VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Evaluación preanalítica y estandarización molecular de genes de interés renal en sedimento urinario de individuos sanos

Preanalytical evaluation and molecular standardization of renal genes of interest in urinary sediment from healthy individuals

Brayan González-Morales, Gabriela Guadalupe Flores-Gómez, Andreina González-Morales, Claudia Leticia Mendoza-Macías, Clara Alba-Betancourt, Itzel Natalia Ramírez-Montiel[1], Erick Jesse López-Cardona[3], Fátima Berenice Ramírez-Montiel[1].

[1]Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Guanajuato, México.
[2]Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Guanajuato, México.
[3]Departamento de Ingeniería Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Guanajuato, México.
fb.ramirez@ugto.mx

Resumen

El sedimento urinario constituye una fuente accesible y no invasiva de células y ácidos nucleicos que pueden emplearse para el estudio molecular de procesos glomerulares y tubulares. El objetivo de este trabajo fue evaluar aspectos preanalíticos asociados con la recuperación de ARN y establecer condiciones iniciales para la amplificación de genes de interés renal en sedimento urinario de individuos aparentemente sanos. Se recolectaron 13 muestras de orina; cuatro fueron excluidas por antecedentes clínicos o condiciones fisiológicas y nueve se analizaron mediante examen general de orina, microscopía y extracción de ARN con TRIzol. La cantidad de células epiteliales nucleadas observada en el sedimento fue variable. Seis de las nueve muestras presentaron bandas compatibles con los ARN ribosomales 28S y 18S y fueron utilizadas para la síntesis de ADNc. Posteriormente, se evaluó la amplificación de los genes *CUBN, B2M, LRP2, NPHS1, SYNPO* y *LCN2* mediante PCR punto final y gradientes de temperatura de alineamiento. Para *NPHS1* y *B2M* se obtuvieron productos compatibles con los tamaños esperados, mientras que *LCN2* presentó amplificación inespecífica. El transcrito de *SYNPO* fue detectado en dos de las seis muestras analizadas. En conjunto, los resultados muestran que el sedimento urinario puede proporcionar ARN adecuado para la detección cualitativa de genes relacionados con estructuras glomerulares y tubulares. Sin embargo, la recuperación del material fue variable y algunos oligonucleótidos requieren mayor optimización antes de su aplicación en estudios cuantitativos.

Palabras clave: Sedimento urinario; PCR punto final; genes de interés renal; fase preanalítica.

La orina como fuente de información molecular

La enfermedad renal crónica constituye un problema de salud pública debido a su progresión frecuentemente silenciosa y a las complicaciones asociadas con la pérdida irreversible de la función renal. Su evaluación clínica se basa principalmente en la tasa de filtración glomerular estimada, la albuminuria y otros indicadores obtenidos mediante análisis de sangre y orina. Aunque estas herramientas son indispensables para la clasificación y el seguimiento de los pacientes, existe interés en desarrollar aproximaciones moleculares complementarias que permitan estudiar cambios celulares relacionados con la función renal (Kidney Disease: Improving Global Outcomes [KDIGO], 2024).

La orina representa una muestra atractiva para este propósito debido a que su obtención es sencilla, no invasiva y permite recolectar volúmenes relativamente grandes. Además de componentes solubles, contiene vesículas extracelulares, células y ácidos nucleicos que pueden aportar información sobre procesos fisiológicos y patológicos. El sedimento obtenido mediante centrifugación concentra células epiteliales descamadas, leucocitos, eritrocitos y otros elementos que pueden proporcionar ARN para el análisis de genes

relacionados con funciones glomerulares y tubulares mediante RT-PCR (Barau *et al.,* 2022; Suthanthiran *et al.,* 2013; Zainabadi *et al.,* 2019).

Sin embargo, la composición de la orina puede variar entre individuos e incluso en una misma persona de acuerdo con el estado de hidratación, el momento de recolección, la actividad física y la descamación fisiológica del tracto urinario. Por ello, la cantidad y calidad del material molecular recuperado dependen tanto de la celularidad de la muestra como de las condiciones utilizadas para su recolección y procesamiento.

El sedimento urinario y su caracterización

Antes del análisis molecular es necesario caracterizar la muestra mediante el examen general de orina y la observación microscópica del sedimento. Estas evaluaciones permiten identificar células epiteliales, eritrocitos, leucocitos, cilindros, cristales, microorganismos y otros elementos, además de reconocer posibles alteraciones o contaminación.

Las células epiteliales nucleadas constituyen una posible fuente de ARN; no obstante, su presencia no indica que todo el material sea de origen renal, ya que algunas células pueden proceder de la uretra distal o de la región genital. Asimismo, en individuos aparentemente sanos la celularidad puede ser reducida y el pellet obtenido después de la centrifugación puede resultar poco visible. Por esta razón, la ausencia de un sedimento evidente no necesariamente implica la ausencia total de células o ARN, aunque puede anticipar un bajo rendimiento durante la extracción (Kouri *et al.,* 2024).

