

18. Determinación de los perfiles transcriptómicos y de regulación post transcripcional asociados con rechazo y aceptación en pacientes trasplantados de riñón

Carlos Andrés Carmona-Agudelo^{1,2}, Cristiam Mauricio Álvarez-Botero^{1,2}

INTRODUCCIÓN

El trasplante renal es el tratamiento de elección para los pacientes con enfermedad renal en etapa terminal. A pesar del constante mejoramiento en el manejo de la inmunosupresión y en la comprensión de los mecanismos inmunes pre y post trasplante, la principal amenaza a la supervivencia del injerto es el rechazo.

La mayoría de protocolos alrededor del mundo implementan el estudio histopatológico de biopsia renal para el diagnóstico de rechazo. No obstante, la biopsia es un procedimiento invasivo que puede comprometer la función del órgano y que está limitado a una alta tasa de error dadas la subjetividad y la variabilidad entre observadores. Lo anterior pone de manifiesto la necesidad de desarrollar herramientas diagnósticas y pronósticas alternas que además de sensibles sean poco invasivas. En el caso del trasplante renal, la orina se ha propuesto como una fuente de biomarcadores que podrían dar cuenta del estado y función del injerto, al tiempo que puede ser una fuente fiable y no invasiva para la comprensión de los mecanismos inmunomoleculares que median el desenlace del órgano.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque desde el primer trasplante renal exitoso en 1954 se empezaron a estudiar y comprender los mecanismos celulares efectores implicados en el rechazo y en la tolerancia del injerto, hasta la fecha, poco se conoce de los mecanismos moleculares que bien podrían estar gobernando los diferentes desenlaces. Aunque se han propuesto genes candidatos y micro RNAs ya sea como biomarcadores o como regula-

dores de los mecanismos efectores de rechazo o tolerancia, aún no se conoce un perfil de expresión génica diferencial asociado a un desenlace. Por otro lado, aunque existen diferentes reportes en los que se implementan muestras no invasivas alternas al tejido renal como es el caso de la orina, su implementación en estudios de expresión génica ha sido limitada, especialmente en metodologías de última generación como la secuenciación del transcriptoma, dada la alta tasa de degradación de los diferentes RNA presentes en esta muestra, lo que contrasta con la alta calidad e integridad del RNA requeridas para la secuenciación.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los perfiles de expresión génica diferencial asociados con rechazo o aceptación en pacientes trasplantados de riñón.

METODOLOGÍA

Grupos de estudio y muestras:

Se incluirán pacientes trasplantados de riñón con rechazo agudo antes y después del tratamiento inmunosupresor, pacientes en rechazo crónico, pacientes en diálisis, pacientes tolerantes o con función estable del injerto por más de diez años e individuos sanos. De todos los individuos se tomarán muestras de sangre periférica (10 mL) y orina (400 mL), excepto de los pacientes en diálisis de quienes solo se tomará muestra de sangre. Adicionalmente, de los pacientes en rechazo se tomarán dos cilindros de biopsia renal. Cada grupo de estudio estará constituido por cuatro individuos.

Estandarización de la extracción de RNA:

Para el proceso de estandarización se implementaron columnas de membranas de sílica y Tri Reagent. Para ambos casos se evaluaron tanto el rendimiento como la calidad del RNA aislado. Posteriormente se evaluó la calidad por electroforesis en gel de agarosa y por electroforesis capilar.

Preparación de librerías de cDNA y secuenciación de RNA:

Para la preparación de librerías se implementará el kit Sure Select RNA Direct. La secuenciación se realizará con NovaSeq6000.

¹ Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Colombia.

² Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Correspondencia: carlos.carmonaa@udea.edu.co

Financiación: Colciencias, Convocatoria 712-2015.

ANÁLISIS DE DATOS

A los datos se les hará un análisis inicial con el fin de eliminar el ruido generado en la secuenciación. Posteriormente se hará un mapeo contra un genoma de referencia, se evaluará la cobertura y se construirán tablas con los genes regulados. Posteriormente, estos datos servirán como insumo para el análisis de expresión diferencial y de categorías funcionales mediante el software R, así como herramientas como Gene Ontology, String e Ingenuity Pathway Analysis.

RESULTADOS PRELIMINARES

Estandarización:

La extracción con columnas de sílica no tuvo buen rendimiento en ninguna de las tres muestras. Además se observó abundante contaminación con DNA genómico y baja calidad. Con la extracción con Tri Reagent se observaron tanto buen rendimiento y calidad como menor contaminación con DNA. No obstante, para las muestras de orina no se observaron valores de integridad (RIN) dentro de los parámetros convencionales por lo que se optó por considerar un parámetro alternativo (DV200).

Preparación de librerías de cDNA:

Se realizó una evaluación piloto para determinar la funcionalidad del RNA extraído con la metodología

seleccionada. El tamaño promedio de las secuencias obtenidas fue de 324 bp y 334 bp para sangre y orina, respectivamente.

DISCUSIÓN

La identificación de mecanismos moleculares implicados en el rechazo y la tolerancia del injerto renal es actualmente un importante tema de investigación. Hasta la fecha, aunque ha habido una amplia exploración, poco se conoce del papel de muestras como la orina, la cuál puede ser una fuente relevante tanto de biomarcadores como de información asociada a los mecanismos inmuno-moleculares implicados en el desenlace del injerto. Dada su naturaleza, la orina se convierte en una muestra poco idónea para la extracción de RNA para tecnologías de nueva generación. Sin embargo, con la adaptación de un protocolo de extracción y la evaluación de los parámetros de calidad e integridad con herramientas alternativas como el DV200, hemos logrado obtener cDNA a partir de RNA de sedimento urinario, para su posterior implementación en secuenciación. Posteriormente, al comparar los perfiles de expresión génica en las diferentes muestras, así como en los diferentes grupos, será posible establecer un perfil de transcriptos asociados a los diferentes desenlaces del injerto, así como las vías de señalización que tienen lugar en el rechazo o la tolerancia.