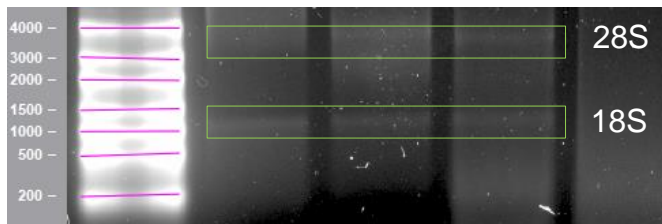
Calidad de ARN

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

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



Integridad de ARN



Gel de agarosa al 2,5%

ImageLab

Obtención de cDNA a partir de ARN (RT)

Cantidad de cDNA obtenido con respecto a diferentes concentraciones de RNA

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

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



ARN > 100ng

Amplificación en la Retrotranscripción



Diseño de cebadores para B-actina y GAPDH

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

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

F: Forward; R: Reverse

Condiciones de un diseño ideal de cebadores

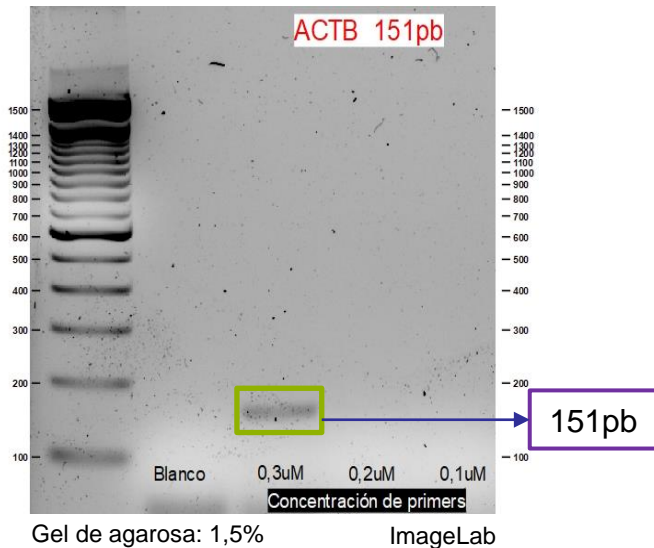
-%GC: 50-55%
-Tm: 60°C
-Amplicón: 130-200 pb
-Cebador: 12-20 pb

Genes constitutivos ACTB-GAPDH en camélidos

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

Optimización de PCR punto final

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



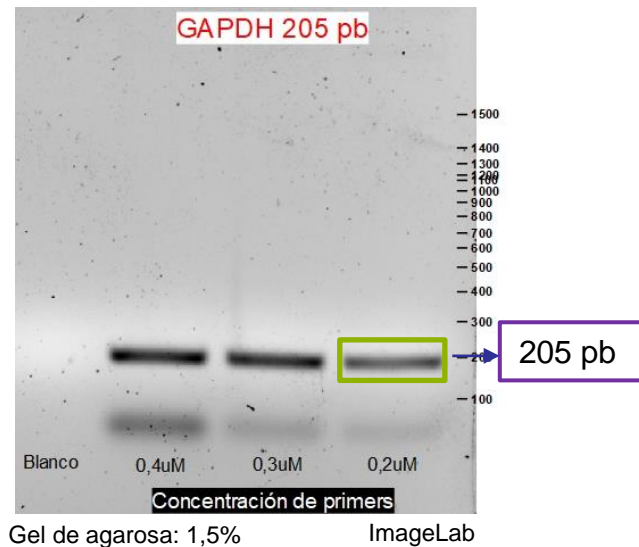
Componentes y concentraciones de PCR de B-actina

