

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

PUESTA A PUNTO DE UNA METODOLOGÍA MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DE LOS GENES GPR41 Y GPR43 COMO HERRAMIENTA DE DIAGNÓSTICO CLÍNICO E INVESTIGACIÓN

Anadón, María del Rosario LU: 1022496

Klosowski, Federico Andrés LU: 1017839

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Martínez, Alfredo

Laboratorio de análisis clínicos de C.E.M.I.C.

Co-Tutor Interno:

Prada, Federico

Universidad Argentina de la Empresa

FECHA



UADE

**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro más profundo agradecimiento a aquellas personas que nos han ayudado y acompañado en la realización del proyecto final de la carrera.

En primer lugar a nuestro tutor, Alfredo Martínez, por haber confiado en nosotros para la realización del proyecto, tenernos paciencia, permitirnos usar las instalaciones del hospital y por sobre todas las cosas por su gran ayuda y guía.

Agradecemos también a Vanesa Romano por habernos ayudado en la etapa de desarrollo molecular; compartiendo con nosotros sus amplios conocimientos y aportando información sumamente útil. Su colaboración fue de suma importancia para poder completar la etapa final y más importante del trabajo.

Agradecemos a María Teresa Cuello por compartir con nosotros su know-how, facilitarnos el acceso a sus equipos de laboratorio y por sobre todas las cosas su gran afecto y cariño.

Quisiéramos extender nuestra gratitud al Doctor Roberto Prizont, por habernos invitado a trabajar en el proyecto que él comenzó en el Centro de Estudios Médicos e Investigación Clínica (CEMIC), permitiéndonos conocer los datos bibliográficos, su gran dedicación y conocimiento sobre los genes en estudio.

Merecen nuestro agradecimiento también, el servicio de virología (Cristina Videla, Karina Insua, Cristina Juarez, María Ferreyra y Carmen Ricarte), por permitirnos llevar a cabo el trabajo en su laboratorio y toda la colaboración que nos brindaron a todo momento.

Finalmente un agradecimiento especial para nuestras familias por acompañarnos siempre y nunca dejar de motivarnos.

Gracias a todos!!!

“It is in our genes to understand the universe if we can, to keep trying even if we cannot, and to be enchanted by the act of learning all the way.” — Lewis Thomas

“Está en nuestros genes intentar comprender el universo, seguir intentando si no lo logramos y ser encantados por el acto de aprender durante todo el camino” — Lewis Thomas

Índice

Resumen	6
Abstract	8
1. Objetivos	10
2. Introducción.....	11
2.1. Proteínas receptoras acopladas a Proteína G.....	12
2.2. Mecanismo de unión al Ligando.	14
2.3. Mecanismos de transducción de señales.	15
2.3.1. Vía de señalización mediada por AMPc.....	16
2.3.2. Vía de transducción de señal mediada por PIP2.....	17
2.4. Familia de Receptores acoplados a proteína G	18
2.4.1. Receptores de ácido graso libre 2 FFA2/GPR43 y ácido graso libre 3 FFA3/GPR41	19
2.5. Diarreas, tipos-causas-tratamientos.....	21
2.6. La Herramienta molecular: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), parámetros teóricos.	24
2.7. RT-qPCR (Retrotranscripción y PCR cuantitativa en tiempo real). Parámetros experimentales.....	27
2.7.1. Consideraciones conceptuales	28
2.8. Genes en estudio y Gen de referencia	28
2.9. Parámetros a tener en cuenta en el diseño de Primers	29
3. Materiales y Métodos	31
3.1. Obtención y aislamiento de Leucocitos Polimorfonucleares de sangre periférica	31
3.1.1 Extracción y purificación de Polimorfonucleares de sangre periférica: Método Dextrán 6%.....	31
3.1.2 Extracción y purificación de Polimorfonucleares de sangre periférica: Método Ficoll Hypaque	32
3.1.3 Extracción y purificación de Polimorfonucleares de sangre periférica: Método combinado Dextrán – Ficoll Hypaque sedimentación.	33
3.1.4 Evaluación de producto aislado por citometría de Flujo	34
3.1.5 Análisis estadístico de los tres métodos	34
3.2. Extracción de ácidos nucleicos	34

3.3.	Análisis de calidad de los ácidos nucleicos por el método combinado.....	35
3.4.	Reacción de Retrotranscripción (RT).....	35
3.5.	Reacción de PCR de punto final	37
3.6.	Diseño de primers	37
3.7.	Reacción de PCR en tiempo real.....	38
3.7.1.	Estandarización de la reacción de PCR en Tiempo Real.....	41
3.7.2.	Análisis de expresión de GPR41/FFA3 y GPR43/FFA2 en sangre periférica.....	43
3.7.3.	Ensayo de estimulación de GPR41/FFA3 y GPR43/FFA2 con AGCC.	43
4.	Resultados	46
4.1.	Obtención y aislamiento de Leucocitos Polimorfonucleares en sangre periférica	46
4.2.	Obtención de ácidos nucleicos y detección de secuencias mediante PCR de punto final.....	47
4.3.	Evaluación del mejor método de reacción de retrotranscripción (RT)	49
4.4.	Parámetros de la PCR en tiempo real.....	50
4.5.	Estandarización de la PCR en tiempo real	52
4.6.	Análisis de expresión de FFA3/GPR41 y FFA2/GPR43 y ensayo de estimulación con AGCC.	56
5	Discusión de los Resultados	58
6	Conclusiones	62
7	Glosario	63
8	Bibliografía.....	64

Resumen

Los Receptores Ligados a Proteína G (GPCR) son una familia de proteínas de membrana que se caracterizan por su unión a proteínas reguladoras heterotriméricas ligadas a GTP (Proteínas G) y por su capacidad de transducción de señales intracelulares. Estas proteínas también son conocidas como *receptores 7TM* ya que se caracterizan por poseer 7 dominios transmembrana, ampliamente conservados y cruciales en la traducción de la señal desde el medio extracelular hacia el intracelular (Kobilka 2007).

Estos receptores se encuentran presentes en células eucariotas e intervienen en numerosos procesos fisiológicos. Actualmente, al menos un 40% de los fármacos modernos apuntan a esta familia de receptores como blancos terapéuticos. Este trabajo se focaliza sobre 2 receptores de esta familia compuesta por más de 800 genes (Kobilka 2007), la proteína receptora de membrana ligada a proteína G -*GPR41/FFA3*- conocida como *receptor de ácidos grasos 3 ó Free Fatty Acid receptor 3* y la proteína receptora de membrana ligada a proteína G -*GPR43/FFA2*- conocida como *receptor de ácidos grasos 2 ó Free Fatty Acid receptor 2*. Sus nombres se deben a su capacidad de reconocimiento de ácidos grasos de cadena corta (AGCC). La longitud de la cadena de carbonos de estos ácidos grasos es clave para el reconocimiento específico en cada receptor (Ulven 2012).

Estos genes están involucrados en la modulación de varios procesos fisiológicos como la contracción muscular, el reclutamiento de Leucocitos en procesos inflamatorios y la división celular. A su vez, cumplen roles relevantes en enfermedades tales como diabetes, obesidad y síndrome metabólico (Covington et al. 2006). También, estos genes están estrechamente ligados a trastornos hormonales, autoinmunes, digestivos y diversos procesos neoplásicos como el cáncer de colon (Tang et al. 2011). En una amplia serie de trabajos se estudió el rol que cumple GPR43/FFA2 como supresor de tumores, convirtiendo a este gen en un posible blanco terapéutico y reforzando la necesidad de profundizar los estudios para comprender detalladamente su funcionamiento.(Ulven 2012)

El objetivo principal de este trabajo fue el desarrollo de una metodología integral que permita estudiar el comportamiento transcripcional de estos genes en Leucocitos Polimorfonucleares. En el marco de la “Investigación de Moduladores Intrínsecos en la Diarrea Crónica” realizándose actualmente en el Centro de Estudios Médicos e Investigación Clínica (CEMIC), se diseñó y puso a punto una serie de ensayos celulares y moleculares que

permiten evaluar la presencia y expresión de estos genes con fines aplicables a cualquier marco de investigación, ya sea básica o traslacional. Así entonces, este trabajo intenta fijar las bases para realizar un proyecto de investigación, en el cual se avance en el diagnóstico de la Diarrea Crónica de etiología incierta, que hasta el momento por ser una enfermedad multifactorial, puede resultar ser de diagnóstico muy variado y a veces puede ser confundida con una diarrea común, generando un cuadro grave de deshidratación en el paciente. (Diarrea Crónica. Diagnóstico Y Evaluación Clínica 2004).

Como resultado de este trabajo, las herramientas moleculares desarrolladas permitieron verificar que en la población estudiada, los niveles de expresión basal de FFA3/GPR41 y FFA2/GPR43 son similares a los descriptos por la literatura científica, observándose una sobre-expresión de este último respecto al primero. A su vez, los ensayos *in vitro* realizados en este trabajo, sugieren la existencia de algún mecanismo de regulación de la expresión génica de estos receptores mediado por AGCC. Este mecanismo podría convertirse en objeto de estudio, reforzando el foco sobre estos genes como posibles blancos terapéuticos.

Abstract

G Protein-Coupled Receptors (GPCR) are a family of membrane receptor proteins known for their G-Protein binding capacity and intracellular molecular signalling transduction. These proteins are also known as 7TM receptor due to their 7 widely conserved transmembrane domains which are critical for the extracellular to intracellular medium signaling transduction (Kobilka 2007).

These receptors are only found in eukaryotic cells and they are involved in a large number of physiological processes. Nowadays, more than de 40% of new drugs aimed this protein families as therapeutic targets. This work focuses on two receptors belong a big protein family that includes more than 800 genes (Kobilka 2007), the G protein-coupled receptor (GPR41/FFA3) known as the free fatty acid receptor 3 and the G protein-coupled receptor (GPR43/FFA2) known as the free fatty acid receptor 2. Their names are after their ability to recognize short-chain fatty acids (SCFA) as a ligand, the length of the fatty acid carbon chain is key for the recognition of each receptor (Le Poul et al. 2003).

These genes are involved in several physiological modulation processes such as muscle contraction, leukocyte recruitment in inflammatory response, cell division and they have relevant roles in metabolic diseases such as diabetes, obesity and metabolic syndrome (Covington et al. 2006). Also, these genes are closely linked to hormonal, autoimmune and digestive disorders; as well as many neoplastic processes such as Colorectal Cancer. The literature, it is believed that G protein-coupled receptor (GPR43/FFA2) plays an important role as a tumour suppressor.

The Aim of this work consist in the development of an integral methodology that allows to study the transcriptional behaviour of these genes in Polimorfonuclear Leukocytes. As part of the project “Research in Intrinsic Modulators of Chronic Diarrhea” currently being performed at *Centro de Estudios Médicos e Investigación Clínica* (CEMIC), a series of cellular and molecular assays were designed and fine-tuned to evaluate the level of expression of this genes as well as the analysis of both sequences within the ligand binding site, being these assays applicable to any research, basic or translational, linked to those genes. Thus allowing this work to lay the groundwork for the continuation of this project and to advance in the diagnosis of Chronic Diarrhea, a multifactorial disease witch has different diagnostics for the same illness (Diarrea Crónica. Diagnóstico Y Evaluación Clínica 2004).

As a result of this work, the molecular tools implemented allowed to verify, that within the studied population, the levels of basal expression of FFA3 / GPR41 and FFA2 / GPR43 are similar to those described in scientific literature, with an overexpression of the latter in relation to the first. In turn, *in vitro* assays carried out in this work, suggest the existence of a regulation mechanism of the gene expression for these receptors mediated by SCFA. Such mechanism could become a subject of study, highlighting these genes as possible therapeutic targets.

1. Objetivos

El objetivo principal es el desarrollar de una metodología integral que permita estudiar el comportamiento transcripcional de los receptores de membrana asociados a proteína G *FFA3/GPR41* y *FFA2/GPR43* en Leucocitos Polimorfonucleares.

El objetivo secundario es el diseñar y poner a punto una serie de ensayos celulares y moleculares que permitan evaluar la presencia, estructura y expresión de estos genes con fines aplicables a cualquier marco de investigación, ya sea básica o traslacional.

El cumplimiento de dichos objetivos permite fijar las bases teorico-prácticas para realizar un proyecto de investigación, en el cual se avance en el diagnóstico de la Diarrea Crónica de etiología incierta.

2. Introducción.

Los receptores ligados a proteína G (GPCR) son una familia de proteínas transmembrana que al reconocer moléculas extracelulares, denominadas Ligandos, pueden activar su proteína G asociada generando una cascada de señales intracelulares que culminan en una respuesta celular. Estas proteínas también son conocidas como receptores 7TM ya que se caracterizan por poseer 7 dominios transmembrana ampliamente conservados y críticos en la traducción de la señal desde el medio extracelular hacia el intracelular. Los Ligandos son muy diversos, pueden ir desde iones o moléculas pequeñas hasta grandes proteínas, cada uno de los cuales con un mismo receptor genera diferentes tipos de señales (Kobilka 2007) .

Dentro de este conjunto de receptores se encuentran la proteína receptora de membrana ligada a proteína G (GPR41/FFA3), también conocida como receptor de ácidos grasos 3, y la proteína receptora de membrana ligada a proteína G (GPR43/FFA2), también conocida como receptor de ácidos grasos 2, las cuales son objetivos de evaluación en este trabajo. Estas proteínas se expresan en varios tejidos, siendo el de mayor nivel de expresión de la primera (GPR41/FFA3) el tejido adiposo (Brown et al. 2003), y la expresión de la GPR43/FFA2 se encuentra principalmente en células de sangre periférica tales como células mononucleares y células polimorfonucleares (PMN) teniendo su mayor nivel de expresión en Neutrófilos (Ulven 2012). Estas proteínas son receptores de AGCC y su unión a dichos Ligandos desencadena una cascada de señalización. Dichos AGCC suelen producirse naturalmente como subproductos del metabolismo de la flora microbiana del cuerpo humano.

Los Leucocitos Polimorfonucleares (PMN) son un tipo de célula fagocítica del sistema inmune. Durante los procesos inflamatorios, estas células son unas de las primeras en migrar a la zona de inflamación y desencadenar una respuesta inmunológica. Los PMN son de suma importancia para el mantenimiento de la homeostasis intestinal, la defensa contra microbios no deseables, el reclutamiento de otras células del sistema inmune y la reparación de la mucosa intestinal (Fournier and Parkos 2012). Un desbalance en el reclutamiento de los mismos durante un proceso de inflamación intestinal puede resultar en serios daños a este tejido (Ferreira et al. 2014 ; Ulven 2012 ; Sina et al. 2009). La existencia de fuertes evidencias científicas de que el reclutamiento de PMN durante la inflamación intestinal es mediado por estos receptores de AGCC, hace que los PMN sean el tejido de estudio seleccionado para este trabajo (Le Poul et al. 2003; Vinolo et al. 2011)

Como paso previo a la puesta a punto de la técnica de RT-PCR, se confirmó mediante PCR de punto final la presencia de estos genes en los individuos evaluados. Para ello se desarrolló un método combinado de extracción de PMN utilizando sedimentación en Dextrán y Ficoll Hypaque. A fin de cumplir con los objetivos de este trabajo, se procedió a validar estas técnicas, fijando las bases de futuras investigaciones relacionadas a la búsqueda de tratamientos específicos para dichas patologías, en las que se cree que estos receptores están involucrados.

2.1. Proteínas receptoras acopladas a Proteína G.

Los receptores acoplados a proteína G son el grupo de receptores celulares más grande que existe, hay más de 800 genes en el genoma humano que codifican para la expresión de estas proteínas. Las GPCR se caracterizan por estar unidas a una proteína G que se encuentra del lado interno de la membrana celular, la cual se activa cuando, en el lado externo de la membrana celular, el Ligando se une al receptor. La interacción receptor-ligando genera una transducción de señales por medio de segundos mensajeros (AMPc, Ca²⁺) que culmina en una respuesta fisiológica.

Estos receptores también llamados receptores 7TM muestran una estructura común con siete dominios transmembrana, el extremo amino-terminal se encuentra en el exterior de la célula, mientras que el carboxilo-terminal se encuentra en la región citoplasmática. Las zonas variables específicas de los distintos receptores, suelen localizarse en el extremo amino-terminal, que es el responsable del reconocimiento del Ligando, esta variabilidad caracteriza a cada subgrupo dentro de esta familia de proteínas. También existen zonas variables en el extremo carboxilo-terminal y en los anillos (loops) intracelulares, que conectan los segmentos transmembrana. (Figura 1)

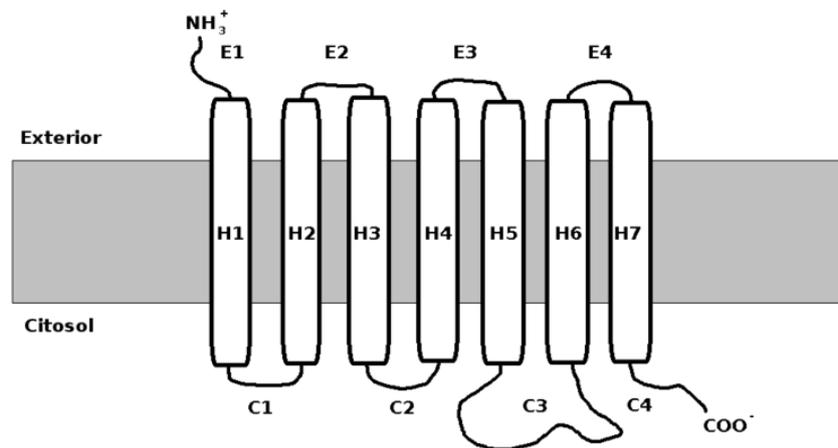


Figura 1: Diagrama de los receptores ligados a la proteína G. (Araç et al. 2012)

Las proteínas G son moléculas heterotriméricas, constituidas por una subunidad α con actividad GTPasa, es decir que es capaz de hidrolizar Guanosín trifosfato (GTP), y dos subunidades dimerizadas β y γ . En el proceso de activación de la proteína G el dímero $\beta\gamma$ se desacopla de la subunidad α . El desacoplamiento permite que el GTP se hidrolice en Guanosín difosfato (GDP) y Pirofosfato (Pi), de esta manera la subunidad α se desactiva, y se une nuevamente a $\beta\gamma$. Con el heterotrímero α - $\beta\gamma$ formado nuevamente, la proteína G está disponible para un nuevo ciclo de activación. Existen distintos tipos de proteínas G, estos están definidos por la combinación de las distintas isoformas de subunidades existentes (MedicinABC - 2012). (Figura 2)

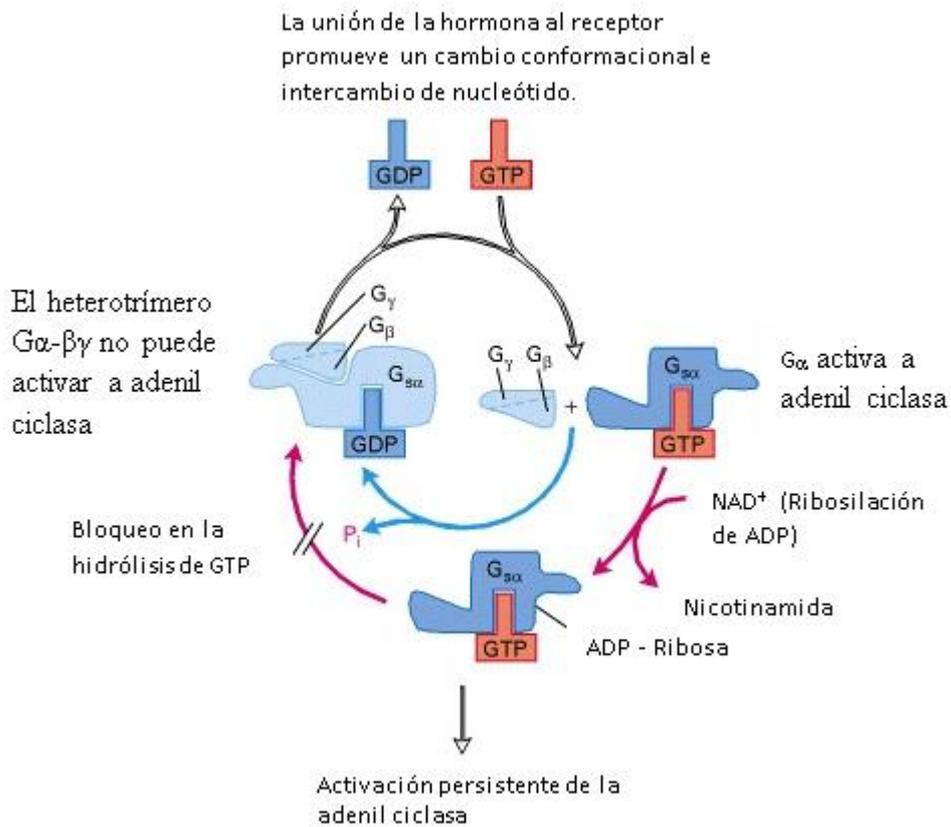


Figura 2: Ciclo de activación y desactivación de la Proteína G luego de recibir la señal del receptor una vez unido al Ligando. Imagen modificada, traducida del idioma original (Lodish et al. 2000).

