



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

**FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE
RECEPTORES KIR EN CÉLULAS NK**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Andrea M. Palacios G., como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutor(a)(es): MSc. Angela Conesa
MSc. Herlida Ramos

Caracas, Venezuela

OCTUBRE-2009

DEDICATORIA

A mi madre que ha sido mi guía, mi fortaleza y mi luz, mi todo y a esos dos angelitos bellos que contribuyeron en mi formación.

A mi familia con amor.

A Sergio, con amor, que me ha apoyado desde el primer día y ha estado orgulloso de todos mis logros.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar doy gracias a Dios por sobre todas las cosas y a Jofiel por estar siempre ahí cuando lo necesito.

A mi madre, por su amor, su apoyo incondicional y su cuidado, a mi tía Adriana, a mi madrina, a mis tíos, Alen, Miguel, Gabriel y Félix, a todos mis primos adorados, a mi ahijada y a su mamá, Rosdery, por su preocupación y apoyo en todo momento.

A la Universidad Central de Venezuela, por abrirme sus puertas y permitirme crecer como persona en “La Casa que vence la sombras”.

A mi tutora, la MSc. Angela Conesa por su buena disposición en todo momento y por su guía, sin la cual este trabajo no se habría podido llevar a cabo.

Al Dr. Félix Toro por su amabilidad y diligencia en la resolución de inconvenientes de cualquier tipo, sobre todo los técnicos.

A los miembros en general del Instituto de Inmunología, sobre todo a aquellos que con gran amabilidad aceptaron participar en esta investigación y aquellos que sin importar el momento prestaron su ayuda incondicional. A Ana R. por todos sus favores, por su apoyo y cariño.

A laboratorios Rocher por su ayuda en la búsqueda de los pacientes incluidos en este estudio y a ellos por participar en esta investigación sin pedir nada a cambio.

A la Lic. Delia Velásquez por su presteza a aclarar dudas y aportar consejos en todo momento, así como a las licenciadas Adriana Meléndez y María Joanna Peña por su gran cariño y por siempre intentar alegrarnos el día.

A la MSc. Herlinda Ramos por su colaboración y apoyo.

A mis compañeros y amigos que me han acompañado a lo largo de la carrera, y con los cuales compartí momentos inolvidables, en especial a esas niñas bellas, Anita, Flori, Dani, Luce, Mary, Nig, Joshi, Sonia y Esme y a Juan, Rubencho, Arturito y Rony; a Gian por fastidiarme tanto, por que sé que esa es su manera de demostrar que me quiere y a mis amigas del alma, que han estado conmigo desde siempre, Chei, Fati, Eli, Martha y Melany. A Sergio, quien también ha sido mi compañero y amigo incondicional.

RESUMEN

El cumplimiento de las funciones del sistema inmunitario se debe a la existencia de receptores y de un conjunto de moléculas que determinan la identidad biológica del individuo, que son codificadas por los genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad llamados en el hombre HLA. Las células NK humanas expresan una familia de receptores de muerte, altamente polimórficos tipo inmunoglobulinas llamados KIR, que regulan la actividad citotóxica de estas células. Los genes KIR proveen señales de activación o supresión, para así regular la activación de las células NK, de tal modo que juegan un papel importante en la inmunidad anti viral y anti tumoral y cada conjunto de receptores inhibidores o activadores reconocen determinantes de un mismo grupo de moléculas HLA clase I. La Hepatitis C es una infección que causa estragos a nivel mundial, causada por un virus (VHC) de ARN. Aproximadamente 2%-3% de la población mundial está crónicamente infectada con el virus de la Hepatitis C y cerca del 20% de ésta se sobrepone de una infección aguda, estando involucrada en este hecho, la interacción entre los receptores KIR y sus ligandos. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión a nivel del ARNm de los receptores KIR inhibidores (2DL1, 2DL2, 2DL3 y 3DL1) y del KIR activador (2DS4) en células NK de sangre periférica de pacientes crónicamente infectados con Hepatitis C e individuos controles. Para ello, se obtuvieron suspensiones celulares altamente enriquecidas en células NK, se evaluó la expresión del ARNm de los receptores KIR mediante RT-PCR obteniéndose que los receptores se expresan de acuerdo al genotipo dado para cada gen. Se logró estandarizar la técnica de PCR en tiempo real para posteriormente evaluar la expresión del ARNm mediante PCR tiempo real y se obtuvo que los individuos controles expresaron más el receptor inhibidor KIR 2DL1 y los pacientes el KIR 2DL3; en ambos grupos, el receptor menos expresado fue el KIR activador 2DS4. Sólo se encontró diferencia significativa en controles y pacientes en cuanto al nivel de expresión de KIR 2DL3. En cuanto a la expresión de los genes KIR a nivel de ARNm y superficie, se encontró una correlación inversa sin diferencias significativas en los receptores KIR 2DL1, 2DL3, 3DL1 y 2DS4.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	IV
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
INTRODUCCIÓN.....	12
1.- Células citotóxicas naturales.....	14
2.- Receptores KIR.....	17
3.- Infección por el virus de la hepatitis C.....	22
ANTECEDENTES.....	24
OBJETIVOS.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
1.- Población estudiada.....	31
2.- Separación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP).....	31
3.- Enriquecimiento de células NK.....	33
4.- Aislamiento de ARN mediante la técnica de trizol.....	34
5.- Síntesis del ADNc mediante transcriptasa reversa.....	34
6.- Amplificación del ADNc por PCR.....	35
7.- Análisis de los amplificados.....	37
8.- Cuantificación del ADNc mediante PCR Tiempo Real.....	38
9.- Comparación de la expresión de KIR mediante RT-PCR con la expresión a nivel de membrana.....	39
10.- Análisis estadístico.....	39
RESULTADOS.....	40

1.- Obtención de suspensiones celulares enriquecidas en células NK.....	40
1.1.- Valores relativos y absolutos de células NK.....	40
1.2.- Aislamiento de Células mononucleares de sangre periférica y enriquecimiento de células NK.....	41
2.- Evaluación de la expresión del ARNm de los receptores KIR mediante RT- PCR.....	45
3.- Estudio de la expresión de ARNm por PCR tiempo real.....	48
3.1.- Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real para el estudio de la expresión a nivel del ARNm.....	48
3.2.- Comparación de la cuantificación relativa de la expresión de ARNm para KIR en el grupo de pacientes respecto al grupo control.....	57
4.- Relación de la expresión de KIR a nivel de ARNm y proteína.....	60
DISCUSIÓN.....	64
CONCLUSIONES.....	75
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
ANEXOS.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

- **Índice de figuras.**

Figura 1.- Ubicación y organización de los genes HLA.....	14
Figura 2.- Subtipos de células NK.....	16
Figura 3.- Organización genómica de los receptores KIR.....	17
Figura 4.- Receptores KIR y sus dominios.....	18
Figura 5.- Organización genómica de los receptores KIR.....	21
Figura 6.- Efectos de la diversidad de los receptores KIR en células NK.....	28
Figura 7.- Histogramas para ubicar a las células NK.....	42
Figura 8.- Histogramas de las CMSP.....	43
Figura 9.- Registros fotográficos de los productos de amplificación mediante RT-PCR.....	44
Figura 10.- Cuantificación relativa de la expresión del ARNm para KIR 2DL1.....	50
Figura 11.- Curva de disociación para KIR 2DL3.....	51
Figura 12.- Cuantificación relativa de la expresión del ARNm para KIR 2DL3.....	54
Figura 13.- Comparación de la expresión de ARNm entre controles y pacientes.....	58

- **Índice de tablas.**

Tabla I.- Secuencias y tamaños de los iniciadores a usar en la PCR.....	37
Tabla II.- Características celulares de controles y pacientes.....	41
Tabla III.- Pureza y Rendimiento de las suspensiones enriquecidas en células NK...44	
Tabla IV.- Relación de la posesión de los genes correspondientes a los receptores KIR y su expresión a nivel de ARNm.....	47

Tabla V.- Genotipaje de los individuos.....	50
Tabla VI.- Expresión de los receptores KIR.....	58
Tabla VII.- Comparación de la expresión de los receptores KIR determinada mediante RT-PCR, PCR tiempo real y citometría de flujo.....	61
Tabla VIII.- Correlación entre el nivel de expresión de los receptores KIR 2DL1, 2DL3, 3DL1 y 2DS4.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

- **ADCC.** Citotoxicidad dependiente de anticuerpo.
- **ADN.** Ácido desoxirribonucleico.
- **ADNc.** ADN complementario.
- **ARN.** Ácido ribonucleico.
- **ARNm.** ARN mensajero.
- **CD16.** Receptor de baja afinidad para la porción Fc de IgG.
- **CD161.** Receptor activador tipo lectinas expresado en células NK.
- **CD3.** Complejo de superficie de linfocitos T.
- **CD56.** Isoforma de la molécula de adhesión N-CAM.
- **CD81.** Receptor específico de la tetraspanina 28.
- **CMSP.** Células mononucleares de sangre periférica.
- **CMV.** Citomegalovirus.
- **Ct.** *Threshold cycle.*
- **DAP12.** Adaptador transmembrana asociado a receptores de superficie de células NK.
- **GADPH.** Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa.
- **Gp144.** Transglicosilasa lítica.
- **HLA.** Antígenos Humanos Leucocitarios.
- **INF.** Interferon.
- **ITAM.** *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif.*
- **ITIM.** *Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif.*
- **KIR.** Killer cell Immunoglobulin-like receptor.