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

Temperatura de hibridación: 62°C

Optimización de PCR punto final

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



Componentes y concentraciones de PCR de GAPDH

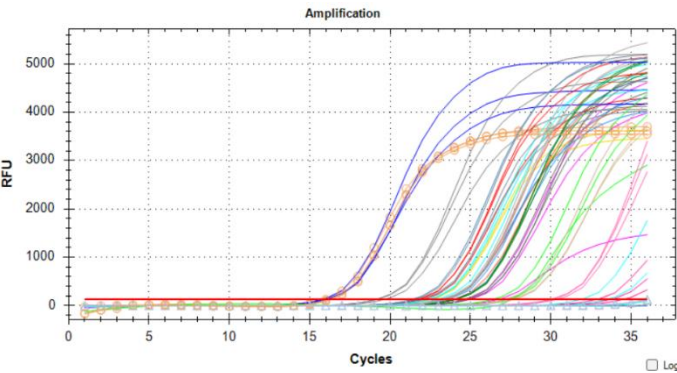
Componentes	Reacción 1X (uL)	Concentración inicial	Concentración final
PCR Buffer	2,5	10X	1X
MgCl ₂	0,75	50 mM	1,5 mM
dNTPS mix	0,5	10mM	0,2 mM
Taq DNA Polimerasa	0,1	5 U/uL	0,02 U/uL
Cebador Forward	0,75	10 uM	0,2 uM
Cebador Reverse	0,75	10 uM	0,2 uM
%DMSO	1,25	-	5%
Agua libre de nucleasas	16,4	-	-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