2.2. Mecanismo de unión al Ligando.

Esta familia de receptores reconoce una gran variedad de Ligandos. El receptor al interactuar con el ligando, produce una serie de cambios conformacionales que activan a la Proteína G, la cual se encuentra en equilibrio, unida a su extremo carboxilo terminal. Como se describió anteriormente, la Proteína G desacopla el dímero $\beta\gamma$ y se activa, generando una respuesta fisiológica por medio de la producción de segundos mensajeros. (Figura 3)

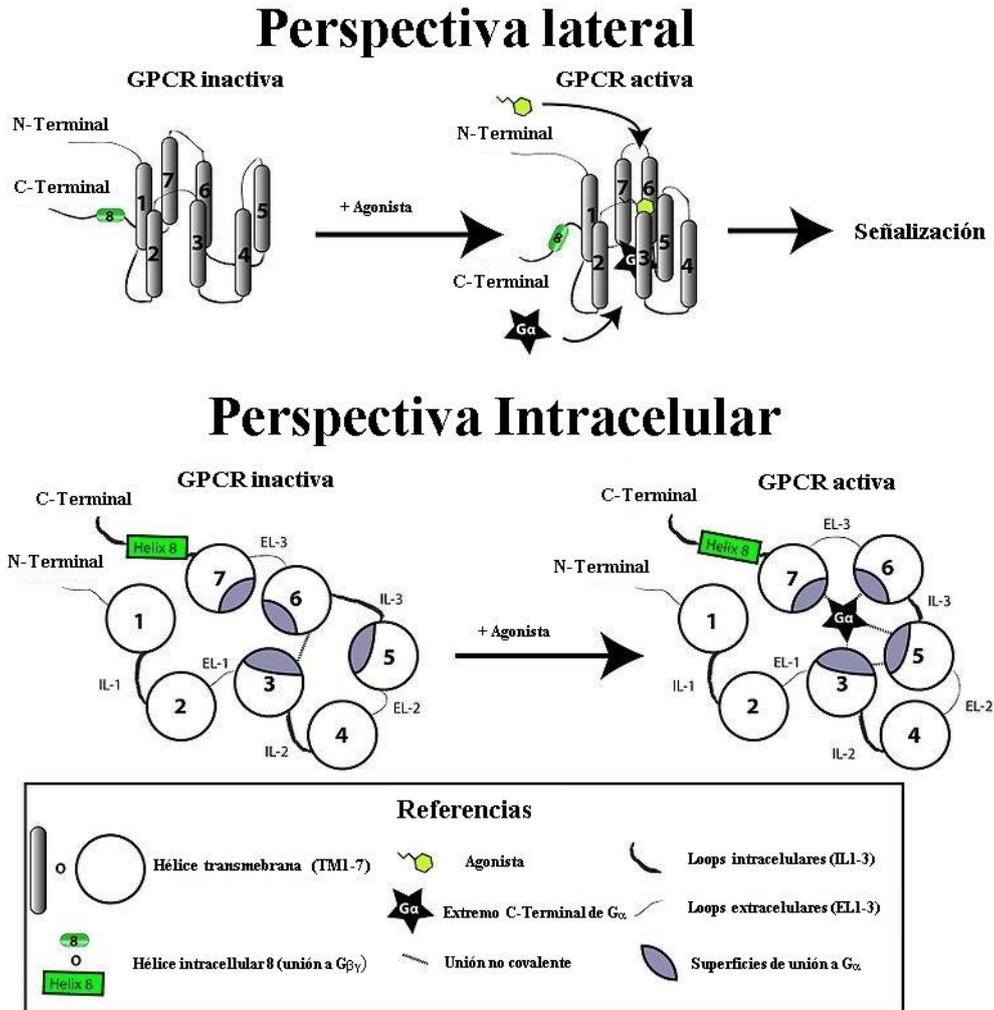


Figura 3: Mecanismo de activación/desactivación de los receptores acoplados a Proteína G. Imagen modificada, traducida del idioma original (Millar and Newton 2010)

2.3. Mecanismos de transducción de señales.

Al activarse una Proteína G se desencadenan dos vías de señalización intracelular, la primera es la vía de señalización ligada a Adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y la segunda es la vía de señalización por medio de Fosfatidil Inositol 4,5-bisfosfato (PIP2). (Figura 4)

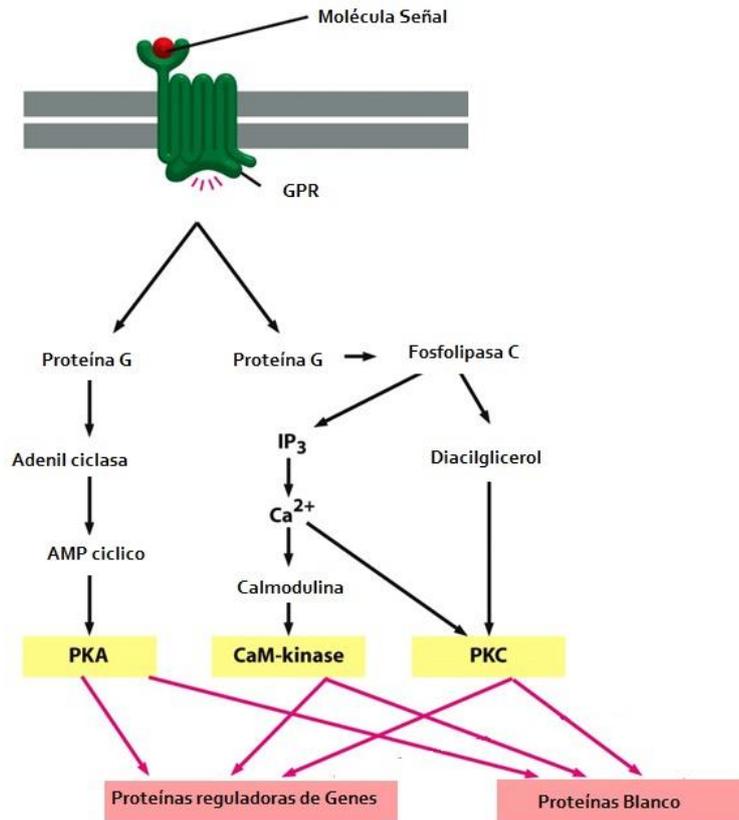


Figura 4: Las dos vías de traducción de señales luego de la activación de la proteína G. Imagen modificada, traducida del idioma original (Alberts et al. 2002)

2.3.1. Vía de señalización mediada por AMPc

Al activarse la proteína G, producto de la interacción GPCR-Ligando, la subunidad $\beta\gamma$ interactúa con la enzima Adenilato ciclasa, la cual cataliza la producción de AMPc a partir de Adenosín trifosfato (ATP). Esto da lugar a la activación de la proteína quinasa dependiente del AMPc o proteína-quinasa A (PKA) y por consiguiente a la fosforilación de sus proteínas diana, generando así una cascada de señalización dentro de la célula (Araç et al. 2012). Esta vía se encuentra en equilibrio constante, la forma inactiva de la proteína G inhibe a la Adelinato ciclasa, reduciendo de ésta manera los niveles de AMPc intracelular. (Figura 5).

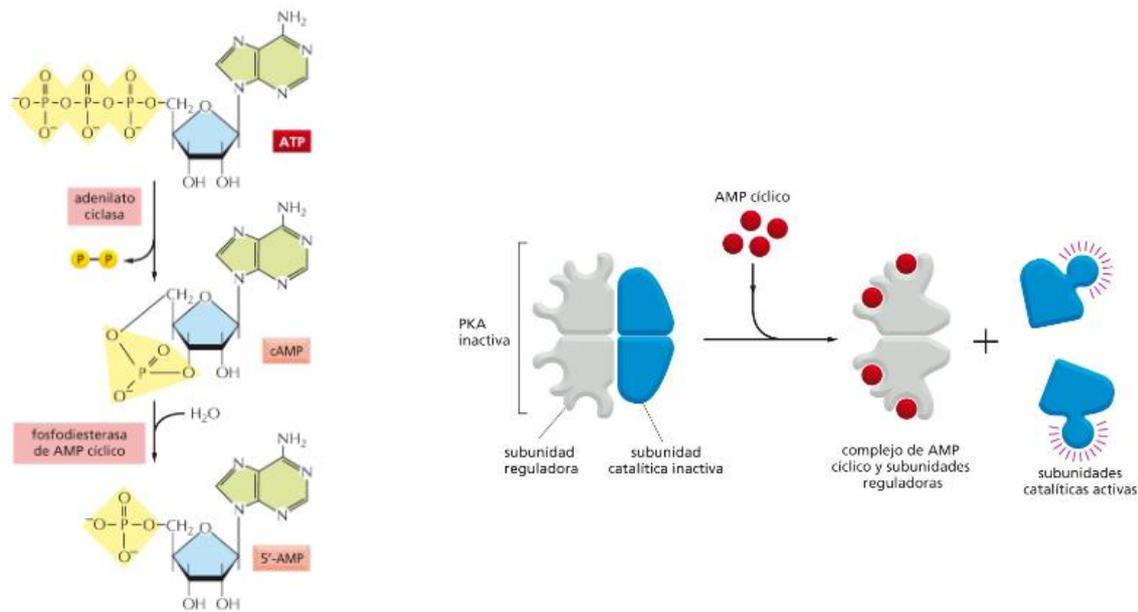


Figura 5: Síntesis y degradación del AMPc, y activación de la proteína quinasa A dependiente de AMPc (PKA) (Alberts et al. 2002)

2.3.2. Vía de transducción de señal mediada por PIP2

La transducción de señales mediada por PIP₂ se inicia tras la activación de la proteína G, mientras las subunidades βγ intervienen en la vía del AMPc, la subunidad α tiene la capacidad de activar a la enzima Fosfolipasa C, específica de Fosfoinosítoles. Esta enzima al activarse degrada el PIP₂ generando dos productos, Inositol trisfosfato (IP₃) y Diacilglicerol (DAG); los cuales generan dos cascadas de señalización paralelas dentro de la célula.

El IP₃ se une a canales de calcio (Ca²⁺) del Retículo endoplasmático (RE), induciendo la apertura de éstos, aumentando así el nivel intracelular de Ca²⁺, el cual participa en la regulación de varios procesos celulares.

El DAG es un factor de activación de la proteína de membrana quinasa C (PKC) dependiente de Ca²⁺. El incremento de la concentración de Ca²⁺ citoplasmático mediado por IP₃ junto DAG permite la activación de PKC, la cual regula factores de transcripción fosforilando sus residuos de Serina y Treonina.

Este mecanismo se encuentra en equilibrio constante, las bombas de Ca²⁺ del RE reducen la concentración citoplasmática de éste, debido a esto PKC se inactiva y cambia el estado de fosforilación en los factores de transcripción mencionados previamente, tal como se observa en la Figura 6.

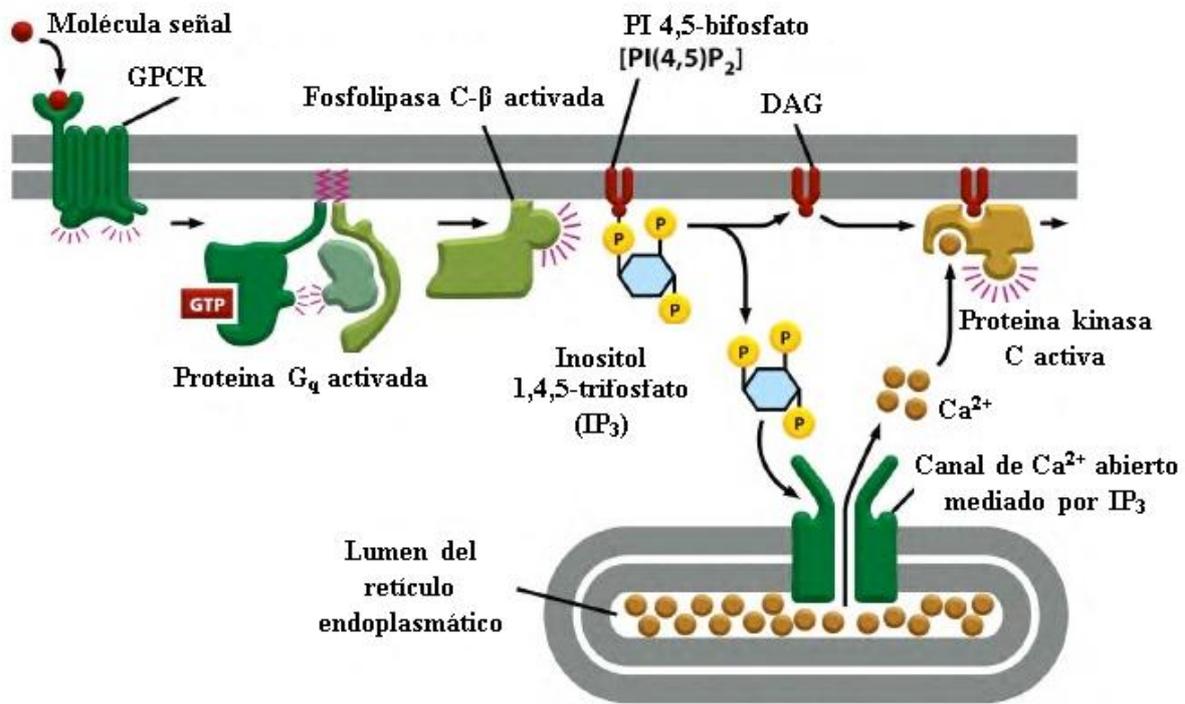


Figura 6: Vía de transducción de señales mediada por PIP₂. Imagen modificada, traducida de idioma original (Alberts et al. 2002)

2.4. Familia de Receptores acoplados a proteína G

Existen más de 800 genes que codifican a receptores ligados a proteínas G, los cuales se clasifican en 6 grupos diferentes:

- Clase A (o 1) (Simil-Rhodopsina)
- Clase B (o 2) (Familia de receptores de secretina)
- Clase C (o 3) (Glutamato metabotrópico/feromona)
- Clase D (o 4) (Receptores de reproducción fúngica)
- Clase E (o 5) (Receptores de cAMP)
- Clase F (o 6) (Frizzled/Smoothened)

Dentro del Grupo A se encuentran los receptores de ácidos grasos libres (AGL), entre los cuales se encuentran los genes estudiados en este trabajo. Estos receptores se activan de forma endógena por ácidos grasos libres de diferentes longitudes de cadena. Este grupo incluye a los receptores de ácido graso 1 (FFA1) también conocidos como GPR40, los cuales tienen afinidad por los ácidos grasos de cadena larga (más de 12 átomos de carbono de

longitud). También encontramos el receptor de ácido graso libre 2 (FFA2/ GPR43) y el receptor de ácido graso libre 3 (FFA3/ GPR41). Ambos receptores son capaces de reconocer AGCC (menos de 5 átomos de carbono de longitud).

2.4.1. Receptores de ácido graso libre 2 FFA2/GPR43 y ácido graso libre 3 FFA3/GPR41

El receptor de ácido graso libre 2 presenta fuerte expresión en varios tejidos, incluyendo el tejido adiposo, células mediadoras de procesos inflamatorios y el tracto gastrointestinal (Bindels, Dewulf, and Delzenne 2013). Sin embargo, el mismo se expresa mayoritariamente en las células del sistema inmune, puntualmente en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células polimorfonucleares (PMN), expresándose con mayor intensidad en Neutrófilos (Brown et al. 2003; Le Poul et al. 2003). Diversos Estudios demostraron que este receptor media los efectos que los AGCC producen en los Neutrófilos (Le Poul et al. 2003).

Estudios más recientes sugieren que la expresión del receptor en células de cáncer de colon, se reduce o se pierde (Tang, Chen, Jiang, Robbins, & Nie, 2011). A su vez se cree que la ausencia de expresión del receptor puede inducir apoptosis, actuando de esta manera como un gen supresor de tumor (Ulven 2012).

Se cree que este receptor cumple un rol crítico en la regulación energética del organismo, el cual responde a las concentraciones de AGCC producidos por la microbiota intestinal. Si bien, actualmente no se comprende la totalidad del mecanismo de regulación de este receptor, estudios indican que esta actividad regulatoria podría convertir a FFA2/GPR43 en un posible blanco terapéutico para el tratamiento de enfermedades metabólicas, que hasta el momento no poseen tratamientos efectivos (Kimura et al. 2014).