- **LCR.** Región de receptores de linfocitos en el cromosoma humano 19.
 - **LSP.** Linfocitos de sangre periférica.
 - **MHC.** Complejo Principal de Histocompatibilidad.
 - **MLR.** Reacción Leucocitaria Mixta.
 - **NCR.** Receptores de citotoxicidad natural.
 - **NK.** Célula citotóxica natural.
 - **NKG2.** Receptores de células NK de lectinas C-tipo.
 - **NKR-P1A.** Receptor activador CD161.
 - **PMN.** Células polimorfonucleares.
 - **PCR.** Reacción en cadena de la polimerasa.
 - **PCR SSP.** Reacción en cadena de la polimerasa de secuencia de iniciadores específicos.
- **RI.** Respuesta Inmunitaria.
 - **RT-PCR.** Transcripción reversa.
 - **SHP-1.** Tirosina fosfatasa inhibidora que previene eventos de fosforilación en cascadas celulares.
- **SH2.** Proteína dominio que se une a los residuos de tirosina fosforilados.
 - **SI.** Sistema Inmunitario.
 - **SyK.** *Spleen tyrosine kinase.*
 - **Tm.** Temperatura de fusión.
 - **VHC.** Virus de la Hepatitis C.
 - **VIH.** Virus de la Inmunodeficiencia Humana.
 - **ZAP70.** *Zeta-chain associated protein kinase 70.*

INTRODUCCIÓN

Todos los seres vivos estamos expuestos continuamente a la agresión por microorganismos patógenos y agentes infecciosos, por lo tanto requerimos de un sistema de defensa. Este sistema, llamado Sistema Inmunitario (SI), está constituido por tejidos, células y mediadores químicos que en conjunto nos defienden de las potenciales agresiones que puedan invadir el organismo y además es responsable de un conjunto de funciones indispensables para la supervivencia de los seres vivos. Su función más importante, es su capacidad para reconocer, eliminar y discriminar entre agentes propios y extraños (Corado y Mora de Orta, 2003).

La acción eficaz del SI desencadena en el individuo la Inmunidad, la cual describe un estado de resistencia frente a los agentes patógenos. La inmunidad puede ser de duración variable, esto sucede porque el sistema de defensa del organismo desencadena una serie de eventos celulares y humorales que colectivamente reciben el nombre de Respuesta Inmunitaria (RI), y que según las características de la reacción y los elementos que participan en ella se ha clasificado en RI innata y adaptativa (Corado y Mora de Orta, 2003).

La RI innata es la primera línea de defensa y se desencadena de manera inmediata ante cualquier señal de alarma detectada en el organismo. La interacción de los agentes invasores con los componentes de la RI innata, induce procesos de reclutamiento y maduración celular, así como la liberación de mensajeros químicos que crean las condiciones para que se inicie la RI adaptativa. La RI adaptativa se desencadena como consecuencia del reconocimiento de antígenos o inmunógenos por las células linfoides T y

B. Esta respuesta es específica, genéticamente controlada y genera memoria inmunitaria (Abbas y Lichtman, 2004).

El cumplimiento de las funciones del SI se debe, entre otros elementos, a la existencia de receptores y de un conjunto de moléculas que determinan la identidad biológica del individuo, que son codificadas por los genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC siglas en inglés de *Major Histocompatibility Complex*), llamados en el hombre HLA (siglas en inglés de *Human Leukocyte Antigen*). La nomenclatura internacional aceptada del MHC y de las proteínas que codifican se basa en la homología de la secuencia y la estructura, siendo aplicable a todos los vertebrados. Así los genes identificados en el rechazo a injertos en los ratones y los identificados serológicamente en humanos (HLA-A, HLA-B, HLA-C) se les agrupa bajo el nombre de “genes del MHC clase I”, en tanto los genes de la respuesta inmunitaria de los ratones y los genes humanos detectados por la técnica de “Reacción Leucocitaria Mixta” o MLR por su siglas en inglés (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR) se conocen como “genes del MHC clase II”. Todos estos genes, se encuentran ubicados en el brazo corto del cromosoma 6 y se expresan de modo codominante (figura 1). De esta manera amplía aun mas la diversidad (Corado y Mora de Orta, 2003).

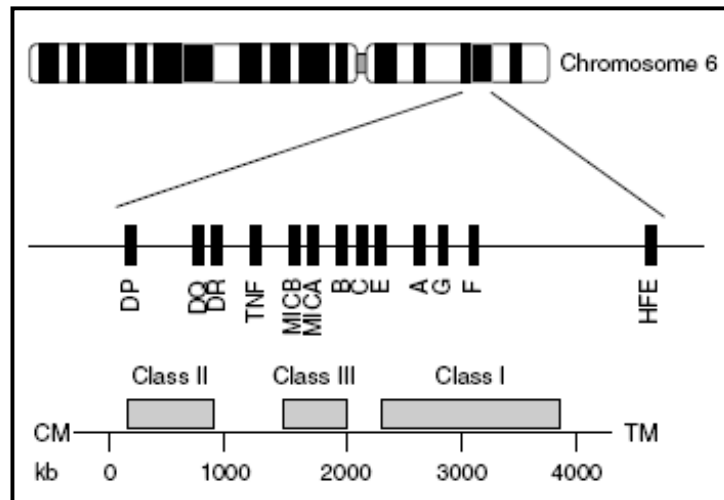


Figura 1.- Ubicación y organización de los genes del HLA en el cromosoma 6 humano. Los genes HLA clase I se ubican en la región 6p21.3 del brazo corto del cromosoma 6 humano (tomada de Cassinotti y col. 2009).

El desarrollo evolutivo de las células del SI, las ha capacitado para reconocer mediante receptores a los potenciales agente agresores, estos receptores son distintos según el tipo de célula que se considere y captan señales de alarma proveniente del estrés celular. Estas células se originan durante la hematopoyesis, proceso en el cual, a partir de células indiferenciadas multipotenciales y en función del microambiente que las rodea pueden diferenciarse en distintas líneas celulares: mieloide, linfoide, eritoblastoide, monocitoide, megacariocitoide (Margin, 1996).

1.- Células citotóxicas naturales.

Entre las células de origen linfoide, se encuentran las células citotóxicas naturales (NK, en inglés de *Natural Killer*) las cuales son linfocitos que comparten un progenitor común con las células T y forman parte de la inmunidad natural, jugando un papel importante en la defensa contra agentes infecciosos (Middleton y col. 2002). Estas células han sido descritas en su mayoría como linfocitos granulares grandes, puesto que presentan

gran cantidad de gránulos azurófilos en su citoplasma. Sin embargo, esta morfología no es exclusiva de células NK puesto que se han encontrado linfocitos T con estas características (Trincheri, 1992).

En humanos, las células NK maduras son reconocidas fenotípicamente por la expresión en superficie de la molécula de adhesión N-CAM (CD56) y la ausencia del complejo de superficie, CD3. Funcionalmente, las células NK constituyen una fuente importante de citocinas inmunoreguladoras y tienen la habilidad de eliminar directamente células blanco por medio de reacciones de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediante la unión del Fc γ RIII (CD16, receptor de baja afinidad para IgG) a la porción Fc de las IgG y mediante citotoxicidad natural, que ocurre cuando la célula blanco ha disminuido su expresión de las moléculas del MHC de clase I y puede aumentar así la expresión de los receptores activadores de las células NK.

Diferentes estudios realizados han identificado dos poblaciones distintas de células NK humanas, basadas en la densidad de expresión de superficie de la molécula CD56 (figura 2). Aproximadamente el 90% de las células NK en humanos, expresan baja densidad de CD56 (llamadas CD56^{dim}) con niveles elevados de CD16, mientras que el 10% restante expresan CD56 en densidad elevada (CD56^{bright}) y CD16 en baja densidad o negativas (CD16^{dim/neg}) (Meier y col. 2005). Esta expresión “bright o dim” se encuentra correlacionada con la expresión en superficie de varias familias de receptores que les confieren propiedades funcionales únicas a las poblaciones CD56^{bright} y CD56^{dim} (Farag y Caligiuri, 2007).

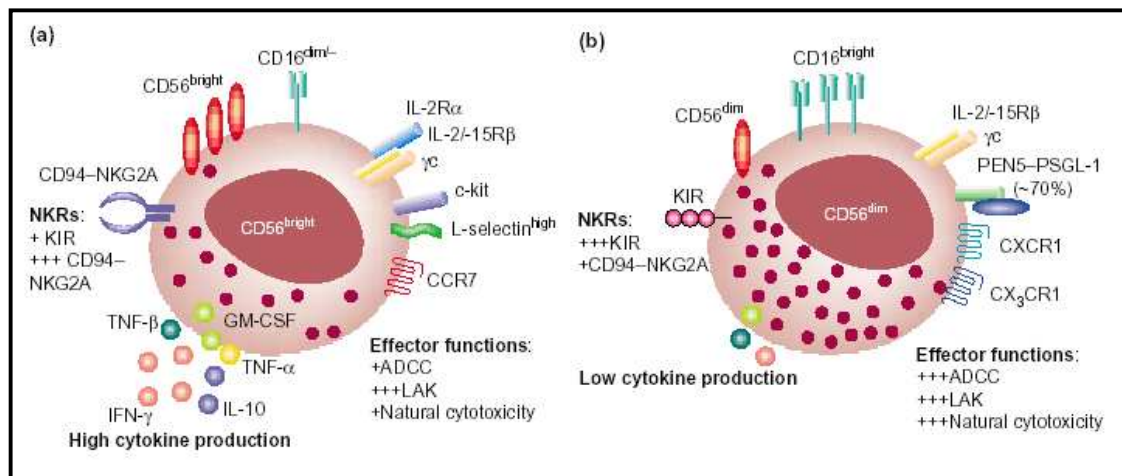


Figura 2.- Subpoblaciones de células NK humanas. Las células CD56^{bright} son predominantemente células inmunoreguladoras que producen altos niveles de citocinas. Esta subpoblación presenta una baja expresión de CD16 y de receptores KIR y una menor citotoxicidad natural y ADCC (tomada de Cooper y col. 2001).