Temperatura de hibridación: 60°C

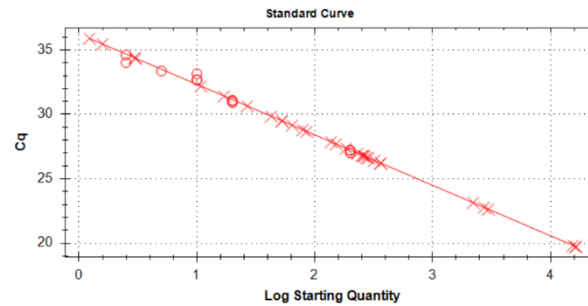
RT-qPCR

GEN B-actina

Curvas de amplificación

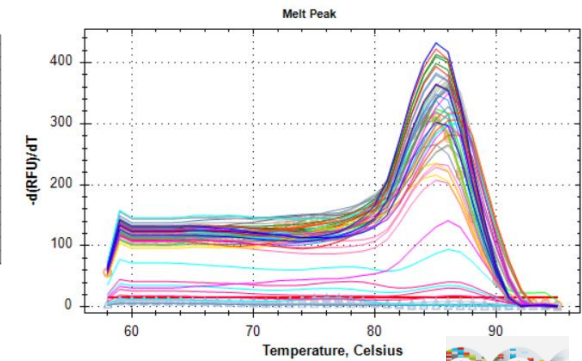


Curva estándar



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

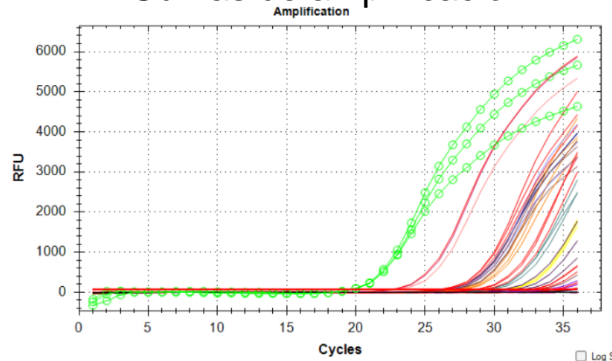
Curvas de Melting



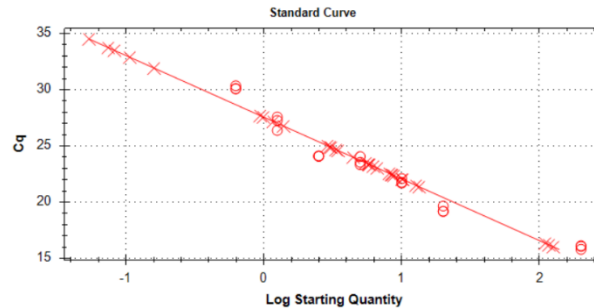
BIORAD-CFX
Maestro

GEN GAPDH

Curvas de amplificación

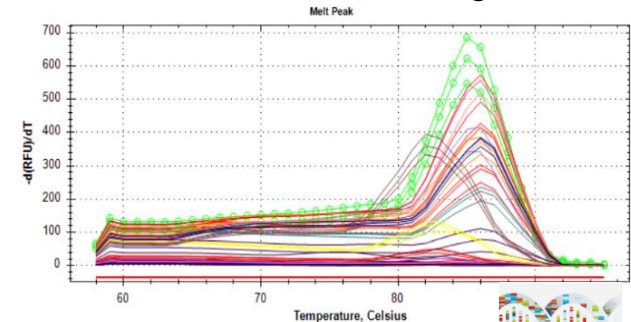


Curva estándar



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

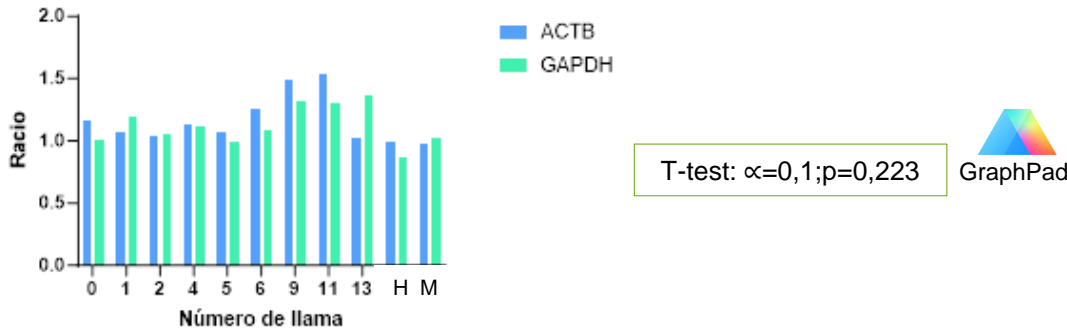
Curvas de Melting



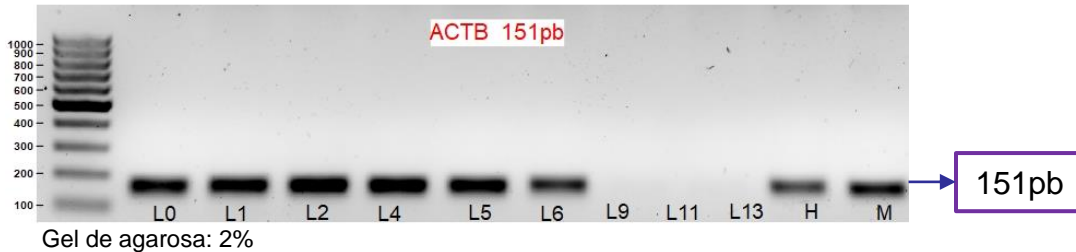
BIORAD-CFX
Maestro

Expresión génica

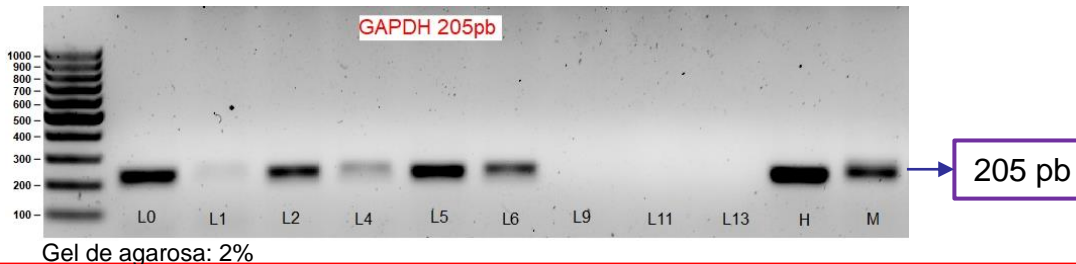
Niveles de expresión del gen B-actina y GAPDH en *Lama glama*