Los genes de interés renal participan en procesos como la integridad de la barrera de filtración glomerular, la reabsorción tubular y la respuesta celular al estrés. Sin embargo, su detección requiere no solo condiciones adecuadas de amplificación, sino también que las células se conserven durante el procesamiento y que el ARN mantenga una integridad suficiente para la síntesis de ADN complementario.

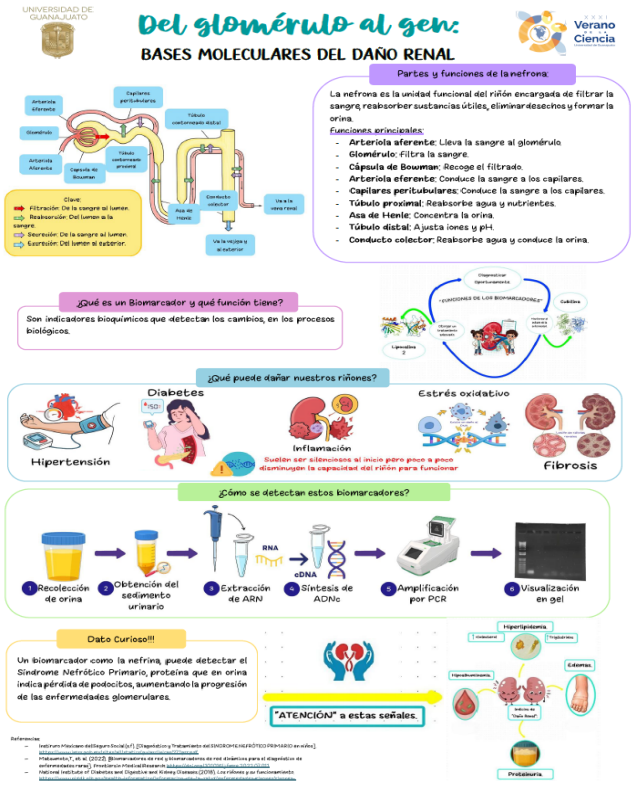


Figura 1. Del glomérulo al gen: bases moleculares del daño renal. Fuente: diseño de los autores.

Antes de la PCR: la importancia de la etapa preanalítica

La etapa preanalítica comprende las condiciones que anteceden al análisis molecular, desde la preparación del participante y la recolección de la orina hasta su transporte, centrifugación, conservación y almacenamiento. Variables como el tipo de micción, el aseo previo, el volumen recolectado, el tiempo antes del procesamiento, la temperatura, la velocidad de centrifugación y el manejo del sedimento pueden modificar la recuperación del ARN.

La primera orina de la mañana suele utilizarse por encontrarse más concentrada, mientras que la técnica de chorro medio y el aseo previo ayudan a disminuir la incorporación de células y microorganismos externos. No obstante, la selección del tipo de muestra no sustituye la necesidad de estandarizar el volumen, el tiempo y las condiciones de procesamiento.

El ARN es especialmente susceptible a la degradación por ribonucleasas, por lo que el tiempo transcurrido entre la recolección y la extracción resulta crítico. El almacenamiento prolongado, el crecimiento microbiano y los ciclos de congelación y descongelación también pueden afectar su integridad (Bosschieter *et al.,* 2018; Kouri *et al.,* 2024).

La centrifugación es uno de los métodos más utilizados para concentrar las células urinarias, aunque requiere controlar cuidadosamente el volumen, la velocidad, el tiempo y la eliminación del sobrenadante. La filtración constituye una alternativa para procesar mayores volúmenes, pero ambas estrategias recuperan fracciones con características distintas. Por ello, debe especificarse si se analizó el sedimento, el material retenido en un filtro, el sobrenadante u otra fracción urinaria (Snopkowski *et al.,* 2021; Djomnang *et al.,* 2024).

Del ARN a la amplificación molecular

Una vez recuperado, el ARN se convierte en ADN complementario mediante retrotranscripción y posteriormente se utiliza como molde para amplificar genes específicos. Su integridad puede evaluarse cualitativamente mediante electroforesis en gel de agarosa; en células humanas, la presencia de bandas compatibles con los ARN ribosomales 28S y 18S, sin un arrastre extenso, se considera indicativa de que no existe degradación evidente.

La estandarización de la PCR incluye la evaluación de diferentes temperaturas de alineamiento y la verificación del tamaño de los productos mediante electroforesis. La obtención de una banda del tamaño esperado indica que el material recuperado pudo utilizarse como molde, aunque este resultado no constituye por sí mismo una validación diagnóstica. Para ello se requieren análisis cuantitativos, un mayor número de muestras, evaluación de la reproducibilidad y comparación entre grupos clínicos.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar factores preanalíticos asociados con la recuperación de ARN a partir del sedimento urinario de voluntarios aparentemente sanos, caracterizar las muestras mediante examen general de orina y observación microscópica, y establecer condiciones iniciales para la amplificación de genes de interés renal mediante la evaluación de diferentes temperaturas de alineamiento.