Se han descrito tres familias de receptores citotóxicos naturales en células NK humanas: la superfamilia de receptores de muerte tipo inmunoglobulinas (KIR, del inglés *Killer Immunoglobulin-like Receptor*), que reconocen moléculas clásicas del MHC clase I, receptores pertenecientes a la superfamilia de lectinas C-tipo (heterodímeros de NKG2A/B o NKG2C y el homodímero NKG2D), los cuales interactúan con moléculas no clásicas del MHC (Thompson y col. 2006) y los receptores citotóxicos naturales (NCR) cuyos ligandos fisiológicos no se conocen en la actualidad. La expresión de estos receptores en las células NK maduras varía según la subpoblación; por ejemplo, se ha encontrado que las células CD56^{bright} (figura 2a) presentan una baja (o ausencia en algunos casos) expresión de KIR, pero una expresión alta de receptores tipo lectinas (CD94/NKG2) y el receptor natural NKp46 (Poli y col. 2008), mientras que lo opuesto se da en células CD56^{dim} (figura 2b) (Meier y col. 2005).

2.- Receptores KIR.

La familia de genes polimórficos que codifica a los receptores KIR, está constituida por 14 genes y se encuentra localizada en el cromosoma humano 19q13.4 (figura 3). Estos receptores han sido divididos en distintos grupos, dependiendo del número de dominios extracelulares de inmunoglobulinas (2D o 3D) que presentan y que les permiten reconocer específicamente a las moléculas HLA clase I y de la longitud de su región citoplasmática, la cual define su actividad funcional (Gómez y Vilches, 2001).

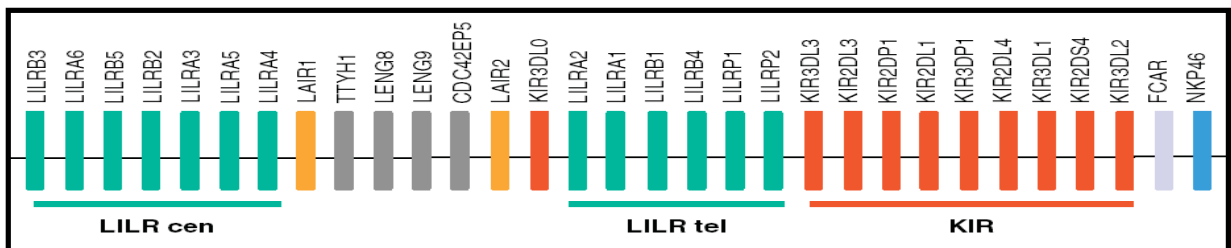


Figura 3.- Organización genómica de los receptores KIR, en el cromosoma 19q13.4 dentro del complejo de receptores de leucocitos (LCR). Las familias de los receptores están organizadas por colores, excepto las barras grises que son receptores de función desconocida. La familia de los receptores KIR corresponde a las barras en rojo (tomada de Bashirova y col. 2006).

La estructura básica de los KIR comprende una unidad de 9 exones, los cuales representan la organización de los genes ancestrales. El dominio distal de membrana (D0) es codificado en el exón 3, el dominio medio de membrana (D1) por el exón 4 y el dominio proximal de membrana (D2) en el exón 5. Los exones 1 y 2 forman la secuencia señal, el exón 7 codifica a la región transmembrana de los receptores y los exones 8 y 9 a la región citoplasmática (Bashirova y col. 2006). Los receptores KIR 2DL4 y 2DL5 presentan los dominios D0 y D2, mientras que los receptores KIR 2DL1-3, 2DS1-5 las configuraciones D1 y D2 (figura 4). El exón 4 está ausente en el primer grupo mientras que el exón 3 esta

presente como pseudoexón en el segundo siendo removido durante el procesamiento del ARNm (Middleton y col. 2002).

Mientras la mayoría de los KIR están codificados como proteínas de membranas y receptores celulares, algunas secuencias de ADN codifican potencialmente a proteínas secretadas como consecuencia de codones tempranos de parada presentes debido a deleciones en el exón 5 o ausencia de los exones 7-9 (Bashirova y col. 2006). Ejemplos de esto son los receptores KIR 2DS4 y 2DL4. Sin embargo, el impacto funcional de estas proteínas, si es que son secretadas, no ha sido determinado aún (Boyton y Altmann, 2008).

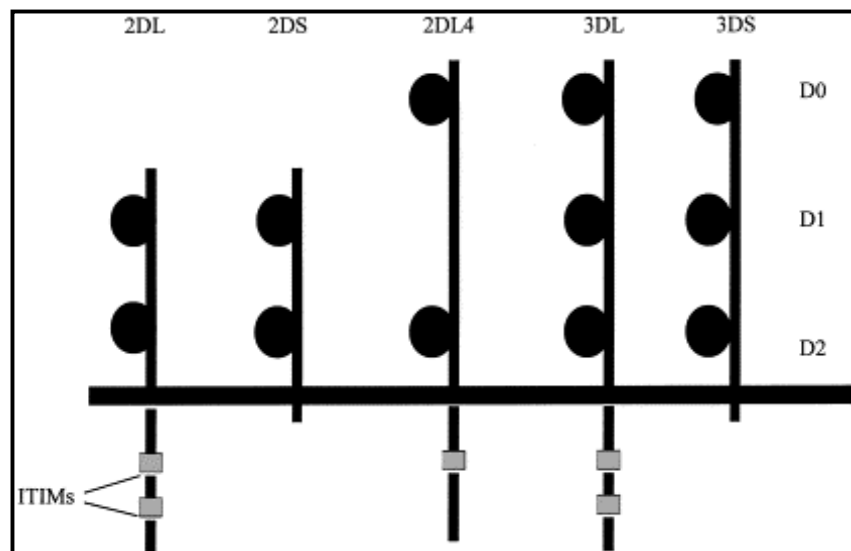


Figura 4.- Receptores KIR y sus dominios. Los receptores DL presentan 2 o 3 dominios de Ig, una cola citoplásmica larga y 2 motivos ITIM en ella. El receptor 2DL4 posee los dominios D0 y D2, mientras que el resto de los receptores inhibidores 2D, los dominios D1 y D2. Los receptores DS presentan una cola citoplásmica corta y por lo tanto la pérdida de los motivos ITIM (Tomada de Middleton y col. 2002).

Los receptores KIR con cola citoplásmica larga (2DL y 3DL) contienen dos motivos inhibidores de tirosina o ITIM (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*), que son los responsables de la función inhibidora de estas moléculas (figura 4). La unión

del receptor con su ligando permite la fosforilación de los residuos de tirosina de los ITIM. Los ITIM activan y reclutan a la tirosina fosfatasa (SHP-1) lo cual previene los eventos de fosforilación asociados con la activación celular, permitiendo así la inhibición de las células NK.

Aquellos KIR que poseen una cola citoplasmática corta (2DS y 3DS), presentan un cambio de nucleótidos en el exón que codifica la región citoplasmática, lo que resulta en un codón de parada temprano y la pérdida de los motivos ITIM. Además presentan un aminoácido básico (lisina) en el dominio transmembrana que permite la formación de un puente de sal con el ácido aspártico en el dominio transmembrana de la proteína adaptadora DAP12 (Middleton y col. 2002). La característica de esta proteína es que posee un motivo activador de tirosina o ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), que es codificado por un gen centromérico en la región de receptores de linfocitos (LCR) en el cromosoma 19. Cuando estos receptores son agrupados por la interacción entre el receptor y su ligando, los residuos de tirosina en el ITAM son fosforilados, la identidad de la quinasa que fosforila a estos motivos, no se conoce (Gosselin y col. 1999), pero se sabe que esto proporciona un puente para los dominios SH2 de la proteína ZAP70 y la tirosina quinasa Syk, los cuales se unen a los residuos de tirosina fosforilados. La acción de esta quinasa permite la transducción “río abajo” y la activación de la función citotóxica de las células NK (Middleton y col. 2002).

Acerca de la interacción con moléculas HLA de clase I expresadas en la superficie de las células blanco, los genes KIR proveen señales de activación o supresión para así regular la activación de las células NK y células T, de tal modo que juegan un papel importante en la inmunidad anti viral y anti tumoral y cada conjunto de receptores inhibidores o activadores reconocen determinantes de un mismo grupo de moléculas clase I

(Zhi-ming y col. 2007). El receptor KIR 2DL1 (y su contraparte 2DS1) reconoce un epítipo del HLA-C grupo 2 (HLA-C2) presente en los alotipos Cw2, Cw4, Cw5, Cw6, Cw15 y Cw17 y se caracteriza por presentar un aminoácido asparagina en la posición 77 y una lisina en la posición 80 en la hélice α 1 de la molécula de MHC. Por otra parte, KIR 2DL2 (y 2DS2) y 2DL3 reconocen un epítipo del HLA-C grupo 1 (HLA-C1) presente en los alotipos Cw1, Cw3, Cw7, Cw8, Cw12, Cw13 y Cw14, presentando el aminoácido serina en la posición 77 y una asparagina en la 80. KIR 3DL1 y 3DS1 reconocen el epítipo de HLA-Bw4 (Farag y Caligiuri, 2007), KIR 3DL2 reconoce a HLA-A3 y A11 y los ligandos de KIR 2DL4 y 2DS4 son HLA-G y Cw4 respectivamente (Kulkarni y col. 2008).