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

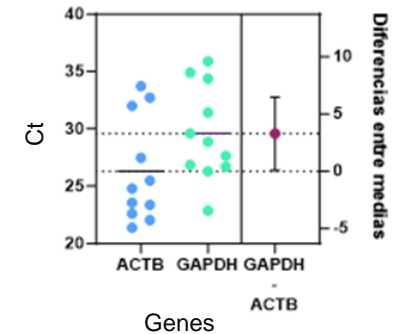


Producto amplificado de qPCR del gen GAPDH en *Lama glama*

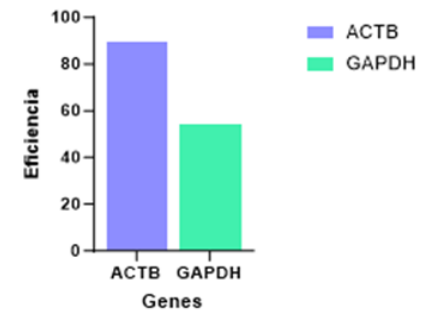


Comparación de genes

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

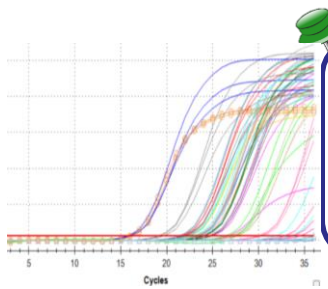
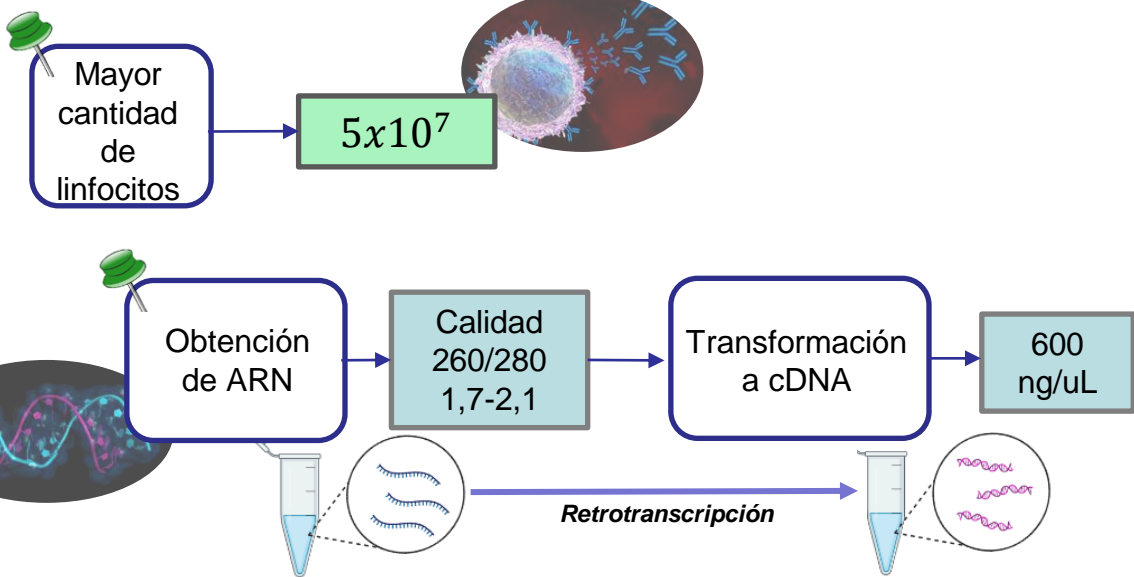