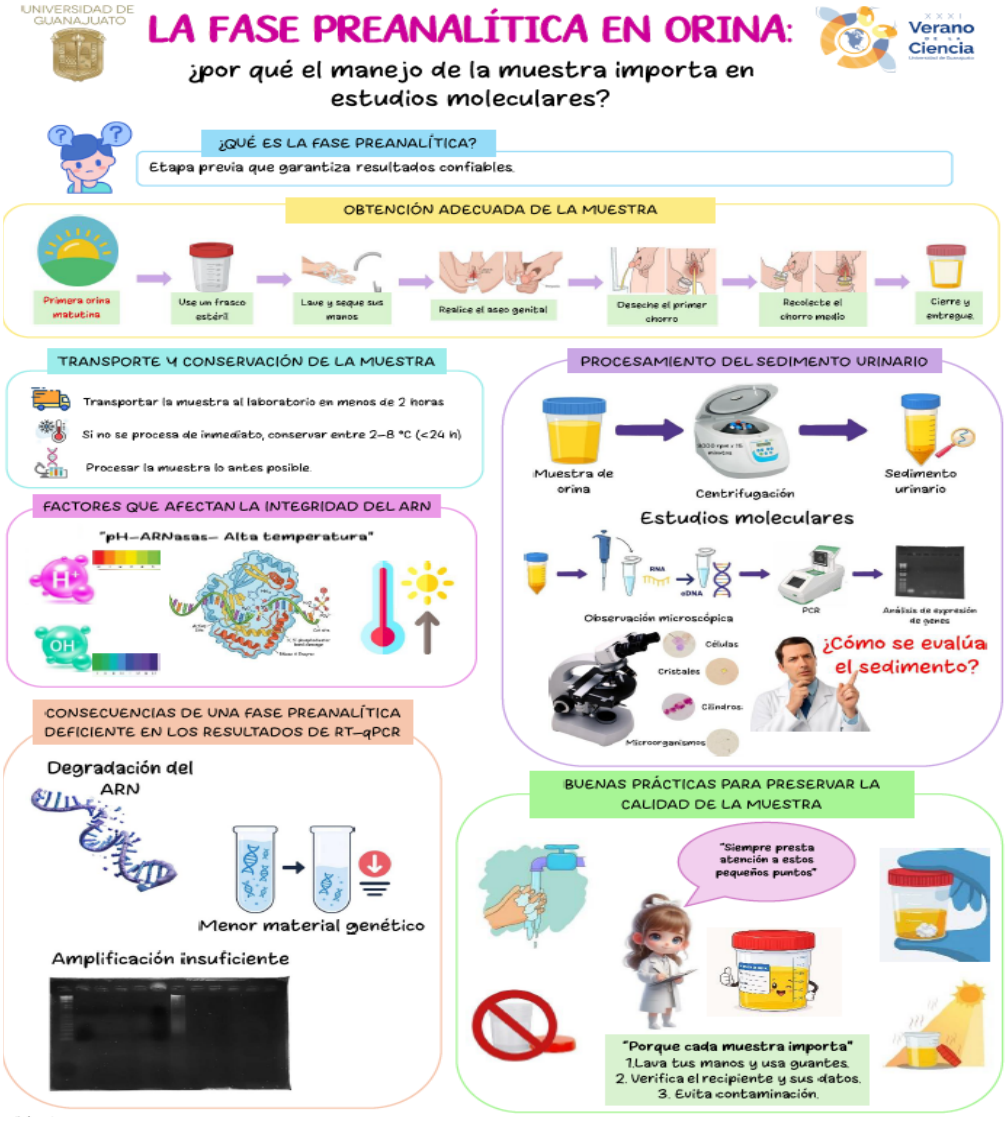


Figura 2. *La fase preanalítica en orina: por qué el manejo de la muestra importa en estudios moleculares. Fuente: diseño de los autores.*

Metodología

Selección y recolección de las muestras

Se recolectaron muestras de orina de 13 voluntarios mayores de edad pertenecientes a la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato. Todos participaron voluntariamente y firmaron el consentimiento informado. El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética para la Investigación de la Universidad de Guanajuato, con el registro CEPIUG-P39-2025. Se excluyeron tres participantes con enfermedad metabólica. Las nueve muestras restantes fueron utilizadas para el estudio.

Se solicitó la primera orina de la mañana, recolectada mediante aseo previo y técnica de chorro medio en recipientes estériles. Las muestras se transportaron a temperatura ambiente y se procesaron en un periodo máximo de una hora después de su recolección.

Examen general de orina y evaluación microscópica

Las muestras se analizaron mediante tiras reactivas URS-14, siguiendo los tiempos de lectura indicados en el envase. Para la observación del sedimento se centrifugaron 10 mL de orina a 3,500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.