La determinación del genotipo de KIR a nivel poblacional ha permitido identificar mas de 100 genotipos y se han establecido dos grupos básicos de haplotipos de KIR basándose en el contenido de genes que presentan (figura 5). El haplotipo A contiene nueve genes, siendo dos de ellos activadores, KIR 2DL4 y 2DS4, y el resto inhibitorios, KIR 2DL1, 2DL3, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 2DP1 y 3DP1 (Bashirova y col. 2006; Boyton y Altmann, 2008). El grupo B, es más diverso en cuanto a los genes KIR que contiene, más de 20 alelos diferentes han sido descritos, siendo estos en su mayoría activadores (Bashirova y col. 2006). Varios estudios realizados en familias de individuos no relacionados entre sí, han revelado la diversidad en la distribución de los haplotipos a través de distintas poblaciones. Los haplotipos A y B están distribuidos aproximadamente de igual manera entre los caucásicos, pero en poblaciones asiáticas (japoneses, chinos y coreanos) el haplotipo A es el más frecuente. La plasticidad física de los loci de KIR permite una forma relativamente rápida de selección natural, dando como resultado la

prevalencia de haplotipos inhibitorios (A) en una población y activadores (B) en otra (Bashirova y col. 2006).

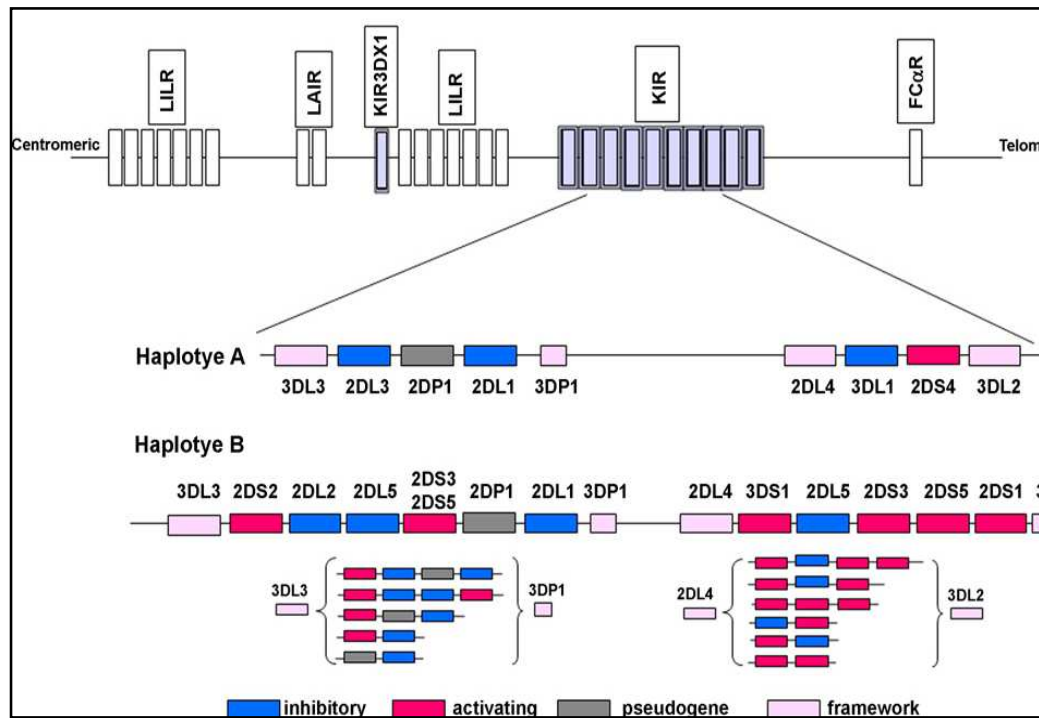


Figura 5.- Organización genómica de los receptores KIR. Los haplotipos de KIR varían en su contenido de genes, pudiendo ser en su mayoría inhibitorios (A) o activadores (B), (tomada de Kulkarni y col. 2008).

Los patrones de expresión de KIR aparentemente siguen reglas estocásticas (Presnell y col. 2006). La expresión estocástica de genes ocurre cuando los reguladores transcripcionales están presentes en muy bajas concentraciones, de modo que la unión y liberación de reguladores en los sitios de regulación parecen ser probabilísticas. Dicho tipo de expresión puede ser considerada la consecuencia de la activación e inactivación al azar de la transcripción debido a ciclos sucesivos de unión y liberación de un factor de transcripción (Nijhout, 2004). Cada célula NK puede expresar diferentes combinaciones de genes KIR, sin embargo la expresión a nivel de ARNm no ha sido detectada para todos los

genes KIR; el análisis de la expresión a nivel de ARNm y de proteína demuestra que cada clon de célula NK presente en un individuo puede no expresar el conjunto completo de genes KIR que están codificados en su genoma (Bashirova y col. 2006). Estudios en clones de células NK provenientes de individuos normales han mostrado que de los 14 receptores diferentes, inhibidores y activadores, presente en un genotipo dado, al menos uno se expresa en células NK individuales. Los estudios de expresión a nivel de superficie de los KIR han sido difícil de realizar debido a la escasez de anticuerpos monoclonales que reconozcan específicamente a cada receptores KIR particular, esto debido a la gran homología entre la región extracitoplasmática de estos receptores; actualmente, sólo se encuentran disponibles comercialmente anticuerpos monoclonales para los receptores KIR 2DL1, 2DL3, 2DL4, 3DL1 y 2DS4.

3.- Infección por el virus de la hepatitis C

La infección por el virus de la Hepatitis C es una enfermedad que causa estragos a nivel mundial. El virus de hepatitis C (VHC) es un ARN virus perteneciente a la familia *Flaviviridae*, género *Hepacivirus* (Guidotti y Chisari, 2006), que presenta 6 genotipos diferentes y más de 50 subtipos (Wong y Lee, 2006). Los genotipos 1, 2 y 3 están ampliamente distribuidos a nivel mundial, mientras que el genotipo 4 parece ser prevalente sólo en África y los genotipos 5 y 6 están restringidos a Sudáfrica y Asia, respectivamente. En Venezuela, el genotipo prevalente en la última década ha sido el genotipo 1, específicamente el subtipo 1b; sin embargo la prevalencia del genotipo 2 ha incrementado, desplazando así al 1b como el genotipo prevalente (Pujol y Loureiro, 2007).

La infección por el VHC es capaz de inhibir la respuesta inmune innata, pudiendo además ocasionar cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular. Aproximadamente 2-3 % de

la población mundial está infectada con el VHC (Rauch y col. 2007), entre los cuales el 80 % puede presentar una infección crónica, mientras que cerca del 20 % restante se sobrepone de la infección aguda, estando involucrada en esta respuesta, la interacción entre los receptores KIR y sus ligandos (Khakoo y col. 2004). Los factores que determinan el desarrollo de la hepatitis crónica no están establecidos con absoluta certeza, pero se cree que diversos elementos como la ruta de infección, cantidad del inóculo y el genotipo viral pudieran estar estrechamente relacionados con este hecho (Montes y col. 2005).

Las infecciones por virus hepatotrópicos activan a las células NK presentes en hígado, las cuales juegan un papel importante en el reclutamiento de células T y en la inhibición de la expresión del ARNm y de proteínas del VHC, mediante la secreción de factores antivirales. Sin embargo, el VHC puede eludir los mecanismos de defensa celular bloqueando las vías de señalización del INF. La proteína E2 del VHC interactúa con la molécula CD81 en las células NK inhibiendo su activación. También el VHC puede evadir la respuesta de las células NK mediante la estabilización de moléculas del MHC clase I sobre la superficie de las células infectadas (Ahmad y Álvarez, 2004).

ANTECEDENTES

Las células NK representan entre el 10 y 15 % del total de células mononucleares de sangre periférica (Farag y Caligiuri, 2007). Diversos ensayos *in vitro*, reportados por varios autores, en muestras de pacientes con infecciones virales recurrentes (como aquellas con virus de inmunodeficiencia humana, virus de la hepatitis B y C y citomegalovirus) han demostrado que estas células tienen la capacidad de lisar con gran eficiencia células blanco infectadas con virus, encontrándose que el número de células NK puede decaer considerablemente o estar ausentes en dos de tres pacientes, sugiriendo que estas células juegan un papel importante en la resistencia contra infecciones virales (Meier y col. 2005).

Se ha encontrado que algunos virus son capaces de regular la expresión de MHC clase I en las células que infectan, protegiéndose a sí mismos de ser detectados por linfocitos T citotóxicos y células NK. Una estrategia usada comúnmente para escapar a la detección de estas células, es producir moléculas que mimetizan al ligando natural que interactúa con los receptores inhibidores de las células NK para prevenir la lisis de las células infectadas. Este es el caso del citomegalovirus (CMV), el cual produce una proteína homóloga al MHC clase I llamada gp144 (Hsu y col. 2002).

Sin embargo, apoyando la hipótesis de “pérdida de lo propio” (*missing self*), se demostró que las células NK pueden selectivamente destruir células que han perdido o disminuido la expresión de las moléculas del MHC clase I. A pesar de esto, se ha encontrado que la expresión de estas moléculas no es siempre necesaria para la protección de las células blanco contra la lisis por parte de las células NK, y que la inhibición por MHC clase I no es siempre suficiente para prevenir las reacciones de citotoxicidad,

indicando esto la presencia de otros receptores funcionales y que esta acción está regulada por un balance de las señales provenientes de estos receptores (Frag y Caligiuri, 2007).

La interacción de los receptores KIR con sus ligando específicos (las moléculas HLA de clase I) proveen señales de activación o supresión que permiten la regulación de la activación de las células NK, que como se mencionó anteriormente, juega un papel importante en la inmunidad anti viral y anti tumoral de estas células. Estudios genéticos sobre la distribución de los genes KIR y sus ligandos HLA clase I han permitido establecer asociaciones con la susceptibilidad y resistencia a diferentes enfermedades así como con el curso o desarrollo de enfermedades infecciosas. En este sentido podemos mencionar que la interacción del KIR 3DS1 con su ligando HLA-Bw4, ha sido asociada con el retraso de la patogénesis en pacientes infectados con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), puesto que inhibe la replicación del virus en la célula (Kulkarni y col. 2008), y con la protección contra infecciones oportunistas. En el caso de la infección por virus de la hepatitis C, el hecho de que un individuo sea homócigo para KIR 2DL3 está relacionado con una respuesta más favorable en el control de la infección (Khakoo y col. 2004).