Eficiencia de la curva estándar de de B-actina y GAPDH



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

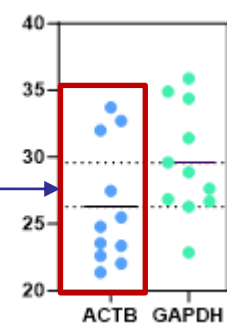
Conclusiones



Evaluación de los niveles de expresión

- Racios: <1
- Ct: 21 a 36

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



B-actina ✓

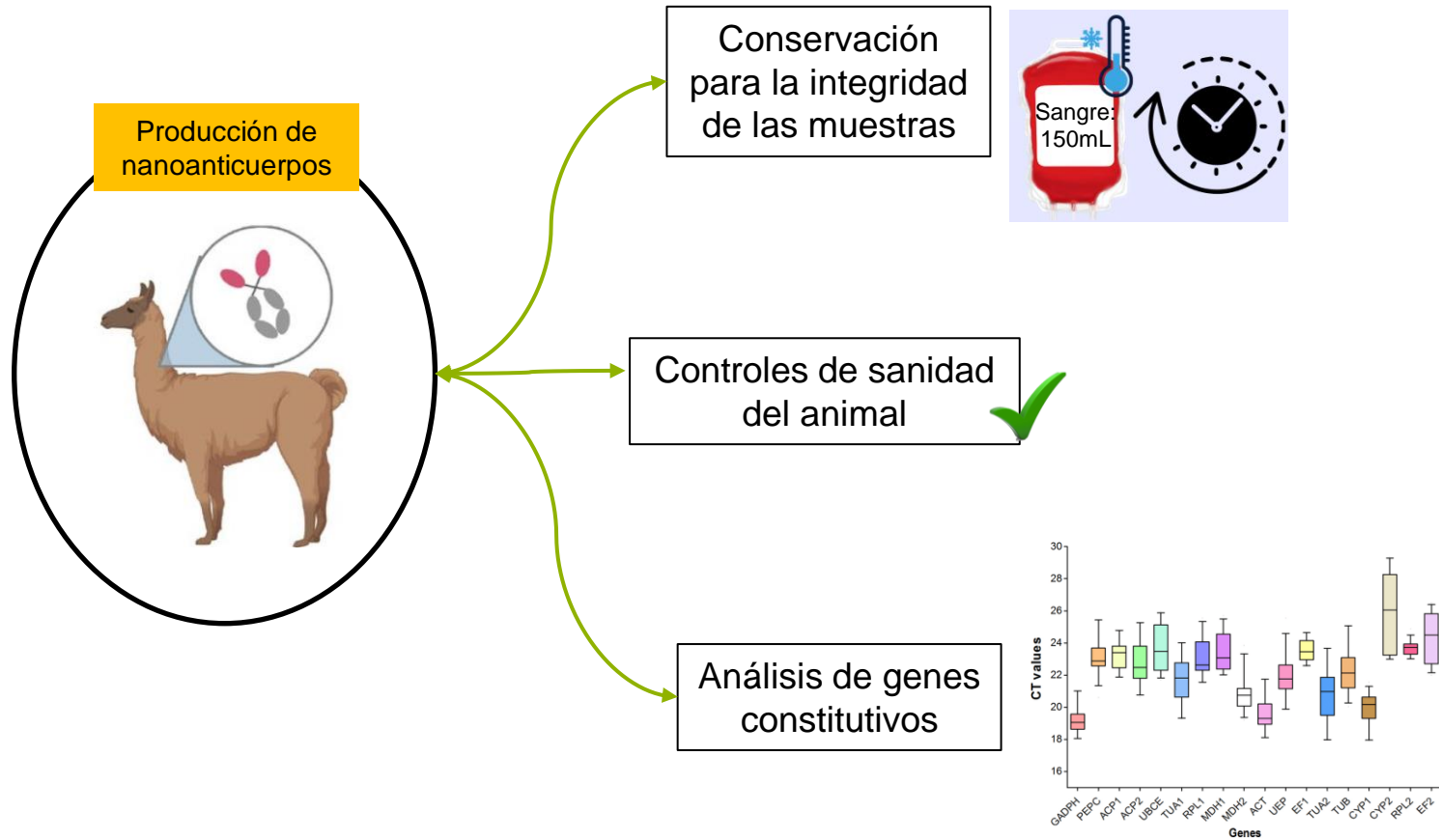
Ciclos tempranos: 21-33

Mayor eficiencia: 90%

Hipótesis ✓

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





Agradecimientos



Marbel Torres Ph. D.

Jorge Ron Ph.D.

Jaqueline Arroyo Ph.D.

Ing. Andrea Aluisa

Ing. Fernanda Toscano

Familiares y amigos