El sedimento se resuspendió en aproximadamente 50 µL, se tiñó con Sternheimer-Malbin y se observó en un microscopio Carl Zeiss Primo Star iLED a un aumento total de 400×. Se examinaron cinco campos por muestra y se seleccionaron aquellas que presentaron parámetros urinarios sin alteraciones aparentes y entre 5 y 10 células epiteliales nucleadas por campo.

Extracción y evaluación del ARN

Para recuperar el sedimento celular se centrifugaron 10 mL de orina a 3,500 rpm durante 15 minutos a 4 °C. El sedimento se lavó con PBS y el ARN total se extrajo mediante TRIzol Reagent (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. La integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TAE 1X. Los geles se corrieron a 50 V durante 45 minutos y se documentaron en un sistema UVP. La presencia de las bandas ribosomales 28S y 18S se utilizó como indicador cualitativo de integridad.

Síntesis de ADNc

El ARN obtenido se utilizó para sintetizar ADN complementario mediante SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen), utilizando oligo(dT) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad del ADNc se verificó mediante la amplificación del gen constitutivo Actina.

Amplificación de genes de interés renal

Los oligonucleótidos se diseñaron mediante OligoPerfect Designer y fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies. Se evaluaron oligonucleótidos dirigidos a genes de interés renal y al gen constitutivo *Actina*. Las reacciones de PCR se realizaron con GoTaq DNA Polymerase (Promega), en un volumen final de 10 µL, empleando 35 ciclos y temperaturas de alineamiento entre 57 y 60 °C. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). Se utilizó ADN genómico como control positivo y agua libre de nucleasas como control negativo. Todas las reacciones se realizaron por duplicado.

Resultados y Discusión

Selección de genes de interés renal

Como primera etapa del estudio, se seleccionaron seis genes relacionados con estructuras y funciones glomerulares y tubulares: *CUBN*, *B2M*, *LRP2*, *LCN2*, *NPHS1* y *SYNPO*. La selección se realizó considerando la localización de las proteínas codificadas, su participación en la filtración glomerular o en la reabsorción tubular y su posible detección en material celular recuperado del sedimento urinario. Los genes *CUBN*, *B2M* y *LRP2* se relacionan principalmente con procesos de reabsorción en el túbulo proximal, mientras que *NPHS1* y *SYNPO* se asocian con la estructura y estabilidad de los podocitos y de la barrera de filtración glomerular.

CUBN y *LRP2* codifican receptores que participan de manera coordinada en la recuperación de proteínas y otras moléculas filtradas en el túbulo proximal. *B2M* se incluyó debido a que la β2-microglobulina es filtrada en el glomérulo y reabsorbida principalmente en el túbulo proximal. Por otra parte, *NPHS1* y *SYNPO* se relacionan con la estructura y estabilidad de los podocitos y de la barrera de filtración glomerular. Finalmente, *LCN2* se seleccionó por su relación con la respuesta tubular al estrés y la lesión renal. Las características principales de los genes evaluados se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. *Genes seleccionados para la evaluación molecular en sedimento urinario.*

Gen	Proteína codificada	Función y relevancia
CUBN	Cubilina	Receptor endocítico que participa en la reabsorción de albúmina, transferrina, proteínas transportadoras de vitaminas y otras moléculas filtradas. Actúa en conjunto con la megalina.
B2M	β2-microglobulina	Componente del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I. Su incremento en orina puede relacionarse con una alteración en la reabsorción tubular proximal.
LRP2	Megalina o proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 2	Receptor endocítico multiligando que recupera proteínas, hormonas, vitaminas y otras moléculas presentes en el filtrado glomerular. Trabaja de manera coordinada con la cubilina.
NPHS1	Nefrina	Proteína esencial de la barrera de filtración glomerular. Contribuye a limitar el paso de albúmina y otras macromoléculas hacia la orina y se utiliza como marcador de integridad podocitaria.
SYNPO	Sinaptopodina	Proteína asociada con el mantenimiento de la forma, estabilidad y arquitectura de los podocitos. Se utiliza como marcador de diferenciación e integridad podocitaria.
LCN2	Lipocalina 2 o NGAL	Participa en la respuesta inmunitaria y en el metabolismo del hierro. Su expresión aumenta durante el estrés o daño tubular, por lo que se utiliza como biomarcador de lesión renal, especialmente de lesión renal aguda.

Selección y caracterización de las muestras de orina

Se recolectaron 13 muestras de orina de voluntarios mayores de edad. Después de revisar los antecedentes personales y las condiciones fisiológicas de los participantes, se excluyeron cuatro muestras de dos personas con enfermedades metábolicas. Las nueve muestras restantes fueron analizadas mediante examen general de orina, observación microscópica y extracción de ARN. El flujo de selección y procesamiento de las muestras se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. *Flujo de selección y procesamiento de las muestras de orina.*

Etapa del estudio	Número de muestras
Muestras recolectadas	13
Muestras excluidas por antecedentes o condiciones fisiológicas	4
Muestras analizadas mediante EGO, microscopía y extracción de ARN	9
Muestras con ARN de integridad para síntesis de ADNc	6

El examen general de orina no mostró alteraciones aparentes en las muestras seleccionadas. Mediante la observación microscópica se identificó una cantidad variable de células epiteliales nucleadas y una cantidad baja de leucocitos. En la Figura 3 se muestran imágenes representativas del sedimento urinario teñido con Sternheimer-Malbin.

ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

La variabilidad celular observada resulta relevante para el análisis molécular, ya que un EGO sin alteraciones no implica que todas las muestras contengan la misma cantidad o los mismos tipos celulares. En individuos aparentemente sanos, la recuperación de material genético puede depender de la descamación fisiológica del tracto urinario y de la cantidad de sedimento obtenido durante la centrifugación.

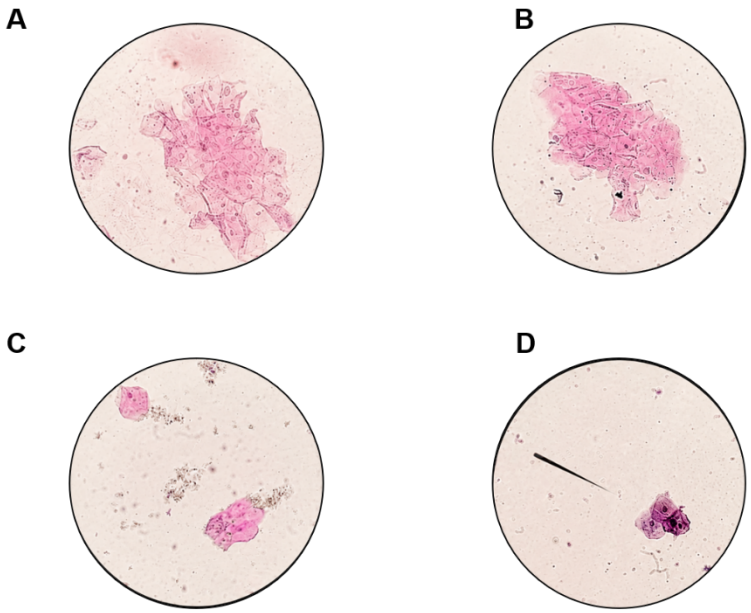


Figura 3. *Variabilidad celular observada en el sedimento urinario. Microfotografías representativas del sedimento urinario teñido con Sternheimer-Malbin y observado a 400×. A y B) Campos con mayor presencia de células epiteliales nucleadas. C) Campo con menor número de células y presencia de otros elementos del sedimento. D) Campo con baja celularidad. La cantidad de células observadas varió entre las muestras analizadas.*

Recuperación e integridad del ARN del sedimento urinario

Después de la extracción con TRIzol, seis de las nueve muestras presentaron dos bandas definidas compatibles con los ARN ribosomales 28S y 18S, patrón esperado para ARN total de células humanas y sin degradación evidente (Figura 4). Estas muestras se consideraron cualitativamente adecuadas para continuar con la síntesis de ADNc. En las tres muestras restantes se observó una señal difusa y pérdida de definición de las bandas ribosomales, compatible con degradación parcial del ARN y/o baja integridad del material recuperado (Figura 4). Debido a este patrón, estas muestras no fueron utilizadas en las etapas posteriores de síntesis de ADNc y amplificación molecular.

En conjunto seis de las nueve muestras procesadas equivalente al 66.7% proporcionaron un ARN con integridad aparente suficiente para continuar con el análisis. Las diferencias pudieron estar relacionadas con la celularidad inicial, el tamaño reducido del sedimento, la pérdida de material durante la eliminación del sobrenadante o la degradación ocurrida durante el procesamiento.

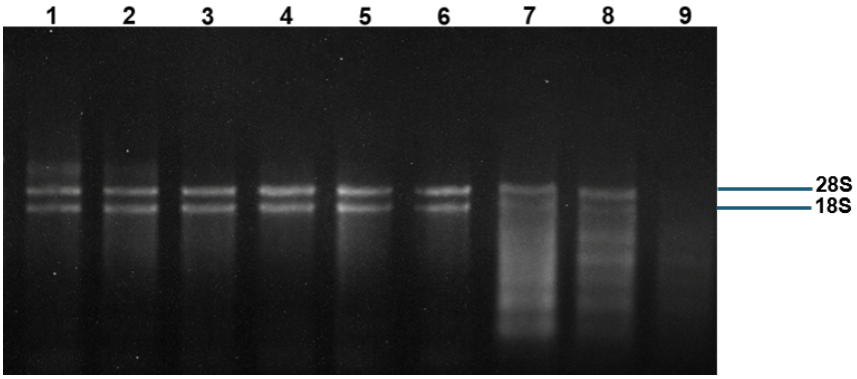


Figura 4. Evaluación cualitativa del ARN total obtenido a partir del sedimento urinario. El ARN recuperado de nueve muestras se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Los carriles 1–6 presentaron dos bandas definidas compatibles con los ARN ribosomales 28S y 18S, mientras que los carriles 7–9 mostraron pérdida de definición y un patrón difuso compatible con degradación parcial o baja integridad del ARN. La banda superior corresponde al ARN 28S y la inferior al ARN 18S.