En cuanto a los Herpesvirus, particularmente en el caso del Citomegalovirus (CMV), se ha encontrado que personas infectadas con CMV presentan mayor expresión del receptor activador NKG2C que aquellas no infectadas, sugiriendo que este receptor puede proveer protección contra la infección por este virus (Khakoo y Carrington, 2006). En este particular los receptores KIR parecen tener menor influencia en la protección contra dicho virus, sin embargo, Kulkarni y colaboradores (2008) reportaron que en un caso estudiado de un niño que presentaba un síndrome de inmunodeficiencia e infección recurrente del CMV, la población entera de sus células NK expresaba KIR 2DL1 y además poseía el ligando específico de este receptor (HLA-C2).

Entre las estrategias de evasión viral a las respuestas inmunitarias del hospedero, en el caso de la infección por el VHC, diversos reportes sugieren la capacidad que presenta el VHC para infectar células extra hepáticas, como por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica (CMSP), siendo éstas la segunda población celular con mayor susceptibilidad a ser infectadas por el virus (Toro y col. 1999). De la misma manera, estudios realizados por Toro y colaboradores (1998, 1999) demostraron la presencia del VHC no sólo en CMSP sino también en células polimorfonucleares (PMN) de pacientes infectados, encontrando que el 60 % de los pacientes reveló la presencia del ARN del VHC en CMSP, el 40 % en eosinófilos y un 27 % en PMN, lo que indica que las células leucocitarias también son un blanco importante de infección por el virus (Toro y col. 1998; Toro y col. 1999).

Las proteínas específicas del VHC pueden interferir con la función de células efectoras de la inmunidad innata, como las células NK. En una investigación llevada a cabo por Meier y colaboradores (2005) en la que estudiaron pacientes ingleses positivos para VIH⁺ (n = 18), pacientes positivos para VHC⁺ (n = 36) e individuos controles (n = 30) se encontró que en general la población de NK de los pacientes disminuyó considerablemente su número en comparación con los controles. Sin embargo, el número de células de ambas poblaciones de NK de sangre periférica (CD56^{bright} y CD56^{dim}) fueron similares en los pacientes VHC⁺, indicando que la expresión de los receptores CD94/NKG2 y los receptores KIR fue similar.

En estudios de asociación KIR-HLA, Khakoo y colaboradores (2004), encontraron que en pacientes infectados con el VHC, la frecuencia de individuos homocigos para el receptor KIR 2DL3 y para el grupo HLA-C1 (HLA-C1C1) fue mayor en el grupo que se recuperó de la enfermedad (37,5 % de 352 pacientes estudiados) en relación a aquellos con

infección persistente (29,9 % de 685 pacientes estudiados), los cuales poseían dos alelos del grupo HLA-C2 (HLA-C2C2). Los autores postulan que las interacciones débiles de receptores KIR inhibidores con sus ligandos (específicamente KIR 2DL3/HLA-C1, ambos en condición homóciga) parecen conferir protección contra VHC, puesto que puede ser eliminado más fácilmente mediante señales de activación en comparación con interacciones fuertes que están conferidas por KIR 2DL2/HLA-C1 o KIR 2DL1/HLA-C2 (figura 6), además las células NK de los individuos que presentan este receptor secretan más interferón gamma (IFN- γ) en el momento o poco después de la infección y presentan mayor degranulación que las células NK de individuos con KIR 2DL1 (Kulkarni y col. 2008). En adición a esto no encontraron asociación entre el receptor KIR 2DL3 y la resolución de la infección en individuos que no presentaron moléculas del HLA-C1C1, lo que indica que la protección se confiere en conjunto gracias a la interacción HLA-C1C1 y KIR 2DL3/2DL3 y no a sus efectos independientes (Khakoo y col, 2004).

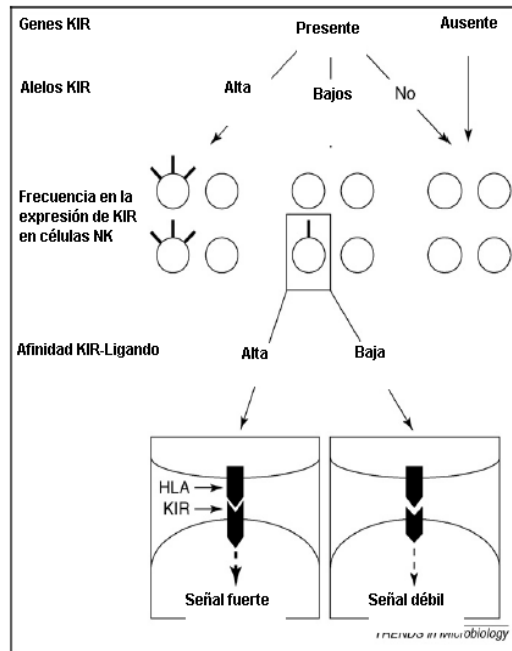


Figura 6.- Efectos en la diversidad de los receptores KIR en el repertorio de células NK. La afinidad de los receptores KIR con su ligando HLA puede ser de intensidad alta o baja (tomada y modificada de Carrington y col. 2008).

El VIH y el VHC tienen la misma ruta de infección y es común encontrar individuos coinfectados con ambos virus (Wong y Lee, 2006). En un estudio realizado en 218 pacientes suizos coinfectados con VIH y VHC, Rauch y colaboradores (2007) no encontraron ninguna asociación significativa entre el genotipo de los receptores KIR y sus ligandos HLA-C en el desarrollo de la infección por el VHC, debido quizás a que dichos pacientes se encontraban coinfectados con VIH (Rauch y col. 2007; Boyton y Altmann, 2008).

Los estudios antes mencionados, se han realizado mediante la determinación de la presencia y distribución de genes KIR; son pocos los estudios de expresión de estos receptores a nivel de ARNm y a nivel de superficie. Entre estos se encuentran varios que mediante citometría de flujo, RT-PCR y PCR tiempo real, han podido determinar los

niveles de expresión de los transcritos y la expresión en superficie de estos receptores (de los receptores KIR 2DL1, 2DL3, 3DL1 y 2DS4) y compararlos con la expresión relativa del ARNm.

Como se mencionó anteriormente los genes KIR regulan la activación de las células NK jugando un papel importante en la inmunidad anti viral, por la cual consideramos importante evaluar la expresión de estos receptores en las células NK tomando como modelo de infección viral la infección por el virus de la hepatitis C.

OBJETIVOS

- **Objetivo General**

Estudiar la expresión de los receptores KIR inhibidores y activadores a nivel del ARNm en células citotóxicas naturales (NK) de sangre periférica.

- **Objetivos Específicos**

- 1.- Obtener suspensiones celulares altamente enriquecidas en células NK.
- 2.- Evaluar la expresión del ARNm de los receptores KIR inhibidores (2DL1, 2DL2, 2DL3 y 3DL1) y del KIR activador (2DS4) mediante RT-PCR en células NK.
- 3.- Estudiar la expresión del ARNm de los receptores KIR inhibidores y activadores en células NK de pacientes crónicamente infectados con el VHC, mediante PCR Tiempo Real y compararlo con la expresión en sujetos sanos.
- 4.- Relacionar la expresión de los receptores KIR a nivel de ARNm y de proteína.

MATERIALES Y METODOS

1.- Población estudiada.

Las poblaciones de células NK evaluadas en el presente estudio fueron obtenidas a partir de sangre periférica de individuos sanos seronegativos para la infección por el VIH, VHB y VHC, así como de pacientes crónicamente infectados con VHC (infección demostrada por la presencia de anticuerpos anti-VHC y la determinación cualitativa de ARN del virus en suero) y seronegativos para VIH y VHB. Los pacientes fueron seleccionados en la consulta de hígado de la Unidad de Gastroenterología del Hospital Clínico Universitario, previa información y consentimiento de los pacientes. El protocolo de investigación fue aprobado por el comité de Bioética del Instituto de Inmunología de la UCV.

El grupo control está constituido por 12 individuos (3 de sexo masculino y 9 de sexo femenino) y el grupo de pacientes por 10 individuos (2 de sexo masculino y 8 de sexo femenino), con un rango de edades entre 37 y 71 años en ambos grupos de estudio.

2.- Separación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP).

El aislamiento de células mononucleares a partir de sangre periférica fue descrito originariamente por Boyum (1968) y consiste en la separación de las células a través de un gradiente de Ficoll-Hypaque. Este método consta de una centrifugación sobre gradiente de densidad, cuyo principio se basa en la fuerza, densidad y viscosidad del medio de separación. La diferencia de densidades en las células sanguíneas es la base para un método de separación eficiente, y bajo condiciones adecuadas de fuerza y tiempo de centrifugación provoca entonces que los glóbulos rojos y granulocitos sedimenten a través

del medio, mientras que los linfocitos y las plaquetas residuales permanecen en el plasma en la interfase de la mezcla de Ficoll-Hypaque. Las plaquetas son luego separadas de las células mononucleares por medio de lavados sucesivos.