Hay fuertes evidencias de que la estimulación de FFA2/GPR43 con AGCC es necesaria para normal funcionamiento del sistema inmunológico. Estudios realizados en el año 2012, revelaron que ratones knockout para FFA2/GPR43 (GPR^{-/-}), que no expresan el gen, padecían una exacerbada respuesta inflamatoria cuando los mismos presentaban colitis, asma o artritis. Esto indicaría que la proteína FFA2/GPR43 podría actuar como mediador del reclutamiento de células del sistema inmune y de su normal funcionamiento, también actuaría como regulador de la producción de células moduladoras de la respuesta inflamatoria (Maslowski et al. 2009).

Los receptores FFA3/GPR41 se pueden encontrar expresados en varios tejidos y órganos, entre los cuales está incluido el páncreas, células mononucleares, tejido nervioso y el tejido adiposo, teniendo mayores niveles de expresión en este último (Brown et al. 2003).

Mientras que FFA2/GPR43 cumple mayoritariamente un rol como regulador metabólico, FFA3/GPR41 produce principalmente, respuestas de tipo secretoras. La activación de FFA3/GPR41 en colon promueve la secreción de bicarbonato, ayudando a prevenir gastroenteropatías causadas por drogas antiinflamatorias no esteroideas (AINES)(Said et al. 2016). Estudios sugieren que la estimulación de FFA3/GPR41 promueve la liberación de la hormona de apetito conocida como Péptido YY y como consecuencia produce un aumento de la motilidad intestinal (Samuel et al. 2008). Se ha observado que, tanto los AGCC como también los cuerpos cetónicos, estimulan a los receptores FFA3/GPR41 presentes en ganglios simpáticos, actuando de ésta manera como reguladores del sistema nervioso simpático (Samuel et al. 2008).

La reducción en la expresión de estos receptores se encuentra asociada, a su vez, con un aumento en la secreción de insulina y una mayor tolerancia a la glucosa en la diabetes de tipo II, convirtiéndolos en dos potenciales blancos terapéuticos (Tang et al. 2015).

Estudios de mutagénesis dirigida describen que entre los dominios transmembrana presentes en los receptores, los 5 y 7 son clave para el reconocimiento de los AGCC (Figura 7). Esto es un gran avance en el estudio de estos receptores y su rol como posibles blancos terapéuticos. Se pudo determinar que mutaciones puntuales en los aminoácidos Arg180, His242 y Arg225 impiden que estos dos receptores reconozcan a los AGCC (Ulven 2012).

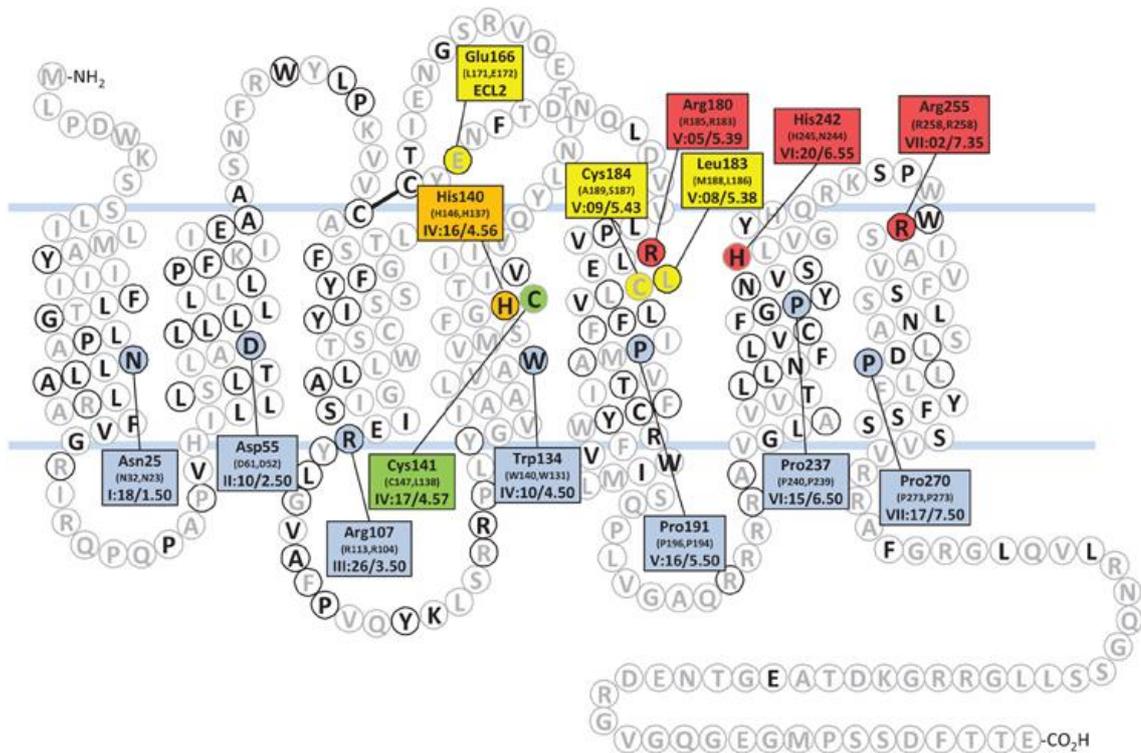


Figura 7: Descripción de la proteína FFA2/GPR43, donde en negro se muestran los aminoácidos que se conservan entre los dos receptores en estudio (FFA3/GPR41 y FFA2/GPR43). Los aminoácidos en color azul son los conservados en todos los receptores pertenecientes a la Clase A (o 1) (Simil-Rhodopsina). Las dos Argininas y la Histidina críticas para el reconocimiento de AGCC en FFA2 (R180, H242, R255) y FFA3 (R185, H245, R258) se encuentran indicadas en color rojo. Una segunda Histidina relevante en el reconocimiento de AGCC en FFA2 (H140) y en FFA3 (H146) se detalla en color naranja. (Ulven 2012)

2.5. Diarreas, tipos-causas-tratamientos

La diarrea es la evacuación intestinal de heces livianas y líquidas. Esta puede durar más de 4 días, pasando de ser aguda a crónica dependiendo de su frecuencia. Al evacuar alimentos que no han sido procesados por los intestinos, se pueden perder nutrientes importantes para el cuerpo. Esta evacuación puede llegar a presentar sangre o pus. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la diarrea aguda tiene una duración menor de 2 semanas («WHO | Diarrhoealdisease», s. f.). Estas normalmente se deben a un proceso viral, aunque a veces se puede deber a la ingesta de medicamentos, como antibióticos ó fármacos que contienen magnesio. Así mismo la causa puede deberse también a cualquier cambio en la alimentación, ya sea por contaminación con alguna bacteria o cambios en la dieta diaria con la ingesta de alimentos difíciles de absorber por el organismo. La mayoría de estos eventos se

resuelven rápido, sin terapia, y modificando la dieta diaria (Enfermedades Diarréicas | ACG Patients n.d.).

La diarrea crónica tiene una frecuencia mayor a 4 semanas (Abdullah and Firmansyah 2013). Múltiples causas desencadenan la diarrea aunque es importante remarcar que la condición del paciente puede predisponer el desarrollo de esta patología. Los inmunocomprometidos tienen una mayor predisposición a presentar diarreas crónicas. El diagnóstico requiere frecuentemente diversos métodos (Diarrea Crónica. Diagnóstico Y Evaluación Clínica 2004), entre los cuales están los inmunoensayos para descartar por ejemplo, la enfermedad celíaca ó enfermedades autoinmunes, además se dispone también de pruebas para el estudio de los heces en búsqueda de parásitos o microorganismos, que provoquen la misma. Existen también algunos marcadores no invasivos de inflamación como la caloproteína, producida por Leucocitos. Su nivel en heces es un indicio del grado de inflamación intestinal (Erbayrak et al. 2009). Otro de los exámenes que se realizan para el diagnóstico y sospecha de una enfermedad inflamatoria intestinal es la colonoscopia con biopsia de la mucosa de colon, esto permite descartar las lesiones macroscópicas que se manifiestan en algunas enfermedades, tales como la enfermedad de Crohn. La evaluación macroscópica de las lesiones colaboran al diagnóstico diferencial pero no es suficiente para descartar una enfermedad inflamatoria de colon, por eso se realiza una biopsia para estudiar las características histológicas de la lesión, que definen el diagnóstico a la vez que permite conocer la variedad microscópica de dicha enfermedad.

Existe una afección inflamatoria microscópica importante: colitis microscópica, la cual según estudios demográficos en diferentes países ha aumentado constante y persistentemente en las últimas décadas (Pardi and Kelly 2011). Los síntomas de la misma son inespecíficos y sin los estudios adecuados puede confundirse con colon irritable, ya que diferentes estudios realizados han demostrado que 35%-50% de las colitis microscópicas comparten síntomas clínicos similares, con colon irritable (Limsui et al. 2007). La distinción de una u otra es importante, porque si bien el colon irritable no tiene un tratamiento específico, la colitis microscópica sí; mediante la administración oral de budesonida en la mayoría de los casos.

Existe un elemento pato-fisiológico importante de todas las diarreas que es la alteración de la microbiota del colon con un aumento de la motilidad y peristalsis intestinal. En el contenido del colon se encuentra una enorme población de colonias microbianas que sobreviven en un ambiente libre de oxígeno ó estrictamente anaeróbico. Con los modernos

sistemas de microbiología molecular, se han logrado identificar más de 1000 cepas ó filo-tipos bacterianos, agrupados en 2 grandes filo-tipo taxonómicos: Bacteroides y Fumicutes. Estos dos filo-tipos representan más del 90% de la microbiota colónica (Qin et al. 2010). Cada grupo de filo-tipo cumple funciones específicas, por ejemplo, los Bacteroides consumen la fibra de la dieta. Para desdoblar los polisacáridos complejos de la celulosa producen y segregan fermentos ó enzimas hidrolíticas llamadas glucosidasas. De esta acción hidrolítica obtienen carbonos para su supervivencia (Prizont and Konigsberg 1981). Como resultado de esta acción hidrolítica se originan azúcares simples que a su vez son fermentados en AGCC, tales como lo son en concentración descendente: el ácido acético, propiónico, butírico, etc (Cummins 1981). Aunque estos ácidos tienen algunas acciones favorables para la célula del colon, el rol que tienen estos AGCC en la fisiología normal del colon y en la fisiopatología de síntomas del colon irritable no ha sido aclarado todavía.

Trabajos publicados en el año 2003 reportaron que los receptores FFA3/GPR41 y FFA2/GPR43 son estimulados por AGCC (Brown et al. 2003; Le Poul et al. 2003). Por medio de métodos histoquímicos e inmunoquímicos, se detectó la presencia de éstos genes en las células entero-endocrinas de la mucosa y en los mastocitos de la submucosa de segmentos de colon de humanos y de rata (Karakı et al. 2008; Karaki et al. 2006). En estudios con fibras musculares de colon de rata, estos investigadores demostraron que la estimulación con ácido propiónico del receptor FFA2/GPR43, estimula la frecuencia de las contracciones de las fibras musculares circulares y longitudinales del colon, mientras que la irrigación con el ácido acético disminuía estas contracciones (Tazoe et al. 2008). Estudios similares, *in vitro*, demostraron que la actividad moduladora de las fibras nerviosas sobre la musculatura del intestino de la rata, se efectuaba por medio de la interacción de los AGCC con FFA2/GPR43 (Dass et al. 2007). Estos hallazgos son relevantes porque gran parte de los AGCC producidos por la microbiota del colon y contenidos en la luz colónica, son absorbidos y transportados por las células de la mucosa de este órgano en dirección a la circulación sanguínea que lo rodea. La acción moduladora sobre la musculatura del colon, producto de la interacción entre los AGCC y sus receptores, produce un aumento de la peristálsis intestinal, volviéndose relevante en la fisiopatología de la diarrea crónica.

2.6. La Herramienta molecular: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), parámetros teóricos.

En la PCR de punto final, tal como su nombre lo indica, se detecta la presencia de la secuencia de ADN deseada cuando la reacción finaliza por depleción de reactivos. Esto ocurre durante una etapa denominada Plateau. Por lo tanto, en una PCR tradicional o de punto final, solo podemos ver la presencia o ausencia del gen de interés por medio de un gel de agarosa una vez finalizada la reacción.

Una variante de la PCR antes mencionada es la PCR en tiempo real (qPCR). Esta reacción, tal como su nombre lo indica, realiza mediciones en tiempo real durante la fase exponencial (Thermo Fisher Scientific n.d.) (Figura 8). Esta metodología tiene como ventaja una alta especificidad, sensibilidad y precisión, ya que permite monitorear la reacción de amplificación de ADN en tiempo real. Esta técnica combina la amplificación y la detección en un único paso, esto lo hace correlacionando las mediciones de fluorescencia realizadas en cada ciclo con una cantidad determinada de ADN.

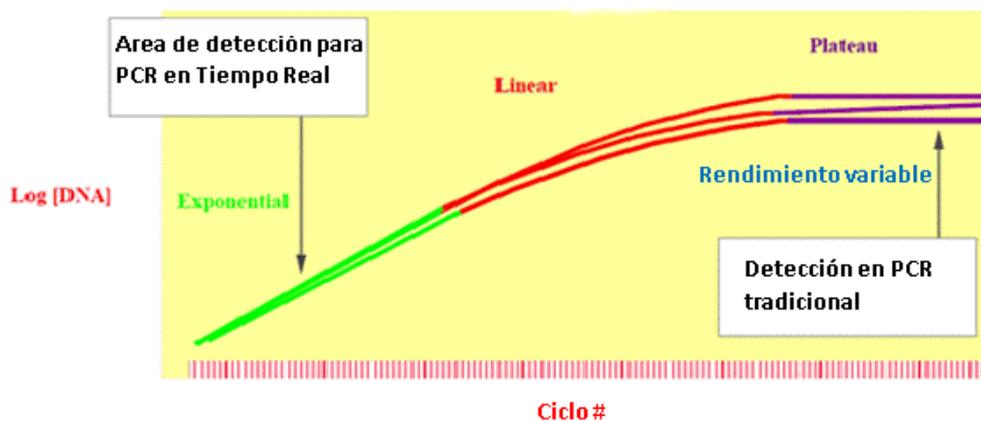


Figura 8: Distintas etapas de la reacción en cadena de la polimerasa. Imagen modificada, traducida de idioma original (Thermo Fisher Scientific n.d.).

Los fluoróforos se dividen en dos grandes grupos, sondas específicas y fluoróforos con afinidad a las Hebras de ADN o intercalantes. Estos últimos son los utilizados en este trabajo; son fluoróforos que emiten fluorescencia cuando se unen al ADN. La intensidad de la misma es directamente proporcional a la concentración de ADN de doble cadena presente en la muestra. En las primeras qPCR se utilizaba Bromuro de Etidio (fuerte intercalante de ADN), eventualmente se dejó de emplear porque no discrimina de manera eficiente el ADN de doble cadena (dsADN) del de simple cadena (ssADN). El intercalante más utilizado en la actualidad

es el SYBR Green, este se une al surco menor de la molécula de dsADN. La intensidad de la fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de dsADN presente en la reacción. (Figura 9).

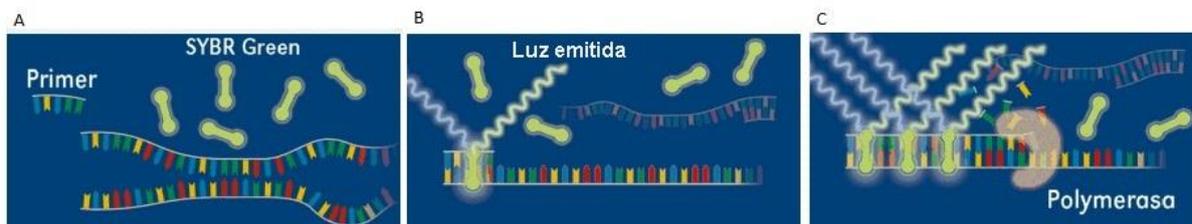


Figura 9: Mecanismo de acción del fluoróforo SYBR Green. (A) Etapa de desnaturalización, el ADN se encuentra en forma de ssADN, no se emite fluorescencia. (B) Etapa de annealing, el SYBR Green se intercala en la unión primer-ssADN emitiendo fluorescencia débil. (C) Etapa de elongación, el SYBR Green se intercala en el dsADN emitiendo la máxima fluorescencia posible para ese ciclo. Imagen modificada, traducida de idioma original (Aguilera et al. 2014; Gene Quantification & Real-Time PCR Dyes and Chemistries n.d.)

Una ventaja de este fluoróforo es su bajo costo y amplio rendimiento, ya que se puede utilizar para diferentes ensayos. Sin embargo, al no emitir una señal específica para la secuencia de interés, no se pueden realizar reacciones de PCR de tipo multiplex, donde se amplifican dos secuencias distintas en un mismo tubo de reacción. Por esta razón, al emplear fluoróforos intercalantes, se debe verificar la especificidad de la reacción con el fin de descartar que se estén cuantificando productos no deseados en lugar del de interés.

Toda secuencia de interés, presente en una muestra, se puede cuantificar. Un análisis de cuantificación utiliza “puntos de corte” para determinar la presencia y concentración, absoluta o relativa, de una secuencia determinada en una muestra. Se considera solamente la fluorescencia detectada en la fase exponencial de la PCR. Esta fase también se la llama “Lineal-Logarítmica” porque los puntos que componen esta fase se convierten en una curva lineal aplicándole el logaritmo a la concentración en cada punto.

Existen tres tipos de análisis de cuantificación:

- **Cuantificación absoluta:**

Calcula la concentración de la secuencia de ADN en muestras desconocidas, basado en la concentración de las muestras estándar.

- **Detección cualitativa:**

Determina si la secuencia de ADN está presente en muestras desconocidas.

- **Cuantificación Relativa**

Compara la relación entre secuencias de ADN en muestras desconocidas con las mismas secuencias presentes en un calibrador.

Para diseñar y realizar un análisis de cuantificación de secuencias de ADN o qPCR es fundamental comprender los siguientes conceptos:

Línea Base o *Baseline*: Es la señal o fluorescencia emitida al iniciar la reacción, no hay cambios que se puedan considerar significativos, es la fluorescencia basal propia de la muestra junto con los componentes de la reacción.

Fondo o *Background*: Es fluorescencia inespecífica presente en la reacción independientemente de la presencia o ausencia de muestra. También se lo conoce como el *ruido* de la reacción, el cual se emite durante toda la reacción, incluyendo su comienzo, donde no hay un aumento detectable de fluorescencia.

Umbral o *Threshold*: Es donde la señal refleja un incremento significativo de su intensidad por sobre la línea base. Esto se emplea para distinguir la señal de amplificación versus el fondo o ruido. Esto se utiliza para calcular el ciclo de umbral.

Ciclo Umbral (Ct) o *Crossing point* (Cp): Es en ciclo en el cual la reacción cruza el valor establecido como umbral. Este valor se utiliza para estimar en una qPCR la cantidad inicial de secuencias de ADN de interés. El valor del Cp es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas de interés, es decir que a mayor concentración de éstas, el Cp será menor.