Control de contaminación con ADN genómico y síntesis de ADN complementario

Para evaluar la posible ausencia de ADN genómico contaminante, el ARN obtenido se utilizó directamente como molde en una reacción de PCR. No se observó amplificación en las muestras de ARN, mientras que el control positivo presentó el producto esperado. Por lo tanto, no se detectó ADN genómico amplificable bajo las condiciones empleadas (Figura 5).

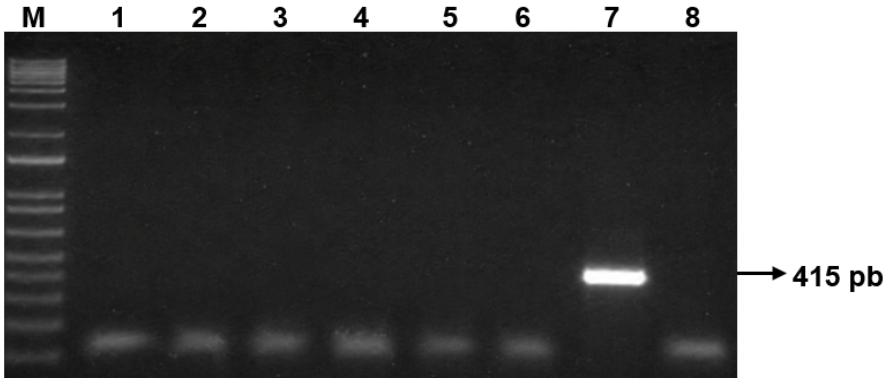


Figura 5. Verificación de la síntesis de ADNc mediante amplificación del gen constitutivo Actina. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa. M: marcador de peso molecular; carriles 1–6: muestras de ADNc obtenidas a partir del ARN recuperado del sedimento urinario; carril 7: control positivo; carril 8: control negativo.

Las seis muestras con ARN se sometieron posteriormente a retrotranscripción. El ADNc obtenido se utilizó como molde para evaluar los oligonucleótidos correspondientes a los genes de interés renal.

Estandarización de las condiciones de amplificación

Los pares de oligonucleótidos se evaluaron inicialmente utilizando ADN genómico humano como control positivo, y posteriormente con ADNc obtenidos del sedimento urinario. Para establecer las condiciones iniciales de amplificación se probaron temperaturas de alineamiento entre 55 y 62°C.

La temperatura de trabajos se seleccionó considerando la presencia de una banda definida y compatible con el tamaño esperado, la disminución de productos inespecíficos y la ausencia de amplificación en el control negativo. Las condiciones seleccionadas para cada gen se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. *Condiciones iniciales de amplificación de genes de interés renal*

Gen	Tamaño esperado	Gradiente evaluado	Temperatura seleccionada
CUBN	950 pb	55–62 °C	59 °C
B2M	298 pb	55–62 °C	57 °C
LRP2	542 pb	55–62 °C	57 °C
NPHS1	406 pb	55–62 °C	60 °C
SYNPO	550 pb	55–62 °C	57 °C
LCN2	182 pb	55–62 °C	59 °C

Amplificación de genes

Se evaluaron los oligonucleótidos dirigidos a los seis genes de interés renal incluidos en el estudio: *CUBN, B2M, LRP2, NPHS1, SYNPO* y *LCN2*. En la Figura 6 se presentan resultados representativos de genes relacionados con distintos componentes y procesos renales: *NPHS1*, asociado con la barrera de filtración glomerular y los podocitos; *B2M*, relacionado con la filtración glomerular y la reabsorción tubular proximal; y *LCN2*, vinculado con la respuesta tubular al estrés o lesión.

Para *NPHS1* y *B2M* se observaron productos definidos y compatibles con el tamaño esperado en las muestras analizadas. La amplificación de *NPHS1* indica que el sedimento urinario contenía material celular con transcritos asociados con podocitos; sin embargo, su detección aislada no representa evidencia de daño glomerular. La presencia de células o material de origen podocitario también puede ocurrir como parte del recambio fisiológico.

En el caso de *B2M*, la obtención de productos definidos mostró que el par de oligonucleótidos presentó un comportamiento adecuado bajo las condiciones evaluadas. No obstante, *B2M* no es un gen específico del riñón y su amplificación en ADNc no debe interpretarse como equivalente al aumento de β2-microglobulina en orina. En este estudio, su detección se utilizó como parte de la estandarización molecular del panel.

En contraste, *LCN2* presentó bandas de diferentes tamaños, lo que sugiere amplificación inespecífica. Este resultado impide establecer si el transcrito estaba presente en las muestras y muestra la necesidad de continuar ajustando la temperatura de alineamiento, la concentración de los oligonucleótidos y, en caso necesario, el diseño del par utilizado. Debido a que *LCN2* puede expresarse en distintos tejidos y aumentar en procesos inflamatorios o de lesión tubular, su interpretación requiere primero contar con una amplificación específica y reproducible.