Para el aislamiento de células mononucleares, se tomaron 50 ml de sangre periférica y se depositaron en tubos Falcon estériles de 50 ml, sobre un gradiente de Ficoll-Hypaque ($d= 1,077 \text{ g/ml}$) en proporción de dos volúmenes de sangre por volumen de Ficoll-Hypaque. Se centrifugó durante 30 min a $800 \times g$ (sin freno) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, para obtener las células mononucleares en la interfase del plasma y el Ficoll-Hypaque. Las células ubicadas en la interfase, se recogieron con una pipeta y se lavaron 2 veces con buffer fosfato salino (PBS), pH 7,2, centrifugando durante 10 min a $400 \times g$ y $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y luego se lavaron por última vez durante 10 min a $200 \times g$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, para eliminar las plaquetas. El sedimento celular se resuspendió en medio RPMI suplementado con 10 % de suero bovino fetal (SBF), 1 % de glutamina y 1 % de penicilina y se ajustaron a una concentración de 3×10^6 cel/ml. Con la finalidad de separar las células no adherentes de las adherentes, se incubaron en frascos de cultivo, durante 1 hora a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, en atmósfera húmeda conteniendo 5 % de CO_2 . Luego de la incubación se extrajo la suspensión de LSP y se evaluó la viabilidad de las células en una cámara de Neubauer, haciendo una dilución 1:2 con el colorante vital azul tripano para finalmente ajustar la suspensión a la concentración deseada. Esta fracción de células se designa como linfocitos de sangre periférica (LSP).

Los glóbulos rojos de la sangre procesada, obtenidos mediante el gradiente de Ficoll-Hypaque se recolectaron en tubo estéril, habiendo quitado previamente la capa de células polimorfonucleares, y se lavaron con PBS, centrifugando a $460 \times g$ durante 10 min. Luego se contaron para ajustarlos a la concentración necesaria ($2,5 \times 10^9$ cel/ml).

3.- Enriquecimiento de células NK.

Para el aislamiento de células NK a partir de las LSP se empleó el reactivo RosetteSep® (Stem Cell Technologies). El cóctel de anticuerpos (anti CD3, CD4, CD19, CD36, CD66B y Glicoforina A) del RosetteSep une las células no deseadas a los glóbulos rojos, formando inmunorosetas, esto incrementa la densidad de las células no deseadas, las cuales pueden ser separadas por centrifugación en un gradiente de densidad Ficoll-Hypaque.

Una vez ajustada la concentración de glóbulos rojos, se calculó la cantidad de células mononucleares necesarias, a modo de obtener una relación de 50 glóbulos rojos por cada célula blanco. Se agregó el volumen necesario de la suspensión de glóbulos rojos y se agregó el RosetteSep (50 µl por cada 1 ml de suspensión de glóbulos rojos), se mezcló por inversión y dejó reaccionar durante 20 min. Posteriormente, se agregó la muestra sobre un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque y se centrifugó durante 30 min a 800 x g (sin freno) y 25 °C. Se realizaron 2 lavados a 400 x g durante 10 min y 25 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular con medio RPMI suplementado al 10 % y se chequeó la viabilidad celular.

Para determinar la pureza de las células, se realizó un inmunofenotipaje con anticuerpos monoclonales específicos. Se tomaron 500.000 células y se mezclaron con 10 µl del cóctel de anticuerpos anti CD56, anti CD16, anti CD3, anti CD19 y anti CD14 conjugados con los fluorocromos Ficoeritrina-Cianina 5 (Pc5), Rojo de Texas (ECD), Rodamina Ficoeritrina (RPC) y Isotiocianato de fluoresceína (FITC) respectivamente. Se incubó en oscuridad durante 30 min a 4 °C. Se lavó la suspensión 2 veces con PBS, centrifugando a 400 x g durante 10 min a 4 °C y se analizaron las muestras en el citómetro de flujo Epics XL (Beckman-Coulter Electronics).

4.- Aislamiento de ARN mediante la técnica de trizol.

Para la extracción de ARN se empleó el protocolo basado en el reactivo TRIzol® (Life Technologies™) según el método descrito por Chomzynsky y Sacchi en 1987. El trizol es una solución monofásica de fenol e isocianato de guanidina, la cual mantiene la integridad del ARN mientras se disrumpan las células y sus componentes son disueltos.

Para lograr esto, una vez purificadas las células NK, se agregó al botón celular un volumen de trizol en la relación de 1ml de trizol por cada 10×10^6 cel. Una vez que las células se mezclaron vigorosamente con el trizol, se añadió una alícuota de cloroformo (Merck) (20 % del volumen de trizol agregado), se mezcló en el vórtex y se centrifugó a $12000 \times g$, durante 15 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente, se retiró cuidadosamente la fase acuosa (midiendo su volumen), y se transfirió a un nuevo tubo; se agregó isopropanol (Merck), 1:1 en relación al volumen medido de la fase acuosa extraída, se mezcló por inversión y se incubó a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se centrifugaron las muestras a $12000 \times g$, durante 20 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, se descartó el sobrenadante y se agregó al sedimento un volumen igual de etanol (Merck) al 75 %. Se realizó una tercera centrifugación a $12000 \times g$, por 20 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ y se descartó nuevamente el sobrenadante; se invirtieron los tubos y se dejaron secar sobre toallín. Finalmente, se resuspendió el precipitado en $40 \mu\text{L}$ de agua libre de nucleadas (Promega) y se almacenó a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta el momento de su uso.

5.- Síntesis del ADNc mediante transcriptasa reversa.

Una vez obtenido el ARN de las células NK se sintetizó el ADN complementario (ADNc), usando el estuche comercial de la enzima Super Script II (*SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR*, de Invitrogen Corporation). Esta enzima opera en

una cadena sencilla de ARNm, generando una cadena complementaria de ADN (Luque y Herráez, 2002). Además de esta enzima se agrega una proteína capaz de inhibir las RNasas eucariotas (como por ejemplo, RNasa A y B) y evitar así la degradación del ARN. Finalizado el proceso, el ADNc obtenido es amplificado mediante PCR.

Para la obtención del ADNc, se mezcló 1 μ l del oligo iniciador (mezcla de hexámeros, 50 ng/ μ l), 1 μ l de los dNTP (10mM) y 9 μ l de la muestra de ARN, se mezcló en el vórtex y se centrifugó. Esto fue llevado al termociclador donde se mantuvo 5 min a 65 °C. Posteriormente se preparó la mezcla de reacción, compuesta por: 2 μ l de Tampón de cDNA 10x (200 mM Tris HCl-pH 8,4; 500 mM KCl), 4 μ l de MgCl₂ (25mM), 2 μ l de Ditiotritol (DTT) (0,1 M), 1 μ l del inhibidor de ribonucleasas RNase Out (400 U/ μ l). En un área distinta a la de preparación de la mezcla de PCR, se agregó 9 μ l de esta mezcla a las muestras de ARN previamente preparadas y se dejó incubando la mezcla a temperatura ambiente durante 2 min. Luego se agregó 1 μ l de la Transcriptasa Reversa Super Script II. Se mezcló todo en el vórtex y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. La transcripción reversa se llevó a cabo en el termociclador MJ-Research PTC-200 (MJ Research) bajo las siguientes condiciones: primera fase: 45 °C durante 50 min; segunda fase: 70 °C durante 15 min. Para finalizar, se agregó 1 μ l de RNase H a cada tubo y se incubó en el termociclador a 37 °C durante 20 min y se mantuvo a 4 °C.

6.- Amplificación del ADNc por PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) es una técnica desarrollada por Kary Mullis a mediados de 1980 y cuyo principio, es la amplificación enzimática de fragmentos de ADN o de ARN (RT-PCR) flanqueados por iniciadores oligonucleotídicos que hibridan con hebras opuestas de la

secuencia original (Mullis y col. 1994). Ciclos repetidos de desnaturalización térmica del templado, acoplamiento de los iniciadores a su secuencia complementaria y extensión de los mismos con una ADN polimerasa, resultan en la amplificación de un segmento de ADN con un tamaño definido por la distancia entre los extremos 5' de los iniciadores de PCR (Luque y Herráez, 2002).

Posterior a la síntesis de ADNc, se llevó a cabo su amplificación. Para ello se preparó la mezcla de reacción: 33 μ l de agua libre de nucleasas, 5 μ l de Buffer de reacción 10x (200 mM Tris-HCl-pH 8,4; 500 mM KCl), 1,5 μ l de $MgCl_2$ (25 mM), 4 μ l de la mezcla de nucleótidos dNTPs (2,5 mM), 1 μ l del iniciador sentido (50 μ M) y 1 μ l del antisentido (50 μ M) (Secuencias presentadas en la tabla I) y 0,5 μ l de la enzima Taq polimerasa (5 U/ μ l). Se mezcló en vórtex y en la campana se agregaron 4 μ l de la muestra de ADNc; se mezcló todo en el en vórtex y se centrifugó rápidamente. La mezcla fue llevada al termociclador MJ-Research PTC-200 (MJ Research) y la amplificación se realizó bajo el siguiente protocolo: desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min; 5 ciclos de amplificación (94 °C por 60 seg, 61 °C por 60 seg y 72 °C por 45 seg); seguido de 29 ciclos de amplificación (94 °C por 30 seg, 60 °C por 45 seg y 72 °C por 45 seg); extensión final a 72 °C por 10 min; el producto final se mantuvo a 4 °C (Thompson y col. 2006).

Tabla I.- Secuencias y tamaños para los iniciadores usados en la reacción de PCR (Tomados de Thompson, A. 2006).