Para que la cuantificación sea correcta se debe estandarizar la reacción, esto se realiza mediante una **curva de calibración**, también denominada **curva estándar**. La curva estándar consiste de diluciones seriadas donde la concentración de las moléculas es conocida. El proceso de estandarización requiere la cuantificación de todos los puntos de la curva. Es recomendable que estas cuantificaciones se realicen, mínimamente, por triplicado a fin de evaluar la reproducibilidad de la reacción, y que las curvas contengan 4 o más puntos. Una

vez obtenidos los Cp de cada punto de la curva, estos son extrapolados con el logaritmo de su concentración correspondiente. De esta manera, mediante un análisis de regresión lineal, se puede obtener la ecuación de la recta formada (1). Donde **m** es la pendiente de la recta, **b** es la ordenada al origen, **Y** corresponde a los Cp y **x** al Log[concentración o N° moléculas].

$$Y = m \cdot x + b \tag{1}$$

La pendiente **m** de esta reacción determina la **Eficiencia (E)** de la misma, siendo su valor óptimo igual a 2. Este valor corresponde a una pendiente **m=-3,32**, correspondiente a una eficiencia del 100%. La relación entre la Eficiencia y la pendiente de la recta está determinada en la fórmula (2). (Bustin et al. 2005):

$$Eficiencia = 10^{(-1/m)} - 1 \tag{2}$$

El coeficiente de determinación (R^2) es un indicador de la linealidad de los datos. Permite saber en qué porcentaje los valores obtenidos corresponden a la metodología en sí y no a errores aleatorios. Si R^2 este es menor a 0.95 se considera que no hay relación lineal entre el Cp y el Log [concentración o N° moléculas]. Posibles causas de valores bajos de R^2 y **m** son los errores de manipulación de muestras y reactivos, así como también la presencia de inhibidores en la mezcla de reacción. Valores de **m** próximos a -3.32 y de R^2 cercanos a 1 aseguran la reproducibilidad de los resultados, así como también la precisión del método.

2.7.RT-qPCR (Retrotranscripción y PCR cuantitativa en tiempo real). Parámetros experimentales

Para realizar la puesta a punto de la metodología propuesta en este trabajo, se siguieron las pautas sugeridas por “*MIQE guidelines: Minimum Information for publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*”. *MIQE Guidelines* describe los requerimientos mínimos, según los estándares internacionales, de información necesaria para evaluar experimentos, utilizando como herramienta molecular una qPCR. Cumplir con las pautas de ésta guía es fundamental para garantizar la confiabilidad de los resultados, y que a su vez puedan ser realizados por otros laboratorios sin cambios de parámetros en las reacciones, es decir, que el método sea reproducible (Bustin et al. 2009). Detallando cada una de las características y condiciones experimentales mínimas y relevantes de un ensayo, los lectores pueden evaluar la validez de los métodos publicados. Describir y detallar los parámetros

requeridos por MIQE permite asegurar la relevancia, confiabilidad, correcta interpretación y reproducibilidad del ensayo.

2.7.1. Consideraciones conceptuales

Con el fin de validar la metodología seleccionada para este trabajo, se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones:

- **Sensibilidad analítica** del ensayo. Se debe definir cuál es el mínimo número de copias del gen de interés que el ensayo mide con precisión. Para determinar la sensibilidad analítica del ensayo se debe establecer su límite de detección (LD),
- **Especificidad analítica** del ensayo. Se refiere a la capacidad del ensayo para detectar las secuencias deseadas y no otras secuencias presentes en las muestras, no deseadas.
- **Exactitud** del ensayo. Es la diferencia entre los valores experimentales y los valores reales.
- **Repetitividad** del ensayo. Se evalúa según la variabilidad en los valores obtenidos en replicas técnicas. Es decir, el método debe arrojar mediciones consistentes, con variabilidad reducida, para repetidas determinaciones de una misma muestra.
- **Reproducibilidad** del ensayo. Es la capacidad que tiene el ensayo de poder ser realizado por distintos operarios o laboratorios y arrojar los mismos resultados.

2.8. Genes en estudio y Gen de referencia

Este trabajo se centra en el análisis de expresión de las proteínas FFA3/GPR41 y FFA2/GPR43. Los genes de estos receptores están compuestos por un único exón, por lo cual no presentan variantes de splicing y a su vez es imposible, mediante PCR, diferenciar sus ARN mensajeros (ARNm), retrotranscritos a ADNc, de su ADN genómico. Como se describió anteriormente estos receptores contienen regiones conservadas, entre ellas su dominio 7TM, sumamente útil al momento de diseñar los primers de PCR. Es por eso que para analizar la expresión de las mismas, fue necesario desarrollar un flujo de trabajo que minimice la contaminación de las muestras con ADN genómico.

Para estudiar la expresión de estos genes es necesario contar con una referencia frente a la cual compararlos. Se seleccionaron genes que se expresan de forma estable en las células de estudio. Para la PCR de punto final se seleccionó la β -Actina, componente del esqueleto celular y de expresión uniforme en la mayoría de los tejidos. Para la qPCR se utilizó el gen

ABL1. ABL1 es un proto-oncogen que codifica una proteína quinasa, la cual se expresa en el núcleo y en el citoplasma celular. La misma está implicada en varios procesos de diferenciación celular, como así también en la división y la adhesión celular. También está implicada en la respuesta al estrés de la célula. La actividad de la misma está regulada por su dominio SH3, cuando este dominio no se encuentra presente o se altera, convierte a ABL1 en un oncogen. Existe una translocación estructural entre los cromosomas 9 y 22, conocida como cromosoma filadelfia o t(9;22), la misma origina como resultado la fusión de los genes Breakpoint Cluster Region Protein (BCR) y ABL1, dando lugar al gen de fusión BCR/ABL1, causante de la leucemia mieloide crónica (LMC). (Amabile et al. 2015). Esto convierte al gen ABL1 en uno de los genes más estudiados por la oncohematología y es el gold-standard como gen control en el monitoreo de la carga tumoral en la LMC, convirtiéndolo en un excelente gen de referencia para FFA3/GPR41 y FFA2/GPR43 en Leucocitos (Hughes et al. 2006).

2.9. Parámetros a tener en cuenta en el diseño de Primers

Los primers para este trabajo fueron seleccionados y diseñados bajo las siguientes consideraciones:

- Temperatura de hibridación: Para la PCR de punto final se contemplaron temperaturas comprendidas en el rango de los 50°C a 60°C. Los primers seleccionados, modificados y diseñados poseen una temperatura de annealing común de 53°C. Los primers para PCR en tiempo real fueron diseñados de modo tal que su temperatura de annealing óptima sea de 60°C. Valores de temperatura altos y cercanos a la temperatura de elongación de la Taq-polimerasa aseguran uniones primer-templado más específicas y programas de ciclado más eficientes.
- Tamaño y composición de Primers: La temperatura de melting (T_m) de los primers, temperatura a la cual el 50% de las hebras de ADN se encuentran en estado de simple cadena, aumenta en la medida que se incrementa el tamaño del Primer. A su vez, un mayor contenido de guanina (G) y citosina (C) produce el mismo efecto. La T_m tiene una relación directa con la temperatura de annealing. Normalmente la longitud de los primers suele rondar entre 18 y 30 pares de bases (pb), aunque según el uso que se les dé, estos pueden ser de

mayor longitud. El contenido de G-C puede encontrarse entre 35% y 65%, siendo 50% el valor utilizado con mayor frecuencia. Repeticiones en tándem de guaninas pueden favorecer la formación de dímeros de primers, productos de PCR no deseables, esto debe tenerse en consideración en el momento de su diseño. Otra consideración fundamental es evitar las estructuras autocomplementarias dentro de sus secuencias. Esto no solo favorece la formación de dímeros e inespecificidad de los primers, sino que también afecta la eficiencia de la reacción de PCR.

- **Tamaño de producto de PCR:** El tamaño del producto de PCR depende de cada aplicación que se le dé. Cuanto más grande es el producto de PCR menos eficiente puede llegar a ser la reacción. La secuenciación Sanger convencional requiere productos de PCR comprendidos entre los 200pb y 800pb, siendo su valor ideal comprendido entre 400pb y 600pb. Existen polímeros para electroforesis capilar que permiten secuenciar productos de PCR por fuera de éste rango. A su vez, las tecnologías de secuenciación de nueva generación requieren de fragmentos de menor tamaño. La PCR en tiempo real requiere que la reacción tenga una eficiencia cercana al máximo teórico, es por esto que los productos de PCR deben ser de tamaño reducido. Si bien es posible utilizar productos de hasta 700pb, el tamaño ideal se encuentra comprendido entre los 75pb y 150pb. Productos más pequeños no podrían diferenciarse de dímeros de primers.

3. Materiales y Métodos

3.1. Obtención y aislamiento de Leucocitos Polimorfonucleares de sangre periférica

La obtención de ácidos nucleicos de Leucocitos Polimorfonucleares (PMN) en sangre periférica, tanto Neutrófilos como Eosinófilos, requiere de un método de aislamiento que permita obtener una óptima cantidad y calidad de células para los ensayos moleculares propuestos. Existen métodos de aislamiento de PMN tales como la sedimentación en Dextrán ó en Ficoll-Hypaque. Sin embargo para la aplicación de las herramientas moleculares propuestas, es decir, para estudiar los niveles de expresión de ARNm de los receptores FFA3/GPR41 y FFA2GPR43, aún no se encuentra descrito en la literatura que metodología de obtención y aislamiento de PMN en sangre periférica es la más adecuada.

Se evaluaron los dos métodos nombrados previamente, con y sin modificaciones específicas, a fin de determinar las condiciones adecuadas para aislar un producto celular adecuado. Para esta evaluación se procesaron muestras de descarte de 42 pacientes ingresados para estudios vinculados a PMN (16 hombres y 26 Mujeres de entre 18 y 85 años). De cada paciente se extrajo sangre periférica que fue almacenada en tubos de marca Vacutainer de 7ml conteniendo ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Las muestras fueron procesadas en el mismo día de la extracción.

3.1.1 Extracción y purificación de Polimorfonucleares de sangre periférica: Método Dextrán 6%

La sedimentación con Dextrán al 6% se basa en aprovechar la densidad diferencial de cada línea celular, presente en la muestra de sangre, para separarlas en un gradiente de sedimentación. De esta manera las células más densas sedimentarán antes que las de menor densidad.

Manteniendo una relación volumétrica de 4 partes de Dextrán y una de sangre, se incubó estáticamente la mezcla durante unos 30' a 37°C, que previamente fue suavemente homogenizada. Finalizado el tiempo de incubación se pudo observar dos fases bien diferenciadas, una superior de color ámbar rica en Leucocitos y una fase inferior, de color rojo, conteniendo la totalidad de los Eritrocitos. Se tomó la primera fase (aproximadamente unos 300 μ l – 450 μ l) con un pipeta Pasteur y se transfirió a un microtubo cónico de 1.5 ml

(tipo Eppendorf) estéril. Se le agregó un volumen igual de Hanks Balanced Saline Solution (HBSS) estéril libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} . Este buffer no debe tener iones de magnesio ni de calcio, ya que la presencia de estos iones, junto con el stress físico debido a la manipulación de las muestras, suele desencadenar la activación y aglutinación de los Leucocitos, impidiendo así su correcta cuantificación ya sea por microscopía o mediante citometría de flujo. La fase aislada y resuspendida en HBSS se centrifugó durante 10' a 1000-1300 rpm. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de Leucocitos en 1 ml de HBSS. Luego se procedió a lavar el pellet para eliminar restos de Dextrán presentes en la muestra. Para ello se centrifugó nuevamente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 500 μ l de buffer HBSS, este proceso se repitió nuevamente y luego se resuspendió el pellet en 1 ml de HBSS.

3.1.2 Extracción y purificación de Polimorfonucleares de sangre periférica: Método Ficoll Hypaque

Al igual que la metodología del Dextrán 6%, se aprovechó la densidad diferencial de cada línea celular para separar las células deseadas del resto de la muestra. Este método consiste en utilizar Ficoll Hypaque preparado a una densidad de 1,077g/cm³. Esta densidad es mayor que la de las células mononucleares, principalmente Monocitos y Linfocitos, pero menor que la de los PMN y Eritrocitos. Como consecuencia, las células más densas sedimentan mientras que las menos densas quedan retenidas en la interfase que separa el Ficoll Hypaque del plasma sanguíneo.

En cada caso, 5 ml de sangre periférica volcó cuidadosamente por las paredes de un tubo cónico de 15 ml conteniendo 2,5 ml de Ficoll Hypaque (1,077 g/cm³). Se debió mantener la relación volumétrica de 2 partes de muestra y una de Ficoll Hypaque, para obtener así, dos fases bien definidas, una transparente en el fondo del tubo, y otra roja en la parte superior que contiene la sangre. Luego se centrifugó el tubo durante 20 minutos a 1500 rpm. Finalizada la centrifugación se obtuvo una fase que consiste de PMN y eritrocitos, otra transparente de que contiene el Ficoll Hypaque, una capa opaca en forma de halo que contiene células mononucleares y un sobrenadante que consiste de plasma sanguíneo. (Figura 10)

Con una pipeta Pasteur se descartó la capa que contiene las células mononucleares, luego se retiró las demás fases líquidas, dejando solamente la fase con eritrocitos y PMN. Posteriormente se procedió a eliminar del pellet los glóbulos rojos mediante un proceso de

lisis. Para ello, el pellet se resuspendió en 5 ml de solución lisante de cloruro de amonio 0.14M, se incubó durante 10 minutos y se centrifugó por 10 minutos a 1100 rpm. El pellet obtenido se lavó con 2 ml de HBBS, luego se volvió a centrifugar por 10 minutos a 1100 rpm y el pellet final se resuspendió en 1 ml de HBBS.

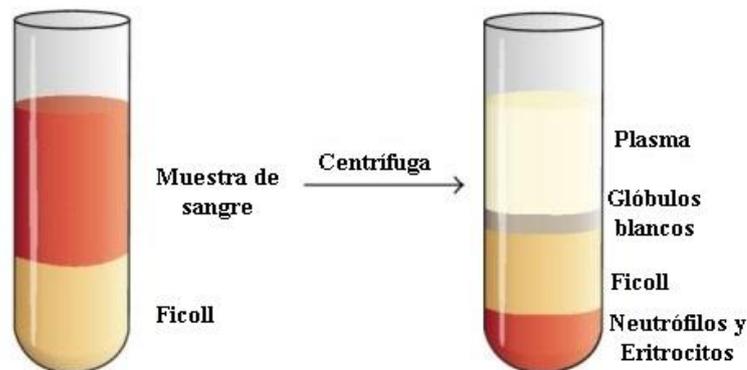


Figura 10: Separación por gradiente de densidades de muestra de sangre periférica mediante el método de Ficoll Hypaque. Imagen modificada, traducida de idioma original (Low and Wan Abas 2015)

3.1.3 Extracción y purificación de Polimorfonucleares de sangre periférica: Método combinado Dextrán – Ficoll Hypaque sedimentación.

A fin de optimizar el rendimiento y calidad del producto celular aislado se procedió a evaluar una combinación de ambos métodos.

En un tubo cónico de 15 ml se colocaron 2,5 ml de Dextrán 6% y se agregó 5 ml de sangre periférica. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos. Terminada la incubación se observó la formación de dos fases claramente definidas, la superior de color ámbar conteniendo Leucocitos y la inferior de color rojo conteniendo mayoritariamente eritrocitos. Se separó el sobrenadante con pipeta Pasteur, suavemente sin levantar la fase del fondo y se trasvasó a un tubo cónico de 15ml. Se centrifugó durante 15 minutos a 1500 rpm. Luego se descartó el sobrenadante y se resuspende el pellet en 2 ml de HBSS libre Ca^{2+} y Mg^{2+} .

El pellet resuspendido volvió suavemente por las paredes de un tubo cónico de 15ml conteniendo 1ml de Ficoll Hypaque ($1,077g/cm^3$), de esta manera se previno que las fases se mezclen. Luego se centrifugó 30 minutos a 1500 rpm. Se descartó el sobrenadante, comenzando por retirar el halo blanco de células mononucleares, ya que son el principal contaminante que afecta el rendimiento del aislamiento. En el caso de que el pellet

conteniendo los PMN contenga fuerte contaminación de Eritrocitos, pellet rosado o rojo, opcionalmente se lo pudo resuspender en 2ml de solución de lisis de cloruro de amonio 0,14M y transcurridos 5 minutos, centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos. Este proceso se repitió una vez más, utilizando HBSS en vez de lisante, para eliminar los restos de Ficoll Hypaque.

3.1.4 Evaluación de producto aislado por citometría de Flujo

Alícuotas de 300ul de cada de las muestras procesadas mediante los métodos de aislamiento de PMN previamente descriptos, se cuantificaron en un citómetro de flujo Sysmex XS-1000i. Este citómetro cuantifica y separa las poblaciones celulares según su fenotipo permitiendo conocer la proporción y cantidad de células extraídas.

3.1.5 Análisis estadístico de los tres métodos

Con el fin de determinar cuál es el método óptimo para la obtención de PMN se realizó un análisis estadístico. Se procedió a elegir el método que permita obtener la mayor pureza de Neutrófilos manteniendo una cantidad de células requeridas. Se obtuvieron las medias de los componentes celulares aislados expresados como porcentaje de células del total obtenido, así como también los desvíos estándar y coeficientes de variación.

3.2.Extracción de ácidos nucleicos

Una vez aislados los PMN mediante el método combinado de Dextrán-Ficoll Hypaque, se purificó ADN y ARN total utilizando el sistema automatizado de extracción de ácidos nucleicos *Roche's MagNa Pure system*. Para obtener ADN se utilizó el kit *MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I* de (*Roche Diagnostics, GmbH, Alemania*) según indicaciones del fabricante. Para la obtención de ARNm se utilizó el kit *MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit* de (*Roche Diagnostics, GmbH, Alemania*) según indicaciones del fabricante. Para asegurar la pureza del ARN, sin contaminación de ADN, las muestras fueron incubadas con DNasa I, provista por el fabricante, durante su procesamiento. El ADN obtenido se almacenó inmediatamente a -20°C mientras que el ARN se almacenó como ADN copia (ADNc) a -20°C para garantizar su estabilidad, realizándose la retrotranscripción (RT) inmediatamente después de la extracción del ARN.

3.3. Análisis de calidad de los ácidos nucleicos por el método combinado.

Las bases nitrogenadas, componentes de los ácidos nucleicos, poseen estructuras aromáticas que absorben la radiación ultravioleta, siendo los 260nm la longitud de onda donde se absorbe. Las proteínas, al igual que los ácidos nucleicos, poseen estructuras aromáticas, las cuales se encuentran presentes en algunos aminoácidos. A diferencia de los ácidos nucleicos, las proteínas tienen su mayor absorbancia en el orden de los 280nm. Esta característica permite mediante espectrometría UV establecer una relación entre la absorbancia a 260nm y 280nm. Cuando la relación 260nm/280nm adquiere un valor igual a 1,8 se considera que la muestra de ADN es pura y no posee contaminación de proteínas.