Las diferencias en la intensidad de las bandas se interpretaron únicamente de manera cualitativa. Al tratarse de PCR punto final, estos resultados no permiten comparar los niveles de expresión entre muestras.

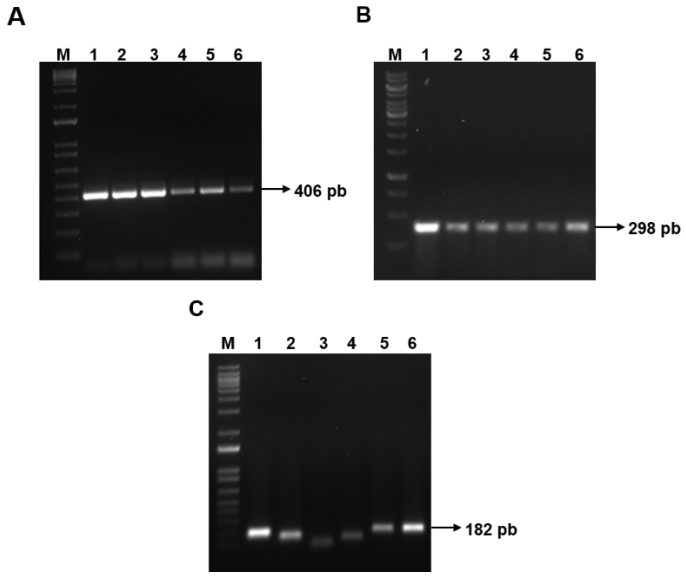


Figura 6. *Evaluación de la amplificación de genes de interés renal en ADNc obtenido del sedimento urinario. Productos de PCR correspondientes a los genes A) NPHS1, B) B2M y C) LCN2.* ***M:*** *marcador de tamaño molecular;* ***carriles 1–6:*** *muestras de ADNc obtenidas a partir del sedimento urinario. Los valores indicados junto a las bandas corresponden al tamaño esperado de cada amplicón en pares de bases. Para NPHS1 y B2M se observaron productos compatibles con el tamaño esperado, mientras que LCN2 presentó bandas de diferentes tamaños, lo que indicó la necesidad de continuar con la estandarización de sus condiciones de amplificación.*

Detección del transcrito de *SYNPO*

También se evaluó la amplificación de *SYNPO*, gen que codifica la sinaptopodina, una proteína relacionada con la organización del citoesqueleto y la integridad de los podocitos. Se observaron productos compatibles con el tamaño esperado del amplicón en dos de las seis muestras analizadas, mientras que en las muestras restantes no se detectó una banda visible bajo las condiciones empleadas (Figura 7).

La detección del transcrito de *SYNPO* en dos muestras podría reflejar una mayor presencia de células o material de origen podocitario en el sedimento urinario. Aunque el ARNm de sinaptopodina puede detectarse en la orina de individuos sin enfermedad renal, se han descrito niveles urinarios mayores en pacientes con nefropatía diabética y durante la progresión de esta enfermedad (Zheng *et al.,* 2011; Lioudaki *et al.,* 2015). Sin embargo, debido al carácter cualitativo de la PCR empleada, el presente resultado no permite establecer diferencias en la expresión ni plantear una asociación clínica. Por ello, debe considerarse preliminar y sería conveniente obtener una nueva muestra para evaluar su reproducibilidad.

No obstante, el resultado obtenido mediante PCR punto final solamente demuestra la detección cualitativa del transcrito y no permite establecer que estas muestras presentaran una expresión mayor de *SYNPO*. Tampoco permite plantear una asociación con daño glomerular. La variabilidad observada pudo depender de la composición celular del sedimento, la cantidad de ARN recuperado, la eficiencia de la retrotranscripción o la sensibilidad de la reacción.

Este hallazgo debe considerarse preliminar. El análisis de una segunda muestra, recolectada y procesada bajo las mismas condiciones, permitiría evaluar su reproducibilidad antes de plantear una posible asociación biológica.

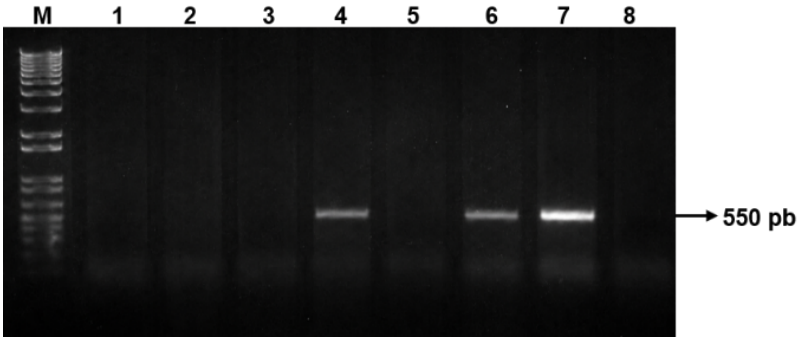


Figura 7. *Detección del transcrito de SYNPO en muestras de sedimento urinario. Los productos de PCR obtenidos a partir del ADNc se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa. M: marcador de tamaño molecular; carriles 1–6: muestras de ADNc obtenidas del sedimento urinario; carril 7: control positivo con ADN genómico humano; carril 8: control negativo sin ADN molde. Se observaron bandas compatibles con el tamaño esperado del amplicón de SYNPO en los carriles 4 y 6, mientras que las muestras restantes no presentaron un producto visible bajo las condiciones empleadas.*