Receptor	Sentido	Antisentido	Tamaño del amplificado
KIR 2DL1	TCT CCA TCA GTC GCA TGA C	CAG AAT GTG CAG GTG TCG	488pb
KIR 2DL2	GCA ATG TTG GTC AGA TGT CAG	GCC CTG CAG AGA ACC TAC A	383pb
KIR 2DL3	CCA CTG AAC CAA GCT CCG	CAG GAG ACA ACT TTG GAT	352pb
KIR 3DL1	ACA TCG TGG TCA CAG GTC C	ACA ACT TTG GAT CTG GGC	663pb
KIR 2DS4	GGT TCA GGC AGG AGA GAA T	TTG ACC ACT CGT AGG GAG C	196-218pb
GADPH ⁽¹⁾	GGT CTT ACT CCT TGG AGG CCA TGT G	TTG TAC ATT TGG TAC ATC ACT CCA	240pb

⁽¹⁾ El Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) fue usado como control positivo interno.

7.- Análisis de los amplificados.

La electroforesis en gel de agarosa se basa en la aplicación de un campo eléctrico a través de un gel de agarosa ocasionando que, el ADN que está cargado negativamente, migre hacia el ánodo en relación a su tamaño y forma, puesto que las moléculas de ADN lineal doble cadena, tienden a migrar más rápidamente que las moléculas grandes debido a la fricción que éstas últimas generan (Sambrook, 1989).

Se preparó el gel de agarosa al 2 %, mezclando 1,4 gr de agarosa en 70 mL de buffer TBE (Tris-Borato-EDTA) 1X; se calentó alrededor de 4 min y se vertió la mezcla en el molde que contiene los peines. Se dejó solidificar durante 20 min y luego se colocó en la cámara de electroforesis. Las muestras se colocaron en el gel, mezclando 5 µL de buffer de carga con 5 µL del marcador de peso molecular representado por el ADN del fago Φ174 cortado con la enzima Hae-III. Además se mezclaron 6 µL de buffer de carga (H₂O, glicerol al 30% y 0,09 % de azul de bromofenol) con 20 µL de la muestra. La corrida

electroforética se llevó a cabo durante 1 h a 100 V. Finalizada la misma, se tiñó el gel con BrE durante 10 min en agitación y luego se lavó con agua durante 5 min en agitación. El gel se visualizó en el transiluminador de luz UV y la imagen se obtuvo digitalmente con el sistema de captación de imágenes BioRad (Gel Doc XR).

8.- Cuantificación del ADNc mediante PCR Tiempo Real.

En esta técnica, la PCR se acopló a la emisión de una señal fluorescente proporcional a la cantidad de producto de la PCR producido en los diferentes ciclos de amplificación. La primera aplicación de la PCR en tiempo real derivó de los experimentos de y colaboradores (Higuchi y col. 1992, 1993), quienes sustituyeron el bromuro de etidio como colorante de intercalación al ADN por uno fluorescente, menos tóxico y más específico y sensible como el SYBR Green I. El SYBR Green I se une al surco menor del ADN bicatenario, potenciando (entre 800 y 1000 veces) la fluorescencia, permitiendo la cuantificación de todas las moléculas de ADN presentes en la PCR (Weighardt, 2007). Esta técnica permite coleccionar datos en todo momento de la amplificación, incrementando el rango la dinámica de detección y no requiere procesamiento posterior a la PCR.

Para realizar esta técnica se mezclaron 25 μ l del tampón de reacción (2X RT) y la enzima RT (20X) del estuche comercial SYBR Green, con 0,5 μ l de los iniciadores específicos presentados en la tabla I para cada receptor KIR y para el control positivo interno usado (GADPH), 20,5 μ l de agua y 3,5 μ l de la muestra de ADNc, para obtener un volumen final de 50 μ l y se añadieron a una placa de 96 pozos. El protocolo de amplificación es el mismo que se presenta en el apartado para la RT-PCR, sólo que en vez de 29 ciclos de amplificación se realizaron 40 ciclos. Mediante esta técnica se realizó una cuantificación relativa de la expresión del ARNm.

9.- Comparación de la expresión de KIR mediante RT-PCR con la expresión a nivel de membrana.

Para lograr relacionar la expresión de los receptores KIR a nivel de ARNm y de proteína, se compararon los datos obtenidos en la cuantificación de la expresión a nivel de ARNm mediante PCR en tiempo real, RT-PCR y datos disponibles en el laboratorio sobre la expresión de los receptores a nivel de proteína. Este último análisis fue realizado mediante el marcaje directo en sangre total con los anticuerpos monoclonales para los receptores KIR 2DL1-FITC, 2DL3-FITC, 3DL1-FITC y 2DS4-RD, más CD56-PC5 y CD3-ECD. El porcentaje de células positivas para cada receptor se obtuvo mediante lectura por citometría de flujo, ubicando en el mapa de linfocitos a las células NK (CD56⁺/CD3⁻).

10.- Análisis estadístico.

Los resultados fueron analizados usando la prueba de Chi cuadrado. La significancia (*P*) de la expresión del ARNm entre los grupos de estudios se buscó en la tabla de X^2 con 1 grado de libertad. La relación de la expresión de KIR, entre las dos variables (ARNm y proteína) se determinó mediante la prueba de correlación de Pearson.

RESULTADOS

Con la finalidad de poder estudiar la expresión de los receptores KIR a nivel de ARNm se realizó una purificación de células mononucleares de sangre periférica, mediante la técnica de Ficoll-Hypaque, a partir de la cual se logró enriquecer las células NK utilizadas en este estudio. Posteriormente se extrajo el ARNm de las células NK usando la técnica de trizol y se evaluó la expresión del ARNm de los receptores KIR 2DL1, 2DL2, 2DL3, 3DL1 y 2DS4 mediante RT-PCR y PCR tiempo real.

1.- Obtención de suspensiones celulares enriquecidas en células NK.

1.1.- Valores relativos y absolutos de células NK.

En la presente investigación, se incluyeron 12 individuos sanos (3 hombres y 9 mujeres) y 10 pacientes crónicamente infectados con el VHC (2 hombres y 8 mujeres), con un rango de edades comprendidas, entre 37 y 71 años.

En la tabla II, se presentan los valores relativos y absolutos de las células NK de sangre periférica del grupo de controles y pacientes evaluados en esta investigación. Se muestran los valores promedio del número de leucocitos por ml de sangre, el porcentaje de células NK y número absoluto de ellas, obtenido mediante la relación entre porcentaje de linfocitos y el porcentaje de células NK en sangre periférica. De acuerdo al promedio, los valores del número de leucocitos de pacientes y controles se encontraron dentro del rango hematológico considerado normal ($4,5 \times 10^6$ - $10,5 \times 10^6$ cel/ml), al momento de tomar la muestra. En cuanto a las células NK el promedio del porcentaje de estas células en la subpoblación de linfocitos, para controles y pacientes fue de 10,89 % y 11,30 % respectivamente, encontrándose de igual forma dentro del rango de valores normales

reportados en la literatura (10–15 %) (Farag y Caligiuri, 2007). Se reporta además el grado de dispersión de los datos obtenidos con respecto al valor promedio presentado y se encontró que no hay diferencia significativa entre los valores de número de leucocitos ($P = 0,093$) y porcentaje y número absoluto de células NK ($P = 0,847$, $P = 0,865$ respectivamente) entre los grupos de controles y pacientes.

Tabla II.- Características celulares de controles y pacientes VHC⁺.

	LEU (x 10 ⁶ cel/ml)	% NK	NK (x 10 ⁶ cel/ml)
CONTROLES (n = 12)	7,78 ± 2,8	10,89 ± 4,1	3,67 ± 1,8
PACIENTES (n = 10)	5,84 ± 2,1	11,30 ± 5,1	3,81 ± 1,7

Los valores presentados corresponden al promedio y desviación estándar de número absoluto de leucocitos (LEU) y porcentaje (% NK) y número absoluto (x 10⁶ cel/ml) de células NK en sangre periférica.

1.2.- Aislamiento de Células mononucleares de sangre periférica y enriquecimiento de células NK.

En virtud de que la expresión de genes KIR se restringe a la población de células NK, resultaba crítico en el presente estudio obtener poblaciones enriquecidas en estas células a partir de sangre periférica.

Partiendo de un volumen de muestra de sangre periférica de entre 45 y 50 ml se realizó una separación en gradiente de densidad de las CMSP (compuestas por linfocitos y monocitos). Mediante esta técnica se logró un alto rendimiento de CMSP, a partir de las cuales se realizó la técnica de adherencia al plástico para la eliminación de monocitos y posterior enriquecimiento de células NK, mediante el cóctel de anticuerpos RosetteSep®. Para evaluar la pureza de la suspensión celular, se tomaron 5 x 10⁵ cel para realizar el

fenotipaje con un conjunto de anticuerpos monoclonales dirigidos contra moléculas de superficie específicos para las poblaciones de células NK, T, B y monocitos.

En la figura 7A, se muestra un histograma de citometría de flujo, donde se ubica la población de células NK, positivas para CD56, según su tamaño (eje X) y su granularidad (eje Y). En la figura 7B, se muestra un análisis comparativo mediante triple marcaje, de la expresión en superficie de las moléculas CD56⁺/CD16⁺ y CD3⁺. En el eje X, se encuentra el marcador para células T (CD3⁺) y en el eje Y el marcador para células NK (CD56⁺/CD16⁺). En esta figura, en el cuadrante 1 se ubican las células CD56⁺; en el cuadrante 2 se encuentran las células doblemente marcadas, es decir aquellas que son CD56⁺/CD3⁺, lo que corresponde a población de células NKT; en el cuadrante 4 las células T y en el tercer cuadrante las células no marcadas.