El ADN obtenido utilizando el MagNa Pure se cuantificó por medio de espectrometría UV (260nm/280nm) con el fin de evaluar la proporción de contaminación con proteínas en las muestras, así como también, cuantificándolas, establecer cuál fue el rendimiento de la purificación.

3.4. Reacción de Retrotranscripción (RT)

Los ácidos ribonucleicos (ARN) son moléculas monocatenarias de estabilidad relativamente baja, debido a esto, si se desea almacenar secuencias de ARN de manera más estable, es necesario retrotranscribir las mismas en ADNc. Otra razón para retrotranscribir ARN a ADNc es para poder amplificarlo por PCR. La Taq-Polimerasa utilizada para PCR solo es capaz de polimerizar ADN utilizando una hebra molde de ADN, no de ARN. Por esta razón, para poder amplificar ARNm es necesario realizar una retrotranscripción (RT) seguida una PCR (RT-PCR).

Para determinar las condiciones de RT ideales para obtener ADNc de los genes de interés se evaluaron 3 condiciones de RT distintas. La primera de las tres condiciones fue la utilizada por el laboratorio de virología de CEMIC para obtener ARN de origen viral, la segunda fue la sugerida por el fabricante de la enzima y por último se evaluó una tercera condición desarrollada para este trabajo.

Para la reacción retrotranscripción se utilizaron los siguientes reactivos:

- Buffer 10X: Tampón de reacción 10X [75 mM Tris HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄] el mismo se encuentra libre de Iones Magnesio y Calcio.
- Random Primer: Son oligonucleótidos hexaméricos, de secuencias aleatorias, que hibridan con el ARN, actuando como cebadores de la RT.

- MMLV: Es la transcriptasa reversa del Murine Moloney de Leukemia Virus (M-MLV). Es una ADN polimerasa recombinante que puede sintetizar ADNc utilizando ARN como hebra molde.
- RNAsin: Es un inhibidor de RNAsas, evita la degradación de las moléculas de ARN.
- dNTP: Son desoxiribonucleótidos-trifosfato libres. Las ADN polimerasas los utilizan como sustrato para sintetizar las hebras complementarias de ADN.

En la primera reacción se utilizó el Buffer diluido a 1x, Magnesio 1,25mM, 250nM dNTPs, random primers 40nM, 0,2ul de RNAsin, 0,5ul de M-MLV, 2ul de RNA en un volumen final de 20ul, el volumen restante se completó con H₂O DEPC. La segunda condición de reacción únicamente difiere en la cantidad de ARN utilizado. En este caso el volumen de H₂O DEPC utilizado previamente es reemplazado por ARN en su totalidad, aumentando así la cantidad de ARN en la reacción. Para la última condición de reacción se utilizaron Buffer diluido a 1x, magnesio 10mM, dNTPs 1mM, random primers 440nM, 1,25ul de RNAsin, 2,5ul de MMLV y 4,4ul de RNA en un volumen final de 50ul.

En los tres casos las mezclas de reacción fueron sometidas, durante 10 minutos, a 70°C con el fin de desnaturalizar cualquier estructura secundaria que pudiesen contener las moléculas de ARN. Estas estructuras podrían intervenir negativamente en el proceso de síntesis de la hebra de ADNc. Inmediatamente después se las colocó a -20° durante 3 minutos para evitar que se vuelvan a formar dichas estructuras. A continuación, se las incubó a 42° durante 30 minutos y luego a 95° durante 3 minutos. El producto obtenido se almacenó a -20°C.

Finalmente se realizó una PCR de punto final, para los genes de interés, con el fin de evaluar el rendimiento de cada condición RT. Las condiciones de reacción se detallan a continuación, dentro de la sección “Reacción de PCR de punto final”. Los productos de PCR fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa. Alícuotas de 10ul de los productos de PCR fueron sembradas en un gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio. La corrida electroforético se realizó a 60v durante 45 minutos. Los fragmentos fueron visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta y registrados mediante una cámara fotográfica.

3.5. Reacción de PCR de punto final

Con el fin de estudiar, en una etapa futura, las secuencias de los sitios de reconocimiento de AGCC mediante secuenciación Sanger, fue necesario desarrollar PCRs de punto final para cada gen.

Las reacciones se realizaron en concentraciones finales de Mg^{2+} 1,5mM, dNTPs 250mM, primer forward 1mM, primer reverse 1mM y 1,25 unidades de enzima, en un volumen final de 50ul, de los cuales 5ul corresponden a la muestra ya sea ADN o ADNc. Las reacciones se llevaron a cabo con la enzima *Taq-Polimerasa recombinante* (Thermo Fisher Scientific Inc., Estados Unidos). Los programas de ciclado fueron realizados con una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido por 30 ciclos con desnaturalización a 95°C durante 45 segundos, hibridación a 53°C durante 45 segundos y extensión a 72°C durante 90 segundos y un paso final de elongación a 72°C durante 10 minutos. Todas las reacciones se llevaron a cabo en termocicladores *Veriti™ - Applied Biosystems™*.

Las reacciones fueron verificadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% a un voltaje de 80V.

3.6. Diseño de primers

Debido a que los genes de FFA3/GPR41 y FFA2/GPR43 poseen un único exón no se pudieron diseñar sets de primers que discriminen sus ARN mensajeros del ADN genómico. Para la PCR de punto final se utilizaron primers modificados a partir de los propuestos por *Le Poul et al. 2003* a fin de unificar las distintas reacciones de PCR en un mismo programa de ciclado (Tabla I). A su vez, se diseñaron sets de primers que cumplen con los requerimientos técnicos de una PCR en tiempo real. Todos estos primers son específicos para los dominios 7TM de los receptores, altamente conservados, asegurando un annealing preciso durante la PCR. La región que comprenden los primers para PCR de punto final contiene los codones codificantes para los aminoácidos críticos en el reconocimiento de los Ligandos. Esto permitirá, en el futuro secuenciar los sitios de reconocimiento de Ligando mediante el método Sanger, en el proyecto de investigación en el cual se enmarca este trabajo. Se diseñaron primers para la β -Actina, la cual se utilizó como gen de referencia (*housekeeping*) en la PCR de punto final, mientras que para la PCR en tiempo real se diseñaron primers específicos para el gen ABL1. Estos primers, para genes de referencia, comprenden regiones entre intrones,

permitiendo así discriminar ARN mensajero de ADN genómico. Los primers fueron seleccionados y diseñados bajo las condiciones que se detallan en la sección “2.9. *Párametros a tener en cuenta en el diseño de Primers*” en Introducción.

Los Primers fueron diseñados utilizando la plataforma PRIMER 3 y a su vez sus secuencias fueran alineadas frente a las bases de datos *RefSeq (mRNA)* y *Genome (Homo Sapiens)* del *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* mediante la herramienta *Primer Blast* (Ye et al. 2012). De este modo se verificó su especificidad y la ausencia de productos de PCR no deseables. Los primers utilizados en este trabajo fueron sintetizados por la empresa Genbiotech S.R.L. en escala de 25 nanomoles y purificados mediante desalado.

Pares de primers utilizados

Nombre	Sentido	Secuencia (5' - 3')	Hibridación (°C)	Longitud primer (pb)	Longitud producto (pb)
FFA3/GPR41	Forward	TACGTCATAGAATTCTCAGG	53	20	543
Punto Final (A)	Reverse	TGTTCACTGGTCTTTCTTTC	53	20	
FFA2/GPR43	Forward	TTCTACAGCAGCATCTACTG	53	20	563
Punto Final (B)	Reverse	GAGAAATAGAAGAGCAGGGG	53	20	
β-Actina	Forward	CGCCTTTGCCGATCC	53	15	421
Punto Final (C)	Reverse	CTCAAACATGATCTGGGTC	53	19	
FFA3/GPR41	Forward	TGCTGTTCTGCCTTTCCGCATG	60	23	150
Real-Time PCR (C)	Reverse	GGAAGCGTTCAATGCTCACAGCT	60	23	
FFA2/GPR43	Forward	GCCTGGGTTATGTCCTTTGGTCA	60	23	112
Real-Time PCR (C)	Reverse	CGGTGAAGTTCTCGTAGCAGGTA	60	23	
ABL1	Forward	ATCTGCCTGAAGCTGGTGGG	60	20	137
Real-Time PCR (C)	Reverse	TTCCAACGAGCGGCTTCACT	60	20	

Tabla I: (A) Primers propuestos por *Le Poul et al. 2003*. (B) Modificación de los primers propuestos por *Poul et al. 2003*. (C) Primers desarrollados para éste trabajo.

3.7. Reacción de PCR en tiempo real

Con el fin de evaluar los niveles de expresión de los genes de GPR41/FFA3 y GPR43/FFA2 se procedió a poner a punto y estandarizar sus RT-qPCRs correspondientes. El método de detección utilizado fue el de fluorescencia por agente intercalante, utilizando Sybr Green. Se utilizó el kit *LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (versión 18)* - *Roche Diagnostic S.A.* Las reacciones se realizaron en el termociclador *LightCycler® 2.0 con*

sistema de carrusel. Se eligió este método de detección ya que el uso de Sybr Green, si bien requiere de una puesta a punto de mayor complejidad, respecto a otros métodos, es económico y reproducible.

Las reacciones se llevaron a cabo según las indicaciones del fabricante, empleando 3,5ul de ADNc obtenido mediante las condiciones de retrotranscripción previamente descritas. La concentración final de Mg^{2+} fue 1.5mM, la de cada primer fue 200nM, la de pre-mix, conteniendo buffer y enzima, 1x y el volumen final de reacción fue de 10ul.

Todas las mezclas de reacción (Master Mix) se realizaron bajo campana en una cabina especial dedicada a su preparación (Figura 11). Los primers utilizados fueron los detallados en la Tabla I de la sección “Diseños de primers”.



Figura 11: Armado de la Master Mix bajo campana. Es necesario limitar la cantidad de luz presente en la campana ya que el Sybr Green es un fluoróforo fotosensible.

El programa de ciclado se dividió en 3 etapas, consistiendo de una primer etapa de desnaturalización, seguida de un *Touch Down*, una etapa de amplificación y finalmente un análisis de Alta Resolución de Fusión o *High Resolution Melting*. Se utilizó una etapa de *Touch Down* con el fin de incrementar la especificidad y sensibilidad de la reacción. Esta etapa consiste de una serie de ciclos, 4 en este caso, en los cuales la temperatura de annealing,

mayor a la utilizada durante la amplificación, se reduce ciclo a ciclo hasta alcanzar su valor definitivo. De esta manera se previene la formación de sub-productos inespecíficos a la reacción aumentando la astringencia de la unión entre los primers y la hebra de ADN complementaria. La etapa de amplificación consta de 40 ciclos. El análisis de melting permite evaluar la especificidad de la reacción ya que discrimina productos de PCR según sus temperaturas de desnaturalización. El programa de ciclado se detalla en la Tabla II.

Programa de ciclado de PCR en tiempo real

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (HH:MM:SS)	Rampa °C/segundo	Ciclos Nro.
Desnaturalización	95	0:10:00	20	1
	95	0:00:10	20	
Touch Down 1	68	0:00:10	20	1
	72	0:00:10	20	
Touch Down 2	95	0:00:10	20	1
	66	0:00:10	20	
Touch Down 3	95	0:00:10	20	1
	64	0:00:10	20	
Touch Down 4	95	0:10:00	20	1
	62	0:10:00	20	
Amplificación	95	0:00:10	20	40
	72	0:00:10	20	
Melting	95	0:00:00	20	1
	40	0:00:15	20	
Enfriamiento	95	0:00:00	0.1	1
	40	0:00:30	20	

Tabla II: Programa de ciclado utilizado en las reacciones de qPCR para los genes FFA3/GPR41, FFA2/GPR43 y ABL1.

Durante la puesta a punto de la qPCR se optimizó la concentración de magnesio de la reacción. El magnesio es un cofactor muy importante para el funcionamiento de la ADN polimerasa. Ayuda a estabilizar la doble hebra de ADN y aumenta la temperatura de annealing. Por lo tanto, la optimización de la concentración de Mg^{2+} es crítica para controlar

la especificidad y eficiencia de la reacción. Una baja concentración de Mg^{2+} produce un apareamiento de bases más débil durante la etapa de elongación, dando lugar a un bajo rendimiento de reacción. En contrapartida, una alta concentración de Mg^{2+} favorece la formación de productos no específicos (Thermo Fisher Scientific n.d.)

En este trabajo, para determinar la concentración óptima de Mg^{2+} , se realizó un *Gradiente de Magnesio* de 3 concentraciones. Posteriormente se determinó cual fue la más adecuada considerando la eficiencia y especificidad de reacción con cada una. Las concentraciones evaluadas fueron 1mM, 1,5mM y 2mM. Se realizaron *Master Mixes* para cada gen y para cada concentración, y con ellas se realizaron qPCRs con el programa de ciclado descrito previamente.

La especificidad de las reacciones se evaluó mediante análisis de melting y electroforesis en gel de agarosa para verificar la ausencia de productos no deseados.

3.7.1. Estandarización de la reacción de PCR en Tiempo Real

Uno de los pasos más importantes de la puesta de una PCR en tiempo real es su estandarización. Cuando en la reacción se utiliza como fluoróforo al Sybr Green, la estandarización cobra mayor importancia ya que el mismo se une a cualquier fragmento de ADN de doble cadena y es imperativo asegurar la especificidad y sensibilidad de la reacción. Como paso previo al armado de las curvas de calibración, es necesario proceder con la preparación de soluciones Patrón. Estas soluciones contienen una cantidad conocida de copias de moléculas de ADN con las secuencias de interés, las cuales se obtuvieron por PCR de punto Final. Los primers utilizados son los que se muestran en la tabla I de la sección “Diseños de primers”, bajo las condiciones de PCR descritas anteriormente para cada uno de ellos. Como templado de cada reacción se utilizó ADNc obtenido durante la optimización de las reacciones de RT. Los productos de PCR fueron diluidos, proporción 1:100, y cuantificados en un espectrofotómetro. Posteriormente fueron diluidos hasta obtenerse una concentración de $3,00E+07$ (30.000.000) copias de secuencia de gen por microlitro. Para realizar el cálculo de conversión de masa molecular a número de copias se utilizó la siguiente fórmula (3)

$$\text{N}^{\circ} \text{ de copias} = \frac{(\text{ng ADN} * 6.022 * 10^{23})}{(\text{pares de bases} * 10^9 * 650)} \quad (3)$$

Donde *ng ADN* corresponde al valor obtenido en cada medición realizada en el espectrofotómetro. El número $6.022 * 10^{23}$ es el número de Avogadro y 10^9 es el factor de conversión de nanogramos a gramos. A su vez, *pares de bases* depende del tamaño de cada producto de PCR, siendo 543pb para FFA3/GPR41, 563pb para FFA2/GPR43 y 137pb para ABL1. Este cálculo se realizó bajo la suposición de que el peso promedio de cada par de bases es de 650 daltons, es decir, que un mol de par de bases tiene un peso molecular de 650 gramos.

Una vez obtenida la solución patrón, se procedió a la preparación de la curva de calibración. Se preparó una solución maestra conteniendo 3,00E+06 copias por microlitro de cada gen procedentes de las soluciones Patrón; a la misma se le realizaron diluciones seriadas al décimo hasta obtenerse una solución con una concentración final equivalente a 3 copias de cada gen por microlitro. Los 6 tubos obtenidos fueron alicuotados, almacenándose por cuadruplicado, con el fin de evitar la degradación de la muestra entre ciclos de congelamiento y descongelamiento, asegurando así que el número de copias de cada curva standard se mantenga constante entre usos.

Las curvas de calibración de cada qPCR se obtuvieron por triplicado, realizando las réplicas en intervalos de 48hs; a cargo del mismo operador, para así, reducir la variabilidad de resultados por cambio de operador.

Finalmente, para obtener la pendiente y ordenada al origen de las curvas de calibración, se realizó un análisis de regresión lineal utilizando el software InfoStat (FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Junto con estos datos, se obtuvieron los desvíos estándar correspondientes a cada curva y sus coeficientes de determinación (R^2). A su vez, se utilizaron dos variantes de curva de calibración, una de 6 puntos con un límite de detección (LD) de 10,5 copias en 10ul de volumen de reacción y otra de 5 puntos con un LD de 105 copias en 10ul de volumen de reacción final. Siendo la primera más sensible y la segunda más precisa.

3.7.2. Análisis de expresión de GPR41/FFA3 y GPR43/FFA2 en sangre periférica.

Una vez estandarizadas las reacciones de qPCR se procedió a estudiar los niveles de expresión de los receptores de AGCC en una población control. Para ello se tomaron muestras de sangre periférica, con consentimiento informado previo, de 6 individuos sanos. Se consideró individuo sano a aquel que no presente síntomas de trastornos digestivos o inmunológicos ni esté cursando alguna enfermedad diagnosticada. Se obtuvo ARN total de Neutrófilos mediante el método combinado Dextrán - Ficoll Hypaque y luego se lo almacenó como ADNc. Se evaluaron los niveles de expresión de GPR41/FFA3 y GPR43/FFA2 por qPCR y se utilizó el gen ABL1 como referencia. Las reacciones se realizaron por duplicado para descartar errores de pipeteo. Los valores de Cp obtenidos, fueron convertidos a número de copias iniciales de cada gen por microlitro de volumen de reacción y luego relativizados respecto a ambos receptores así como también a la referencia.

3.7.3. Ensayo de estimulación de GPR41/FFA3 y GPR43/FFA2 con AGCC.

Se diseñó y realizó un ensayo de estimulación con AGCC en cultivos de Neutrófilos aislados de sangre periférica de individuos sanos, a fin de evaluar si la interacción de la células con el Ligando tiene algún efecto regulatorio sobre la expresión de GPR41/FFA3 y GPR43/FFA2. Se consideró individuo sano a aquel que no presente síntomas de trastornos digestivos o inmunológicos ni esté cursando alguna enfermedad diagnosticada

Para realizar este ensayo se extrajo sangre periférica de dos individuos, con consentimiento informado previo, la cual fue almacenada en jeringas heparinizadas. Se aislaron Neutrófilos de las muestras obtenidas mediante el método combinado Dextrán - Ficoll Hypaque. En esta instancia no se utilizó sangre almacenada con EDTA ya que este anticoagulante tiene un efecto inhibitorio sobre el metabolismo celular y por esta razón no se podrían obtener respuestas celulares durante la estimulación con AGCC. La heparina es un anticoagulante natural que actúa sobre la trombina, molécula que cumple un rol fundamental en la formación del coagulo en la sangre, sin afectar el metabolismo celular. Esto convierte a la heparina en el anticoagulante más utilizado para el almacenamiento de muestras de sangre o médula ósea para cultivos celulares. Los Neutrófilos obtenidos fueron cultivados a 37°C en condiciones de anaerobiosis en frascos de cultivo con 7ml de medio de cultivo RPMI 1640

con L-Glutamina (Thermo Fisher Scientific Inc., Estados Unidos) con 100ul de antibiótico a base de penicilina y estreptomina (Thermo Fisher Scientific Inc., Estados Unidos) durante 22 horas. En cada caso se cultivó una fracción de Neutrófilos en condiciones normales y otra fracción con el mismo medio de cultivo conteniendo ácido acético a una concentración de 100mM. No se utilizaron tiempos de cultivo superiores a las 22hs para evitar daños a las células, producto de la excesiva acidificación del medio. Transcurridas las 22hs el contenido de cada flask fue transferido a tubos cónicos de 15ml los cuales se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos, se descartaron los sobrenadantes y los pellets celulares se resuspendieron en HBSS. De cada producto resuspendido se tomaron 10^6 células y se les extrajo ARN total el cual fue retrotranscrito para ser almacenado como ADNc.