Conclusiones

El sedimento urinario permitió recuperar ARN con integridad aparente en seis de las nueve muestras analizadas y obtener ADNc útil para la amplificación de genes de interés renal. Se establecieron condiciones iniciales para el panel molecular, aunque algunos genes, particularmente *LCN2*, requieren mayor optimización.

La detección de transcritos asociados con estructuras glomerulares y tubulares muestra el potencial del sedimento urinario como fuente no invasiva de material genético. Sin embargo, los resultados fueron cualitativos y preliminares, por lo que deberán confirmarse con un mayor número de muestras, análisis repetidos y métodos cuantitativos.

Bibliografía/Referencias

Barau, C., Maillé, P., Sirab, N., Ghaleh, B., & Allory, Y. (2022). Automated DNA, RNA, and protein extraction from urine for biobanking. *Journal of Biomolecular Techniques, 33*(1), Article 3fc1f5fe.9e4e4f65. https://doi.org/10.7171/3fc1f5fe.9e4e4f65

Bosschieter, J., Bach, S., Bijnsdorp, I. V., Segerink, L. I., Rurup, W. F., van Splunter, A. P., Bahce, I., Novianti, P. W., Kazemier, G., van Moorselaar, R. J. A., Steenbergen, R. D. M., & Nieuwenhuijzen, J. A. (2018). A protocol for urine collection and storage prior to DNA methylation analysis. *PLoS ONE, 13*(8), Article e0200906. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200906

Djomnang, L. A. K., Li, C., Mzava, O., Cheng, A. P., Chang, A., Lenz, J. S., Suthanthiran, M., Lee, J. R., Dadhania, D. M., & De Vlaminck, I. (2024). A quantitative comparison of urine centrifugation and filtration for the isolation and analysis of urinary nucleic acid biomarkers. *Scientific Reports, 14*(1), Article 10872. https://doi.org/10.1038/s41598-024-54239-x

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. (2024). KDIGO 2024 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney International, 105*(4S), S117–S314. https://doi.org/10.1016/j.kint.2023.10.018

Kouri, T. T., Hofmann, W., Falbo, R., Oyaert, M., Schubert, S., Gertsen, J. B., Merens, A., & Pestel-Caron, M. (2024). The EFLM European Urinalysis Guideline 2023. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 62*(9), 1653–1786. https://doi.org/10.1515/cclm-2024-0070

Lioudaki, E., Stylianou, K. G., Petrakis, I., Kokologiannakis, G., Passam, A., Mikhailidis, D. P., Daphnis, E. K., & Ganotakis, E. S. (2015). Increased urinary excretion of podocyte markers in normoalbuminuric patients with diabetes. *Nephron, 131*(1), 34–42. https://doi.org/10.1159/000438493

Snopkowski, C., Salinas, T., Li, C., Stryjniak, G., Ding, R., Sharma, V., & Suthanthiran, M. (2021). Urinary cell mRNA profiling of kidney allograft recipients: A systematic investigation of a filtration based protocol for the simplification of urine processing. *Journal of Immunological Methods, 498*, Article 113132. https://doi.org/10.1016/j.jim.2021.113132

Suthanthiran, M., Schwartz, J. E., Ding, R., Abecassis, M., Dadhania, D., Samstein, B., Knechtle, S. J., Friedewald, J., Becker, Y. T., Sharma, V. K., Williams, N. M., Chang, C. S., Hoang, C., Muthukumar, T., August, P., Keslar, K. S., Fairchild, R. L., Hricik, D. E., Heeger, P. S., … Shaked, A. (2013). Urinary-cell mRNA profile and acute cellular rejection in kidney allografts. *The New England Journal of Medicine, 369*(1), 20–31. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215555

Zainabadi, K., Dhayabaran, V., Moideen, K., & Krishnaswamy, P. (2019). An efficient and cost-effective method for purification of small sized DNAs and RNAs from human urine. *PLoS ONE, 14*(2), Article e0210813. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210813.

Zheng, M., Lv, L.-L., Ni, J., Ni, H.-F., Li, Q., Ma, K.-L., & Liu, B.-C. (2011). Urinary podocyte-associated mRNA profile in various stages of diabetic nephropathy. *PLoS ONE, 6*(5), Article e20431. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020431