Finalmente se evaluaron los niveles de expresión de GPR41/FFA3 y GPR43/FFA2 por qPCR y se utilizó el gen ABL1 como referencia; esto se realizó junto con las muestras descritas previamente en la sección “*Análisis de expresión de GPR41/GPR43 en sangre periférica*”.

Debido a que las reacciones de qPCR se analizaron por duplicado, sólo se consideraron los ensayos sin variabilidad entre réplicas. En el caso de haberse detectado variabilidad entre resultados se procedió a repetir el ensayo. Se calculó la media de los valores que cumplieron con este criterio y su valor se relativizó respecto a los demás genes a fin de simplificar el análisis. Los resultados obtenidos se expresaron como Fold Change (FC) en logaritmo de base 2, también denominados *Log - Fold Change* (L-FC). De esta forma se simplifica la interpretación de resultados, todo valor positivo se considera sobre-expresión de un gen mientras que todo valor negativo lo contrario. La fórmula utilizada para obtener los valores de L-FC fue (4):

$$\boxed{\text{L-FC} = \text{Log}_2 (\text{copias de Gen A} / \text{copias de Gen B})} \quad (4)$$

Una vez obtenidos todos los valores de L-FC se calcularon las medias y coeficientes de variación (CV) para las dos condiciones evaluadas, es decir, expresión de genes basal y expresión de genes luego del ensayo de estimulación con AGCC. Siguiendo los criterios propuestos por GOMES 2009 et al. (Couto, Peternelli, and Barbosa 2013; Leal et al. 2014) se

consideró que valores de CV inferiores a 10% corresponden a baja variación, mientras que valores superiores corresponden a alta variación. Siguiendo este criterio se categorizaron los resultados y se realizó una prueba estadística de Fisher para evaluar diferencias estadísticamente significativas entre ambas condiciones de tratamiento

4. Resultados

4.1. Obtención y aislamiento de Leucocitos Polimorfonucleares en sangre periférica

Las poblaciones leucocitarias obtenidas con el primer método, de Dextrán al 6%, tuvieron una composición media de células polimorfonucleares del 72%, de las cuales 96% eran Neutrófilos y 4% Eosinófilos. Alrededor del 18% corresponde a Linfocitos, un 4% a Monocitos y 6% Basófilos (Tabla III).

Los valores obtenidos para el método de Ficoll Hypaque resultaron inadecuados, con una composición media de células polimorfonucleares del 75%, de los cuales el 93% eran Neutrófilos y 7% Eosinófilos. Las subpoblaciones leucocitarias restantes no pudieron ser diferenciadas por los citómetros de flujo automatizados, esto podría deberse a algún daño morfológico producido a las células durante su aislamiento. Por esta razón se decidió descartar la metodología y sólo se procesaron 7 muestras (4 mujeres y 3 hombres) bajo esas condiciones (Tabla III).

Finalmente, con el método combinado Dextrán – Ficoll Hypaque, se obtuvieron poblaciones leucocitarias con una composición media de células polimorfonucleares del 96.4%, de las cuales el 93.5% eran Neutrófilos y el 6.5% Eosinófilos. Sólo el 1,9% consistió de Linfocitos, 0,4% Monocitos y 1,3% Basófilos. El coeficiente de variación del método es de un 2,36% con una desviación estándar de 0,023%. Con el método combinado se puede obtener un rendimiento mayor al 90% de Neutrófilos y se observó una leve variabilidad de resultados luego de procesar las 42 muestras. Por este motivo, éste fue el método elegido para la obtención de Neutrófilos de sangre periférica utilizado en los pasos posteriores de este trabajo (Tabla III).

	Dextrán 6% % (n=42)	Ficoll Hypaque % (n=7)	Método combinado % (n=42)
Linfocitos	18.0	No evaluable	1.9
Monocitos	4.0	No evaluable	1.3
Basófilos	6.0	No evaluable	0.4
Eosinófilos	3.0	5.0	6.3
Neutrófilos	69.0	70.0	90.1
PMN totales	72.0	75.0	96.4

Tabla III: Fórmulas leucocitarias medias obtenidas mediante cada uno de los métodos.

4.2. Obtención de ácidos nucleicos y detección de secuencias mediante PCR de punto final

La integridad del ADN obtenido con el equipo automatizado MagNaPure fue evaluada mediante el análisis de 5 muestras por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. La presencia de bandas tenues pero únicas en la parte superior del gel indican la presencia de ADN genómico integro, sin degradación ni evidencias de presencia de ARN (Figura 12).

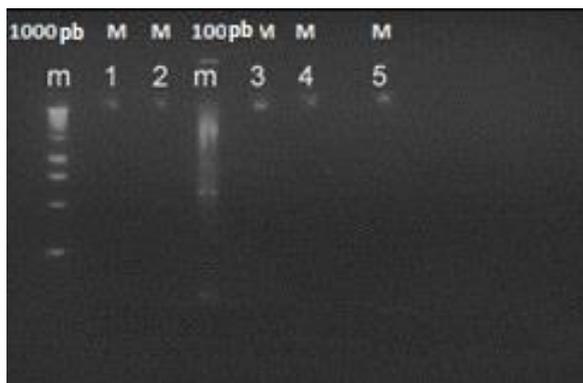


Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa 1.5% 85v – 1.25h. M 1 a 5 corresponde a las muestras de ADN, m corresponde a dos marcadores de tamaño molecular. Se evalúa integridad de los ácidos nucleicos. . La imagen fue modificada para contener rótulos y convertida a escala de grises.

El rendimiento de ADN obtenido se evaluó mediante espectrofotometría. La relación de absorbancia 280nm/260nm sugiere la ausencia de contaminación con proteínas. El

rendimiento medio de ADN obtenido fue de 31.2ng/ul con un desvío estándar de 13.2% y un coeficiente de variación del 42.4%.(Tabla IV).

Evaluación de productos aislados de ADN por espectrofotometría

Muestra #	Absorbancia	ADN ng/ul	Abs 280/260
1	0.085	42	~1.8
2	0.035	17	~1.8
3	0.033	17	~1.8
4	0.073	37	~1.8
5	0.086	43	~1.8
Media	0.062	31.2	-
Desvío STD	0.026	13.16	-
CV%	42.36%	42.18%	-

Tabla IV: Evaluación de productos aislados de ADN por espectrofotometría, se obtuvieron valores de concentración y relación absorbancia 280nm vs 260nm en 5 muestras.

Luego de la amplificación por PCR de punto final de los genes FFA3/GPR41 y FFA2/GPR43, se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa. Como se puede observar en la Figura 13, se detectan bandas únicas para cada gen, las cuales coinciden con los tamaños de banda esperados, siendo 543pb para FFA3/GPR41 y 563pb para FFA2/GPR43. Por lo tanto se pudo corroborar que el método de extracción combinado es apto para reacciones de PCR posteriores.

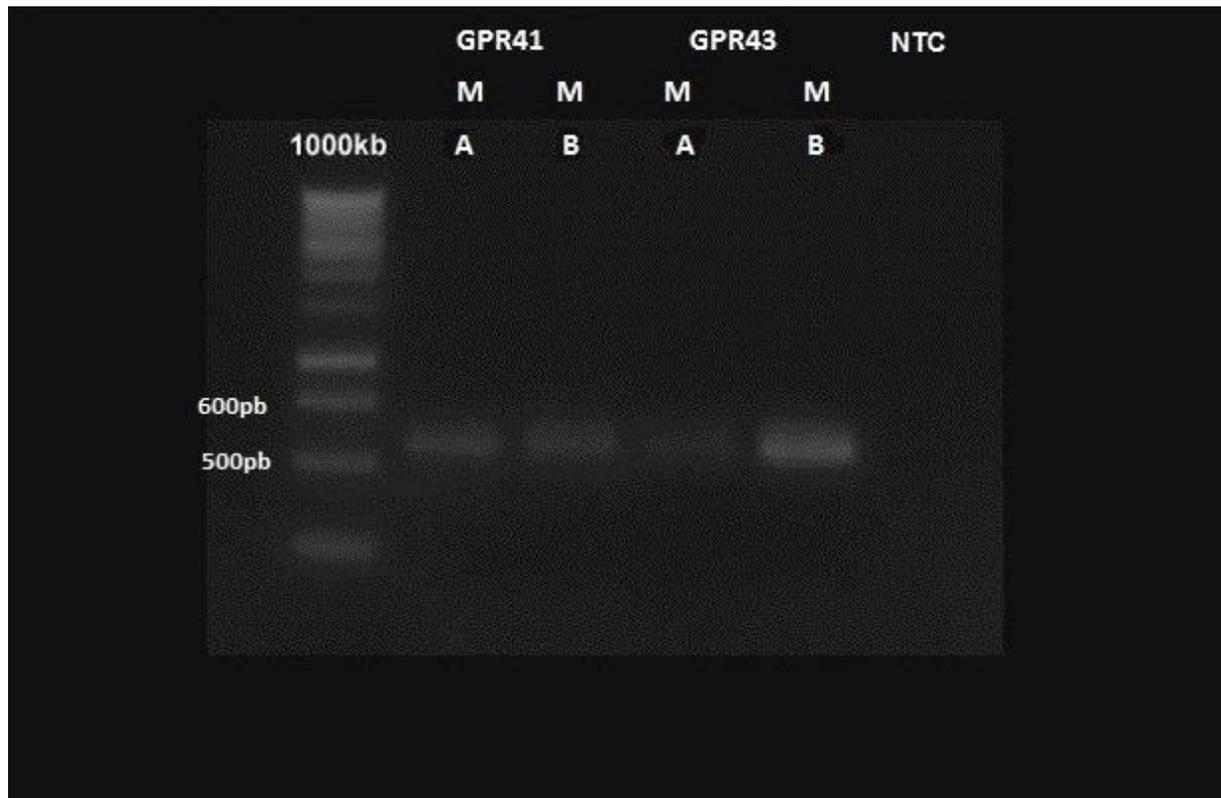


Figura 13: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, sobre productos de la primera PCR de punto final, realizada para evaluar la compatibilidad del método combinado con las reacciones de PCR. Donde M= muestra (A y B). Calles 1 y 2 detección de FFA3/GPR41, calles 3 y 4 detección de FFA2/GPR43 y calle 5 NTC= control sin templado se utilizó ARN en vez de ADNc, los NTC de las de reacciones de PCR fueron sembradas en la misma calle. . La imagen fue modificada para contener rótulos y convertida a escala de grises.

4.3. Evaluación del mejor método de reacción de retrotranscripción (RT)

Luego de evaluar 3 condiciones distintas de retrotranscripción, se optó por utilizar la condición desarrollada exclusivamente para este trabajo. Se corroboró, mediante la amplificación por PCR del ADNc obtenido bajo las 3 condiciones, cual fue la más apta (Figura 14).



Figura 14: Gel de agarosa al 1,5% donde se evaluaron las 3 condiciones de retrotranscripción. Se analizaron para los 3 genes en estudio GPR41-GPR43-ABL1. Donde 1 es la condición desarrollada para este trabajo, 2 es la condición sugerida por el fabricante y 3 es la condición de RT para RNA viral utilizada en el *laboratorio de virología del Hospital CEMIC*. El rendimiento de amplificación para FFA3/GPR41 fue bajo para las 3 condiciones, no se detectaron bandas en el gel de agarosa. . La imagen fue modificada para contener rótulos y convertida a escala de grises.

4.4. Parámetros de la PCR en tiempo real

Se pudo verificar que la sensibilidad y rendimiento de la reacción incrementa con la concentración de magnesio en la *Master Mix*, tal como se puede ver en la Figura 15. No se detectó amplificación de los genes cuando se utilizó una concentración de magnesio final de 1mM.

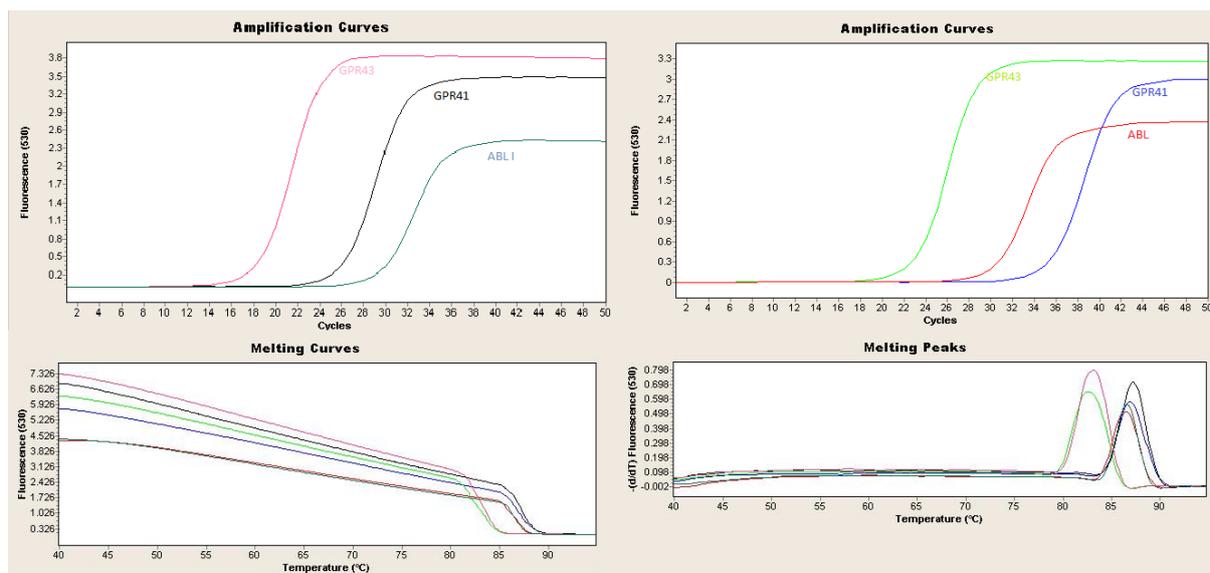


Figura 15: Diagrama de amplificación de cada uno de los genes bajo diferentes concentraciones de Magnesio. La imagen de la izquierda corresponde a una concentración de magnesio 2mM. La imagen de la derecha corresponde a una concentración de 1,5mM. Como se puede observar, los Cp a una concentración de 2mM son menores a los Cp a menor concentración. Esto se traduce a una mayor amplificación en menor cantidad de ciclos. Debajo se puede observar el análisis de melting de las dos condiciones. No se observan picos secundarios.

Cada producto de PCR posee una temperatura de melting (T_m) propia que lo caracteriza. Mediante el uso de curvas de melting se pudo verificar que cada uno de estos productos de PCR se desnaturaliza a su valor de temperatura teórico. A su vez la ausencia de picos secundarios indica que la reacción de qPCR no genera dímeros de primers ni otros productos no deseados, los cuales podrían interferir en la medición de fluorescencia durante la qPCR, obteniéndose valores que no corresponden con la cantidad de copias de gen presentes en la muestra (Figura 16).

Las temperaturas obtenidas para los genes FFA2/GPR43, FFA3/GPR41 y ABL1 mediante el análisis de melting fueron 82.82°C, 87.17°C y 86.83°C respectivamente. Durante todas las reacciones de qPCR los valores de melting obtenidos para cada gen se mantuvieron constantes convirtiéndolos en un buen indicador de especificidad en las reacciones, tal como se puede ver en la Figura 16 donde se pudo detectar a FFA2/GPR43 en dos concentraciones iniciales distintas pero temperaturas de melting similares.

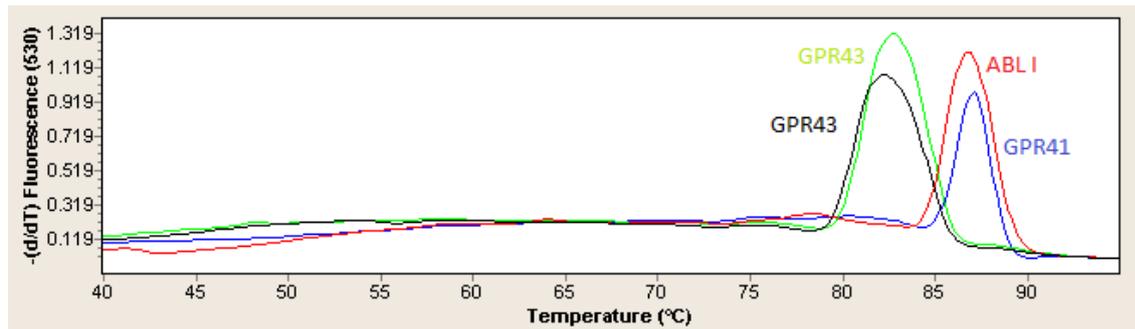


Figura 16: Curva de disociación de cada fragmento a estudiar, en donde además de los genes FFA2/GPR43, FFA3/GPR41 y ABL1, se analizó una muestra diluida de FFA2/GPR43 (se observa en color negro). Imagen original modificada con rótulos sobre los picos de cada gen.

Se corroboró la especificidad de las amplificaciones del gradiente de magnesio mediante análisis de melting y electroforesis en gel de agarosa al 2%. (Figura 17)

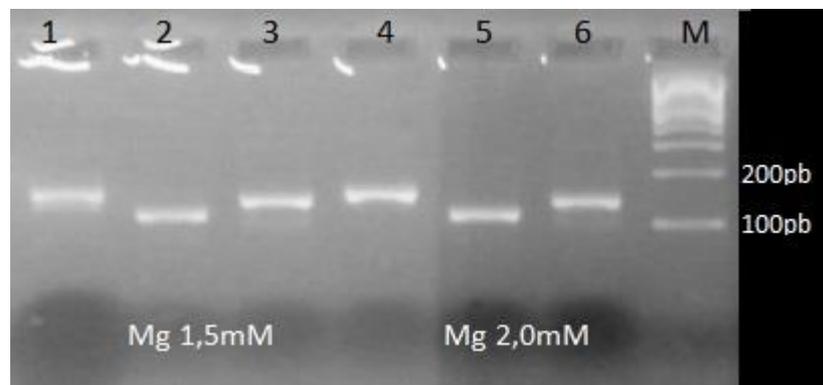


Figura 17: Gel de agarosa al 2%. Calles 1 y 4 FFA3/GPR41 (150pb), calles 2 y 5 FFA2/GPR43 (112pb), calles 3 y 6 ABL1 (137pb) y M corresponde a marcador de peso molecular de escala de 100pb. La imagen fue modificada para contener rótulos y convertida a escala de grises.

4.5. Estandarización de la PCR en tiempo real

Los valores de C_p obtenidos tras realizar las reacciones de calibración de qPCR son detallados en la tabla V. Los valores de pendiente y ordenada al origen obtenidos para cada qPCR de cada gen tanto para curvas de 6 puntos como para 5 puntos se detallan a continuación (Tabla VI, Figura 18, Figura 19).

Curvas de calibración						
Réplica #	Punto #	ABL1 Cp	FFA2/GPR43 Cp	FFA3/GPR41 Cp	Calibrador Log copias/ul	Copias en reacción vf=10ul
1	6	28.58	28.61	30.45	0.48	10.5
2	6	31.3	31.57	N/D	0.48	10.5
3	6	27.71	27.3	30.54	0.48	10.5
1	5	23.43	24.84	24.72	1.48	105
2	5	23.06	25.63	24.62	1.48	105
3	5	23.78	24.5	25.43	1.48	105
1	4	20.06	21.93	21.76	2.48	1050
2	4	19.97	21.87	21.39	2.48	1050
3	4	20.5	22.26	21.67	2.48	1050
1	3	16.89	18.24	18.15	3.48	10500
2	3	17.15	18.24	17.58	3.48	10500
3	3	17.38	17.89	17.31	3.48	10500
1	2	13.04	14.97	14.69	4.48	105000
2	2	13.27	15.27	14.04	4.48	105000
3	2	13.56	15.57	14.61	4.48	105000
1	1	9.26	11.58	10.27	5.48	1050000
2	1	9.93	11.43	10.42	5.48	1050000
3	1	10.24	11.22	10.07	5.48	1050000

Tabla V: Valores de Cp obtenidos para cada punto y réplica de las curvas de calibración. N/D= No Detectable

Calibración en 6 puntos					
Gen	Pendiente		Ordenada al origen		R ²
	Valor	Error STD	Valor	Error STD	
GPR41 (FFA3)	-3.85	0.09	33.41	0.36	~0.99
GPR43 (FFA2)	-3.48	0.12	32.42	0.47	~0.98
ABL1	-3.72	0.14	31.96	0.53	~0.98

Calibración en 5 puntos					
Gen	Pendiente		Ordenada al origen		R ²
	Valor	Error STD	Valor	Error STD	
GPR41 (FFA3)	-3.65	0.07	32.46	0.29	>0.99
GPR43 (FFA2)	-3.39	0.07	32.00	0.30	~0.99
ABL1	-3.41	0.07	30.49	0.29	>0.99

Tabla VI: Datos de las curvas de calibración obtenidos mediante un análisis de regresión lineal. Se utilizó el software estadístico Infostat.

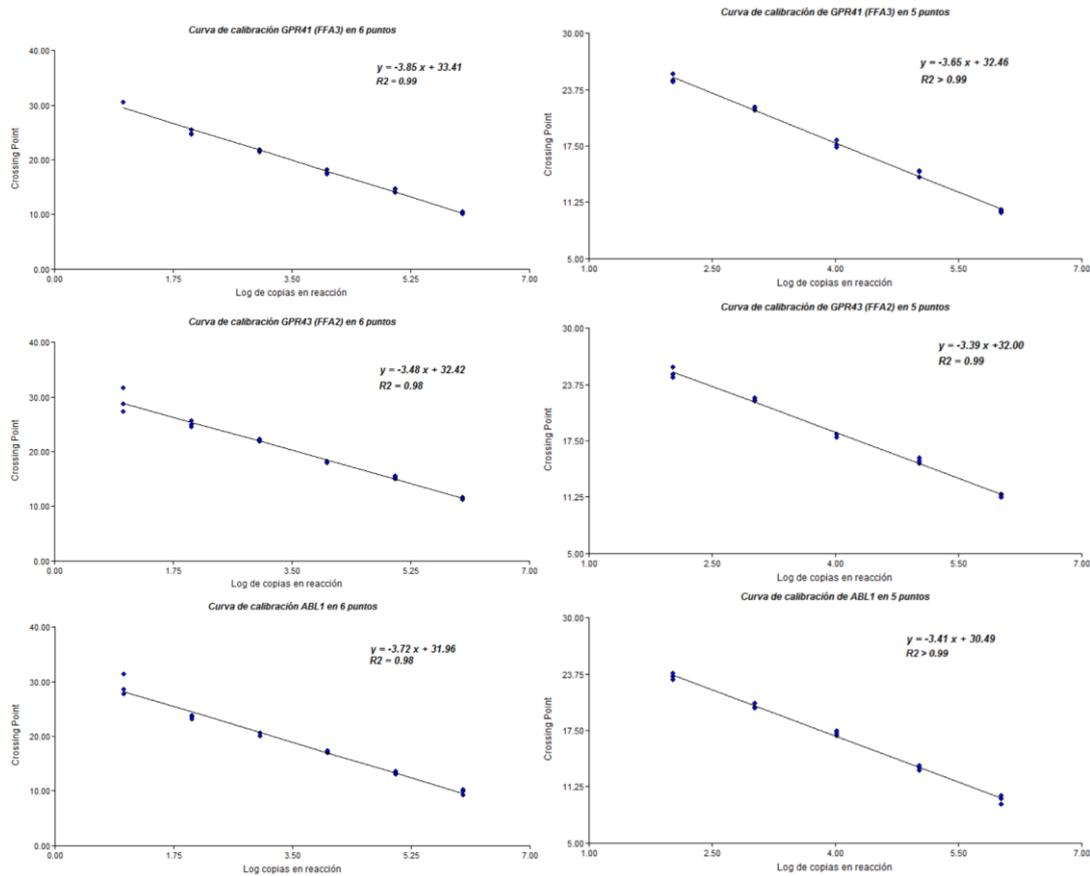


Figura 18: Gráficos de las curvas de calibración para los genes FFA3/GPR41, FFA2/GPR43 y ABL1. Se detallan las funciones de cada curva junto con sus coeficientes de determinación R².

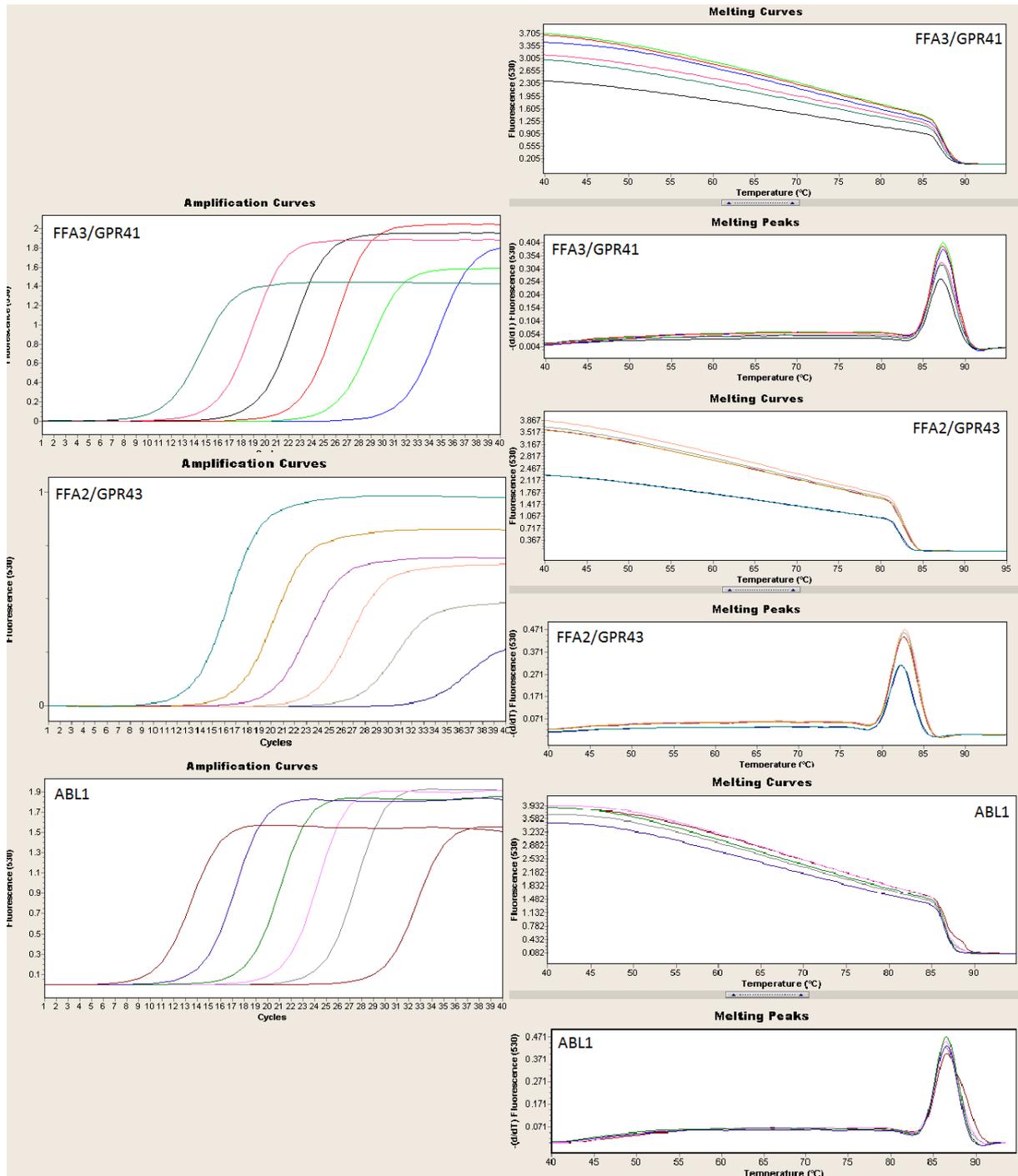


Figura 19: Izquierda: Diagramas de amplificación número de ciclo vs fluorescencia para todos los puntos de una de las réplicas de las curvas de calibración. Derecha: Análisis de melting de las curvas de calibración. La ausencia de picos secundarios es indicador de especificidad en las reacciones.

4.6 Análisis de expresión de FFA3/GPR41 y FFA2/GPR43 y ensayo de estimulación con AGCC.

Tal como se describió anteriormente los valores de número de copias de cada gen fueron relacionados con los valores de los demás genes y expresados como L-FC en logaritmo de base 2 con el fin de simplificar los resultados. Se detalla la relación de expresión entre FFA3/GPR41, FFA2/GPR43 y ABL1, junto con datos estadísticos relevantes en la tabla VII.

Niveles relativizados de expresión de FFA2/GPR43, FFA3/GPR41 y ABL1

Caso (denominación)	Condición (tratamiento)	Ratio GPR43/GPR41 (FC - Log base 2)	Ratio GPR43/ABL1 (FC - Log base 2)	Ratio GPR41/ABL1 (FC - Log base 2)
Individuo 1	Basal	3.4	14.0	10.6
Individuo 2	Basal	4.4	11.4	7.0
Individuo 3	Basal	5.8	13.9	8.1
Individuo 4	Basal	9.0	12.0	2.9
Individuo 5	Basal	7.0	10.7	3.7
Individuo 5	Estimulado	6.4	9.2	2.9
Individuo 6	Basal	5.2	10.3	5.1
Individuo 6	Estimulado	6.9	9.7	2.8

Estadístico (herramienta)	Condición (tratamiento)	Ratio GPR43/GPR41 (FC - Log base 2 o porcentaje)	Ratio GPR43/ABL1 (FC - Log base 2 o porcentaje)	Ratio GPR41/ABL1 (FC - Log base 2 o porcentaje)
Media	Basal	5.5	11.7	6.1
Media	Estimulado	6.6	9.5	2.8
CV	Basal	33.22%	12.29%	43.23%
CV	Estimulado	3.74%	2.53%	0.28%

Tabla VII: Valores de *Fold Change* (FC) de cada gen, expresados como logaritmo de base 2, para cada una de las muestras analizadas. En la parte inferior se indica el FC medio para cada tratamiento junto con su coeficiente de variación (CV).

La prueba de Fisher fue realizada considerando que un tratamiento posee una expresión génica homogénea si su CV es inferior al 10% y heterogénea si es superior al 10%. Los resultados obtenidos tras dicha clasificación (Tabla VIII) sugieren que la estimulación in-vitro de Neutrófilos con AGCC podría alterar los patrones de expresión de los ARNm de los genes FFA3/GPR41 y FFA2/GPR43 ($p=0.036$).

Clasificación de tratamientos según variabilidad de expresión génica

Condición (tratamiento)	GPR43/GPR41	GPR43/ABL1	GPR41/ABL1
Basal (n=6)	Heterogéneo CV>10%	Heterogéneo CV>10%	Heterogéneo CV>10%
Estimulado (n=2)	Homogéneo CV<10%	Homogéneo CV<10%	Homogéneo CV<10%

Tabla VIII: Los coeficientes de variación fueron clasificados según el criterio sugerido por GOMES et al. Considerando que valores de coeficiente de variación inferiores al 10% corresponden a una población homogénea.

5 Discusión de los Resultados

En la primera etapa de este trabajo se buscó desarrolló una metodología de purificación de Neutrófilos de muestras de sangre periférica. La elección de este método de aislamiento es muy importante ya que los PMN son el tejido en el cual se desea estudiar la presencia y expresión de los genes de interés. El método combinado Dextrán - Ficoll Hypaque resultó ser el más adecuado, con él se obtuvo mayor pureza de PMN y los resultados fueron homogéneos en todas las muestras tratadas. Se pudo corroborar que el mismo no presentó efectos adversos sobre la amplificación de los genes FFA3/GPR41, FFAR/GPR43, ACTB y ABL1, es decir, no hubo indicios de que el producto celular aislado posea componentes que interfieran en las reacciones de PCR. Nuestro diseño de método combinado permitió aislar PMN con un grado de pureza superior al 96%. Otros trabajos publicados utilizaron métodos similares, por ejemplo, en el artículo presentado por *Maqbool et al. 2011* se alcanzó una pureza de hasta 95%, pero el procedimiento incluyó una lisis de eritrocitos, sin diferenciar las distintas poblaciones leucocitarias. La eliminación de la lisis de eritrocitos acelera el proceso, a su vez facilita mantener la morfología y la viabilidad de las células. Esto fue confirmado por citometría de flujo, técnica que discrimina en forma precisa las distintas poblaciones celulares. El trabajo publicado por Oh et al. 2008, describe un protocolo de purificación que utilizó un sistema comercial para el aislamiento y purificación de PMN, este no demostró poseer ventajas sobre el método combinado propuesto en este trabajo. Adicionalmente, se pudo corroborar que este método no afecta la integridad de los ácidos nucleicos, lo cual es de suma importancia para el análisis de expresión de los genes de interés del presente trabajo.

El método de extracción de ácidos nucleicos seleccionado resultó ser adecuado para los requerimientos de este trabajo. Se pudo verificar que la tecnología del sistema *MagNa Pure de Roche Diagnostics* permite extraer y purificar ácidos nucleicos con un rendimiento aceptable y libre de contaminación con proteínas. La incubación con DNAsa I de los productos de ARN purificados permitió extraer ARNm libre de contaminación de ADN. Esto pudo corroborarse en las reacciones de PCR y qPCR, en las cuales se utilizó ARN sin retrotranscribir como control negativo de reacción (NTC).

La reacción de retrotranscripción se puede llevar a cabo bajo diferentes condiciones. Se evaluaron tres condiciones diferentes, siendo la desarrollada exclusivamente para este trabajo la más apta para cumplir los objetivos propuestos. Las condiciones establecidas permitieron obtener mejor rendimiento de síntesis de ADNc. Resultó de suma utilidad

encontrar un método de RT óptimo, para luego cuantificar los ARNm por PCR en tiempo real. En este trabajo, se pudo corroborar que el método más adecuado es aquel que permita obtener un mayor rendimiento de ADNc a partir de ARNm extraído de PMN, evitando contaminar la muestra con exceso de reactivos que puedan interactuar negativamente con las reacciones de PCR posteriores.

El uso de Sybr Green en las reacciones de qPCR, si bien tiene como ventaja un bajo costo y amplio rendimiento, no es capaz de generar señales específicas para las secuencias de interés. Por esta razón, es necesario verificar la especificidad de la reacción, para así, descartar la cuantificación de un producto de PCR no deseado. En este trabajo se pudo poner a punto la metodología de PCR en tiempo real y corroborar que la misma posee la especificidad requerida para el uso de agentes intercalantes como el Sybr Green. Esto se pudo verificar realizando, sobre cada producto de PCR obtenido, un análisis de temperatura de fusión de alta resolución, también conocido como curva de melting. Cada producto de PCR posee una temperatura de fusión (T_m) propia que lo caracteriza. Mediante el uso de curvas de melting se pudo verificar que cada uno de estos productos de PCR se desnaturaliza a su valor de temperatura teórico. A su vez, la ausencia de picos secundarios indicó que la reacción de qPCR no generó dímeros de primers ni otros productos no deseados, los cuales podrían interferir en la medición de fluorescencia durante la reacción, obteniéndose valores que no corresponden con la cantidad de copias de gen presentes en la muestra (Figura 20). Las curvas de melting demostraron que cada fragmento de ADN amplificado posee una única T_m , la cual es independiente de la cantidad de muestra utilizada y cuyo valor se aproxima al valor teórico esperado para cada secuencia. La especificidad de las reacciones de PCR, ya sean de punto final o en tiempo real, fue corroborada de forma visual mediante electroforesis en geles de agarosa, observando en cada producto de PCR las bandas correspondientes a los tamaños moleculares esperados. Se pudo verificar que las secuencias obtenidas por PCR de punto final, corresponden efectivamente a los sitios de unión a ligando de FFA3/GPR41 y FFA2/GPR43, realizando reacciones de PCR anidadas (Nested PCR) con los primers utilizados en las qPCR, los cuales son complementarios a las regiones amplificadas en el round inicial.

El uso de curvas de calibración, no sólo permitió determinar los valores paramétricos de la reacción, necesarios para el cálculo de los resultados, sino que también permitió corroborar los rangos dinámicos y lineales de las reacciones de PCR en tiempo real, dentro de

los cuales el uso de Sybr Green es adecuado. El uso de calibraciones de 5 y de 6 puntos permite obtener, en el primer caso, curvas con un excelente coeficiente de determinación que se traducen en cuantificaciones de exactitud superior, y en el segundo caso, a expensas de la pérdida de dicha exactitud, un mayor rango dinámico lineal que mejora considerablemente la sensibilidad del ensayo.

Actualmente, el uso de curvas de calibración derivadas de productos de PCR se encuentra ampliamente difundido y presente en la literatura científica (Øvstebø et al. 2003). Su preparación, relativamente simple y económica, permite obtener soluciones patrón aplicables para cualquier reacción de PCR que contenga primers comprendidos dentro de la secuencia amplificada. Esta herramienta es sumamente útil cuando no existen soluciones calibradoras comerciales o no se dispone de las herramientas moleculares requeridas para desarrollar otras alternativas, como los calibradores derivados de plásmidos (Applied Biosystems by Life Technologies n.d.). En contrapartida a las ventajas de este tipo de solución patrón, o calibrador, existe una serie de desventajas que deben ser consideradas. Es aconsejable que dichos productos de PCR sean purificados previo a su cuantificación, preferentemente aislando la banda correspondiente a la secuencia de interés desde un gel de agarosa o poliacrilamida. Esto permite eliminar cualquier reactivo de la reacción de PCR previa que pueda interferir en futuras reacciones, así como también sub-productos no deseados como dímeros de primers o secuencias inespecíficas que puedan alterar la cuantificación del producto obtenido o interactuar con los reactivos de las reacciones posteriores. La cuantificación de los productos purificados debe realizarse con el método más preciso que se disponga, siendo las opciones más adecuadas la fluorimetría o el análisis de fragmentos por electroferénesis capilar. Esta última alternativa permite cuantificar ácidos nucleicos con precisión y a su vez, permite detectar productos no deseados con mayor sensibilidad que los geles de agarosa o poliacrilamida (Beaubier et al. 2000).

Los patrones de expresión basal de FFA3/GPR41 y FFA2/GPR43 observados en este trabajo se encuentran en concordancia con los resultados de los trabajos de Brown et al. 2003 y Le Poul et al. 2003, los cuales describieron niveles de expresión de FFA2/GPR43 superiores a los de FFA3/GPR41. Como indica el trabajo de Le Poul et al. 2003, FFA2/GPR43 se expresa principalmente en las poblaciones de leucocitos, en particular los neutrófilos, mientras que la expresión de FFA3/GPR41 se distribuye más ampliamente en otros tejidos, es por eso que se observa una mayor expresión de FFA2/GPR43 con respecto a la FFA3/GPR41,

siendo los neutrófilos el tejido elegido para este estudio. Cabe destacar, que si bien en todas las muestras analizadas la expresión basal de FFA2/GPR43 fue superior a la de FFA3/GPR41, no se observó un patrón de expresión homogéneo de estos, ni entre sí, ni respecto al gen de referencia ABL1. Posiblemente esta observación se disipe al estudiar una población de mayor tamaño, donde los valores observados podrían adquirir una distribución normal.

Los ensayos de estimulación con AGCC, puntualmente con ácido acético, arrojaron resultados estadísticamente significativos, sugiriendo una posible respuesta fisiológica reguladora de la expresión de los ARNm de FFA3/GPR41 y FFA2/GPR43 mediada por este AGCC ($p=0.036$). Si bien, en la actualidad los AGCC han sido descritos como moduladores de la expresión génica y se sabe que una de sus vías de acción es por medio de la familia de receptores GPR, aún no se comprenden adecuadamente los mecanismos y efectos de este fenómeno (Georgiadi and Kersten 2012). Los resultados obtenidos en los ensayos de estimulación sugieren que el ácido acético altera los patrones de expresión de los receptores estudiados en este trabajo. Repetir dichos ensayos en un mayor número de muestras, no sólo con ácido acético, sino también con los ácidos propiónico y butírico, permitirá ajustar las observaciones realizadas, ampliando así, la comprensión sobre los mecanismos de regulación de la expresión génica mediados por AGCC.

6 Conclusiones

Los ensayos realizados permitieron determinar que el método de purificación y aislamiento de PMN combinado es la herramienta más adecuada para la obtención de Leucocitos Polimorfonucleares. Las células obtenidas de esta manera resultaron ser viables, es decir, aptas para utilizarse en cultivos celulares. También se pudo verificar que este método es compatible con las herramientas de biología molecular utilizadas en este trabajo. Finalmente se puede concluir que el método Dextrán – Ficoll Hypaque permite aislar PMN con una pureza lo suficientemente alta para los requerimientos de los análisis de expresión génica realizados.

Se pudo verificar que para obtener un mejor rendimiento de ADNc a partir de ARNm es necesario utilizar la mayor cantidad de muestra posible, junto con una excedente de reactivos en solución, principalmente cuando el método de extracción de ARN ofrece una excelente pureza pero un bajo rendimiento.

Finalmente se logró poner a punto la metodología molecular seleccionada para este trabajo, la PCR en tiempo real, para analizar los niveles de expresión de los genes de interés FFA3/GPR41 y FFA2/GPR43, tomando como gen de referencia al ABL1. El proceso de diseño y puesta a punto de las reacciones de PCR en tiempo real, siguiendo las pautas de *MIQE guidelines*, garantizó que éstas cumplan con los requerimientos de reproducibilidad, repetitividad y exactitud, necesarios para un adecuado análisis de expresión génica.

Los objetivos, principal y secundario, se cumplieron al desarrollar un procedimiento integral. Este procedimiento consiste en aislar las células de interés para luego, mediante una serie de herramientas moleculares, obtener datos que permitan describir, a nivel transcripcional, el comportamiento de los genes FFA3/GPR41 y FFA2/GPR43 en Leucocitos Polimorfonucleares. El mismo da lugar a las bases para futuras investigaciones relacionadas a tratamientos específicos de patologías que involucran al FFA3/GPR41 y FFA2/GPR43.

La concordancia de resultados con la literatura científica refuerza las evidencias existentes respecto a los mecanismos de expresión génica de estos receptores de AGCC. Los resultados obtenidos en los ensayos de estimulación con ácido acético aportan mayor profundidad a dichos conocimientos, sugiriendo un posible mecanismo de regulación de estos genes. Para ajustar estas observaciones se sugiere estudiar una población de mayor tamaño junto con los AGCC restantes, el ácido propiónico y butírico.

7 Glosario

AGCC: Ácidos Grasos de Cadena Corta

ABL1: Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1

AMPc: Adenosín Monofosfato Cíclico

ATP: Adenosín trifosfato

Ca²⁺: Ion Calcio

CV: Coeficiente de variación

DAG: Diacilglicerol

EDTA: Etilendiaminotetraacético

FC: Fold change

FFA2/GPR43: Free fatty acid receptor 2

FFA3/GPR41: Free fatty acid receptor 3

GDP: Guanosín difosfato

GPR: Receptores ligados a proteína G

GPR41: Receptor de ácidos grasos 3

GPR43: Receptor de ácidos grasos 2

GTP: Guanosintrifosfato

HBBS: Buffer Salino Balanceado de Hanks

IP₃: Inositol Trifosfato

L-FC: Log – Fold change

PCR: Reacción en cadena de polimerasa

Pi: Fosforo Inorgánico

PIP₂: Fosfatidilinositol Bifosfato

PKA: Proteina Kinasa A

PMN: Leucocitos Polimorfonucleares

qPCR: Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa o en tiempo real

RT: Retrotranscripción

7TM: 7 dominios transmembrana característicos de las GPR

8 Bibliografía

- Abdullah, Murdani, and M. Adi Firmansyah 2013 "*Clinical Approach and Management of Chronic Diarrhea*". *Acta Medica Indonesiana* 45(2): 157–165.
- Aguilera, Penélope, Martha Ruiz Tachiquín, Martha Graciela Rocha Munive, Benjamín Pineda Olvera, and Y. María Elena Chánez Cárdenas 2014 "*PCR En Tiempo Real*". [En línea][Consultado 3 Ago 2016] <https://www.researchgate.net/publication/259042551_PCR_en_tiempo_real>.
- Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, et al. 2002 "*Molecular Biology of the Cell*". 4th edition. Garland Science.
- Amabile, Giovanni, Annalisa Di Ruscio, Fabian Müller, et al. 2015 "*Dissecting the Role of Aberrant DNA Methylation in Human Leukaemia*". *Nature Communications* 6: 7091.
- Applied Biosystems by Life Technologies N.d. [En línea][Consultado 23 Nov 2016] <<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home.html>>
- Araç, Demet, Antony A Boucard, Marc F Bolliger, et al. 2012 "*A Novel Evolutionarily Conserved Domain of Cell-Adhesion GPCRs Mediates Autoproteolysis: Cell-Adhesion GPCRs Mediates Autoproteolysis*". *The EMBO Journal* 31(6): 1364–1378.
- Beaubier, N. T., A. P. Hart, C. Bartolo, C. L. Willman, and D. S. Viswanatha 2000 "*Comparison of Capillary Electrophoresis and Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Evaluation of T and B Cell Clonality by Polymerase Chain Reaction*". *Diagnostic Molecular Pathology: The American Journal of Surgical Pathology, Part B* 9(3): 121–131.
- Bindels, Laure B., Evelyne M. Dewulf, and Nathalie M. Delzenne 2013 "*GPR43/FFA2: Physiopathological Relevance and Therapeutic Prospects*". *Trends in Pharmacological Sciences* 34(4): 226–232.
- Brown, Andrew J., Susan M. Goldsworthy, Ashley A. Barnes, et al. 2003 "*The Orphan G Protein-Coupled Receptors GPR41 and GPR43 Are Activated by Propionate and Other Short Chain Carboxylic Acids*". *Journal of Biological Chemistry* 278(13): 11312–11319.
- Bustin, S. A., V. Benes, T. Nolan, and M. W. Pfaffl 2005 "*Quantitative Real-Time RT-PCR--a Perspective*". *Journal of Molecular Endocrinology* 34(3): 597–601.
- Bustin, Stephen A., Vladimir Benes, Jeremy A. Garson, et al. 2009 "The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments". *Clinical Chemistry* 55(4): 611–622.
- Couto, Mauricio Farias, Luiz Alexandre Peternelli, and Márcio Henrique Pereira Barbosa 2013 "*Classification of the Coefficients of Variation for Sugarcane Crops*". *Ciência Rural* 43(6): 957–961.

- Covington, D. K., C. A. Briscoe, A. J. Brown, and C. K. Jayawickreme 2006 "*The G-Protein-Coupled Receptor 40 Family (GPR40–GPR43) and Its Role in Nutrient Sensing*". *Biochemical Society Transactions* 34(5): 770–773.
- Cummings, JH 1981 "*Short Chain Fatty Acids in the Human Colon*". *Gut* 22(9): 763–779.
- Dass, N. B., A. K. John, A. K. Bassil, et al. 2007 "*The Relationship between the Effects of Short-Chain Fatty Acids on Intestinal Motility in Vitro and GPR43 Receptor Activation*". *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 19(1): 66–74.
- "*Diarrea Crónica. Diagnóstico Y Evaluación Clínica*" 2004 *Revista Colombiana de Gastroenterología* 19(2): 115–126.
- "*Enfermedades Diarréicas [ACG Patients]*". [En línea][Consultado 25 de mayo 2016] <<http://patients.gi.org/recursos-en-espanol/enfermedades-diarreicas/>>.
- Erbayrak, Mustafa, Cansel Turkay, Elife Eraslan, et al. 2009 "*The Role of Fecal Calprotectin in Investigating Inflammatory Bowel Diseases*". *Clinics (Sao Paulo, Brazil)* 64(5): 421–425.
- Ferreira, Caroline Marcantonio, Angélica Vieira, Lica Thomaz, et al. 2014 "*The Central Role of the Gut Microbiota in Chronic Inflammatory Diseases*". *Journal of Immunology Research* 2014: e689492.
- Fournier, B. M., and C. A. Parkos "2012 *The Role of Neutrophils during Intestinal Inflammation*". *Mucosal Immunology* 5(4): 354–366.
- "*Gene Quantification & Real-Time PCR Dyes and Chemistries*" [En línea][Consultado 2 Ago 2016]. <<http://www.gene-quantification.de/chemistry.html>>
- Georgiadi, Anastasia, and Sander Kersten 2012 "*Mechanisms of Gene Regulation by Fatty Acids*". *Advances in Nutrition: An International Review Journal* 3(2): 127–134.
- GOMES, F.P. 2009 "*Curso de estatística experimental*". 15.ed. Piracicaba: Esalq, 477p.
- Hughes, Timothy, Michael Deininger, Andreas Hochhaus, et al. 2006 "*Monitoring CML Patients Responding to Treatment with Tyrosine Kinase Inhibitors: Review and Recommendations for Harmonizing Current Methodology for Detecting BCR-ABL Transcripts and Kinase Domain Mutations and for Expressing Results*". *Blood* 108(1): 28–37.
- Karaki, Shin-ichiro, Retsu Mitsui, Hisayoshi Hayashi, et al. 2006 "*Short-Chain Fatty Acid Receptor, GPR43, Is Expressed by Enteroendocrine Cells and Mucosal Mast Cells in Rat Intestine*". *Cell and Tissue Research* 324(3): 353–360.

- Karaki, Shin-Ichiro, Hideaki Tazoe, Hisayoshi Hayashi, et al. 2008 "*Expression of the Short-Chain Fatty Acid Receptor, GPR43, in the Human Colon*". *Journal of Molecular Histology* 39(2): 135–142.
- Kimura, Ikuo, Daisuke Inoue, Kanako Hirano, and Gozoh Tsujimoto 2014 "The SCFA Receptor GPR43 and Energy Metabolism". *Diabetes* 5: 85.
- Kobilka, Brian K. 2007 "*G Protein Coupled Receptor Structure and Activation. Biochimica et Biophysica*" *Acta* 1768(4): 794–807.
- Tamay de Dios, Ibarra C, and Velasquillo C 2013 "*Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*". *Investigación en Discapacidad* 2(2): 70–78.
- Le Poul, Emmanuel, Cécile Loison, Sofie Struyf, et al. 2003 "*Functional Characterization of Human Receptors for Short Chain Fatty Acids and Their Role in Polymorphonuclear Cell Activation*". *Journal of Biological Chemistry* 278(28): 25481–25489.
- Leal, D. H. V., Faria Filho, D. E. De, and E. M. B. Oliveira 2014 Classification of the Coefficients of Variation of Parameters Evaluated in Japanese Quail Experiments. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 16(2): 97–100.
- Limsui, David, Darrell S. Pardi, Michael Camilleri, et al. 2007 "*Symptomatic Overlap between Irritable Bowel Syndrome and Microscopic Colitis*". *Inflammatory Bowel Diseases* 13(2): 175–181.
- Lodish, Harvey, Arnold Berk, S. Lawrence Zipursky, et al. 2000 "*G Protein –Coupled Receptors and Their Effectors*". [En línea][Consultado 28 may 2016]. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21718/>>.
- Low, Wan Shi, and Wan Abu Bakar Wan Abas 2015 "*Benchtop Technologies for Circulating Tumor Cells Separation Based on Biophysical Properties*". *BioMed Research International* 2015. [En línea][Consultado 17 junio 2016]. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4419234/>>.
- Maqbool, M., S. Vidyadaran, E. George, and R. Ramasamy 2011 "Optimisation of Laboratory Procedures for Isolating Human Peripheral Blood Derived Neutrophils". *The Medical Journal of Malaysia* 66(4): 296–299.
- Maslowski, Kendle M., Angelica T. Vieira, Aylwin Ng, et al. 2009 "*Regulation of Inflammatory Responses by Gut Microbiota and Chemoattractant Receptor GPR43*". *Nature* 461(7268): 1282–1286.
- Millar, Robert P., and Claire L. Newton 2010 "*The Year In G Protein-Coupled Receptor Research*". *Molecular Endocrinology* 24(1): 261–274.

- Oh, Hana, Brian Siano, and Scott Diamond 2008 "Neutrophil Isolation Protocol". *Journal of Visualized Experiments*.
- Øvstebø, Reidun, Kari Bente Foss Haug, Knut Lande, and Peter Kierulf 2003 "PCR-Based Calibration Curves for Studies of Quantitative Gene Expression in Human Monocytes: Development and Evaluation". *Clinical Chemistry* 49(3): 425–432.
- Pardi, Darrell S., and Ciarán P. Kelly 2011 "*Microscopic Colitis*". *Gastroenterology* 140(4): 1155–1165.
- Prizont, Dr Roberto, and Nancy Konigsberg 1981 "*Identification of Bacterial Glycosidases in Rat Cecal Contents*". *Digestive Diseases and Sciences* 26(9): 773–777.
- Qin, Junjie, Ruiqiang Li, Jeroen Raes, et al. 2010 "*A Human Gut Microbial Gene Catalog Established by Metagenomic Sequencing*". *Nature* 464(7285): 59–65.
- Said, Hyder, Yasutada Akiba, Izumi Kaji, and Jonathan D. Kaunitz 2016 "*FFA3 Activation Stimulates Duodenal Bicarbonate Secretion and Prevents NSAID-Induced Enteropathy via the GLP-2 Pathway in Rats*". *The FASEB Journal* 30 (1 Supplement): 1020.1-1020.1.
- Samuel, Buck S., Abdullah Shaito, Toshiyuki Motoike, et al. 2008 "*Effects of the Gut Microbiota on Host Adiposity Are Modulated by the Short-Chain Fatty-Acid Binding G Protein-Coupled Receptor, Gpr41*". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(43): 16767–16772.
- Sina, Christian, Olga Gavrilova, Matti Förster, et al. 2009 "*G Protein-Coupled Receptor 43 Is Essential for Neutrophil Recruitment during Intestinal Inflammation*". *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183(11): 7514–7522.
- Tang, Cong, Kashan Ahmed, Andreas Gille, et al. 2015 "*Loss of FFA2 and FFA3 Increases Insulin Secretion and Improves Glucose Tolerance in Type 2 Diabetes*". *Nature Medicine* 21(2): 173–177.
- Tang, Yong, Yakun Chen, Hongmei Jiang, Gregory T. Robbins, and Daotai Nie 2011 "*G-Protein-Coupled Receptor for Short-Chain Fatty Acids Suppresses Colon Cancer*". *International Journal of Cancer* 128(4): 847–856.
- Tazoe, H., Y. Otomo, I. Kaji, et al. 2008 "*Roles of Short-Chain Fatty Acids Receptors, GPR41 and GPR43 on Colonic Functions*". *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society* 59 Suppl 2: 251–262.
- Thermo Fisher Scientific, [En línea][Consultado 19 jun 2016].
<<http://www.thermofisher.com/ar/es/home.html>>

Ulven, Trond 2012 "*Short-Chain Free Fatty Acid Receptors FFA2/GPR43 and FFA3/GPR41 as New Potential Therapeutic Targets*". *Molecular and Structural Endocrinology* 3: 111.

Valasek, Mark A., and Joyce J. Repa 2005 "*The Power of Real-Time PCR*". *Advances in Physiology Education* 29(3): 151–159.

Vinolo, Marco A. R., G. John Ferguson, Suhasini Kulkarni, et al. 2011 "*SCFAs Induce Mouse Neutrophil Chemotaxis through the GPR43 Receptor*". *PLOS ONE* 6(6): e21205.

WHO | Diarrhoeal Disease, WHO. [En línea][Consultado 25 may 2016], <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>>.

Ye, Jian, George Coulouris, Irena Zaretskaya, et al. 2012 "*Primer-BLAST: A Tool to Design Target-Specific Primers for Polymerase Chain Reaction*". *BMC Bioinformatics* 13: 134.