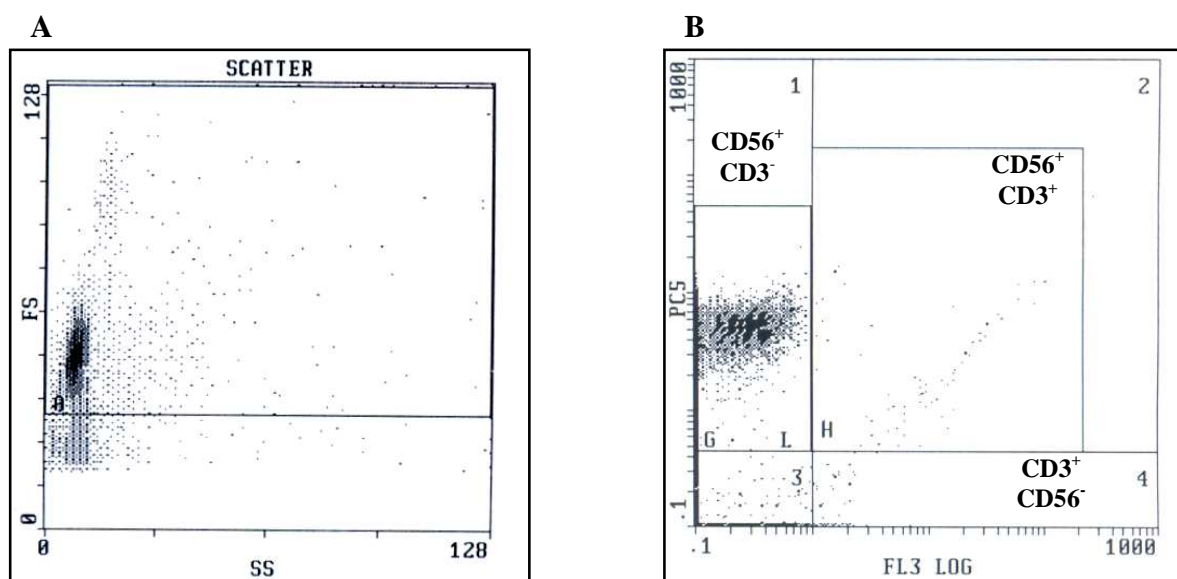


Figura 7.- Histogramas obtenidos mediante citometría de flujo, para identificar a la población de células NK. (A) Distribución de las células NK según su tamaño y granularidad; (B) Identificación de las células NK mediante inmunofenotipaje.

En la figura 8 se presentan la estimación del número de células positivas para CD56. La figura 8A corresponde a la población de células NK, nótese que lo abarcado por el cursor del histograma (D) es la fluorescencia específica para las moléculas CD56⁺/CD16⁺, mientras que en las figuras 8B, 8C y 8D corresponden a monocitos, linfocitos B y T respectivamente, los cuales presentan bajos porcentajes de estas células.

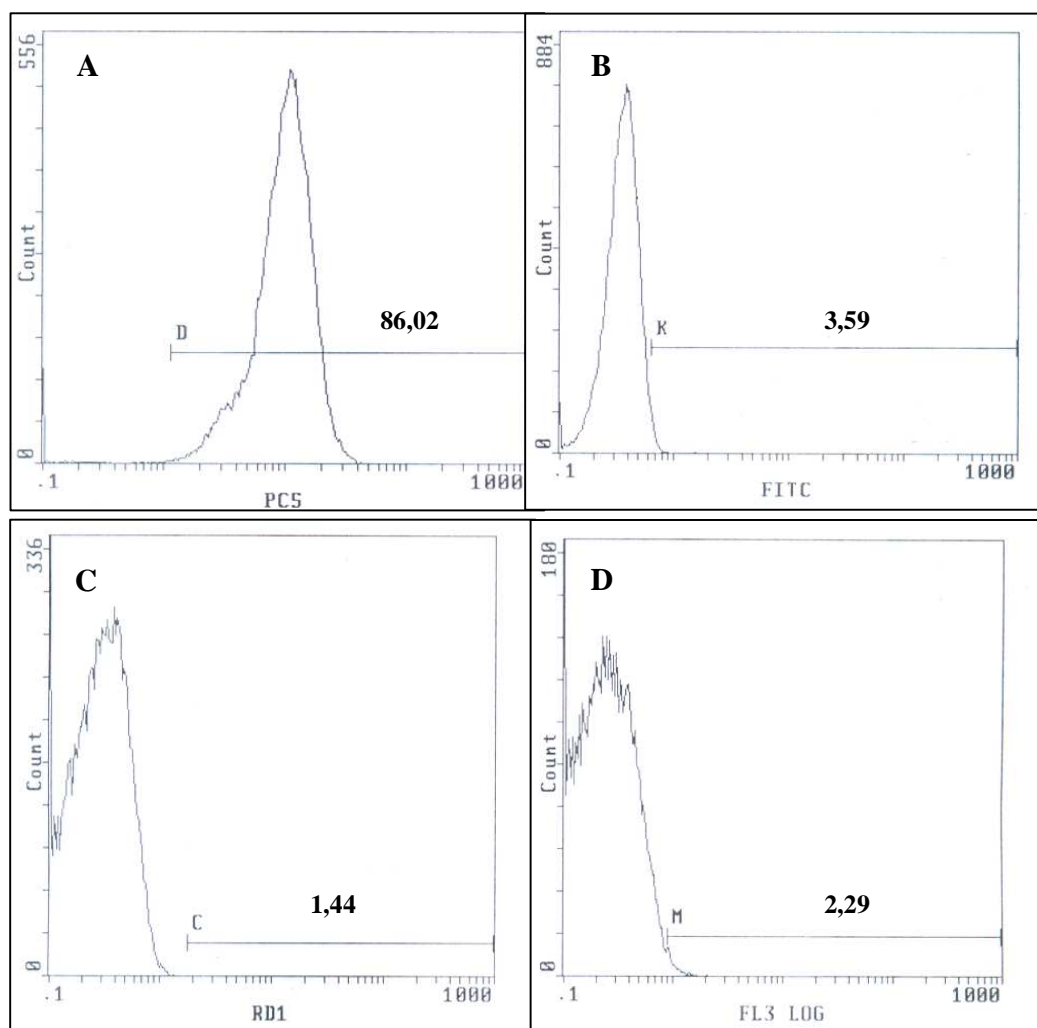


Figura 8.- Histograma de las poblaciones de células NK, monocitos, linfocitos B y T. (A) Células NK; (B) Monocitos; (C) Linfocitos B; (D) Linfocitos T.

En la tabla III se presentan los valores promedios de pureza, expresadas en porcentajes, de los posibles tipos celulares presentes en suspensión, linfocitos T, B y monocitos, analizadas con el citómetro de flujo y de los rendimientos obtenidos (en base a la relación entre el número de células NK obtenidas y el número de células NK esperado). Es de notar que siendo los linfocitos T y B las poblaciones de CMSP con mayores concentraciones en sangre periférica (aproximadamente entre 60 % y 15 % respectivamente) (Corado y Mora de Orta, 2003), el porcentaje remanente de estas células fue bastante bajo (menor al 3 %) siendo mayor el porcentaje de monocitos (5 % en el grupo de pacientes), demostrando que el número de células contaminantes en la suspensión celular fue bajo (figura 7). En cuanto a los valores de pureza de las células NK, se obtuvo un porcentaje promedio de pureza de células CD56⁺/CD16⁺/CD3⁻ de 86,37 % para los controles y 85,67 % para los pacientes, lo esperado según la información suministrada en el inserto del RosetteSep®, el cual indica que la pureza obtenida debe ser mayor del 70 %, obteniéndose entre 1,5 y 2 millones de células NK enriquecidas con un rendimiento entre 20-40 %. Así mismo, no se obtuvo diferencia significativa en las purezas de las muestras de los controles y pacientes ni en los rendimientos celulares obtenidos.

Tabla III.- Pureza y Rendimiento de las suspensiones enriquecidas en células NK.

	% PUREZA				% R
	CD56 ⁺ CD16 ⁺	CD3 ⁺	CD19 ⁺	CD14 ⁺	
CONTROLES (n=12)	86,37 ± 8,18	2,87 ± 3,82	1,46 ± 2,32	2,17 ± 1,92	27,83 ± 14,50
PACIENTES (n=10)	85,67 ± 11,12	1,71 ± 2,30	1,42 ± 1,22	5 ± 4,22	24,27 ± 7,12

Fenotipo celular: CD56⁺CD16⁺ células NK; CD3⁺ linfocitos T; CD19⁺ linfocitos B; CD14⁺ monocitos. % R porcentaje del rendimiento celular.

2.- Evaluación de la expresión del ARNm de los receptores KIR mediante RT-PCR.

Mediante la técnica de RT-PCR evaluamos la expresión del ARNm de los receptores KIR 2DL1, 2DL2, 2DL3, 3DL1 y 2DS4, en 5 muestras de individuos controles. En la figura 9, se muestran ejemplos representativos de los registros fotográficos de los productos de amplificación de RT-PCR. En el registro fotográfico 9A se muestran los resultados para el receptor KIR 2DL1, cuyo amplificado corresponde a una banda de 488 pb y se puede apreciar que todos los individuos expresan el ARNm. La figura 9B corresponde al receptor KIR 2DL2 y se observa que 2 de los 5 individuos expresan el gen. En la figura 9C, 9D y 9E se presentan los receptores inhibidores KIR 2DL3, 3DL1 y el activador KIR 2DS4 y de igual manera que lo observado con el receptor KIR 2DL1, todos los individuos expresan estos genes. La figura 9F corresponde a los productos de amplificación para el control de expresión constitutiva, GADPH, lo que nos indica que el ARNm no se encuentra degradado y nos da indicio de la eficiencia de la técnica. También se incluyó en cada reacción un control negativo, usando agua como templado, para corroborar que no hay contaminación en los reactivos. Las diferentes intensidades en los amplificados dependen de la frecuencia con que cada uno de estos receptores se expresan en las células NK y del nivel de expresión de estos en las mismas, puesto que como se mencionó anteriormente cada célula NK puede expresar diferentes combinaciones de KIR.

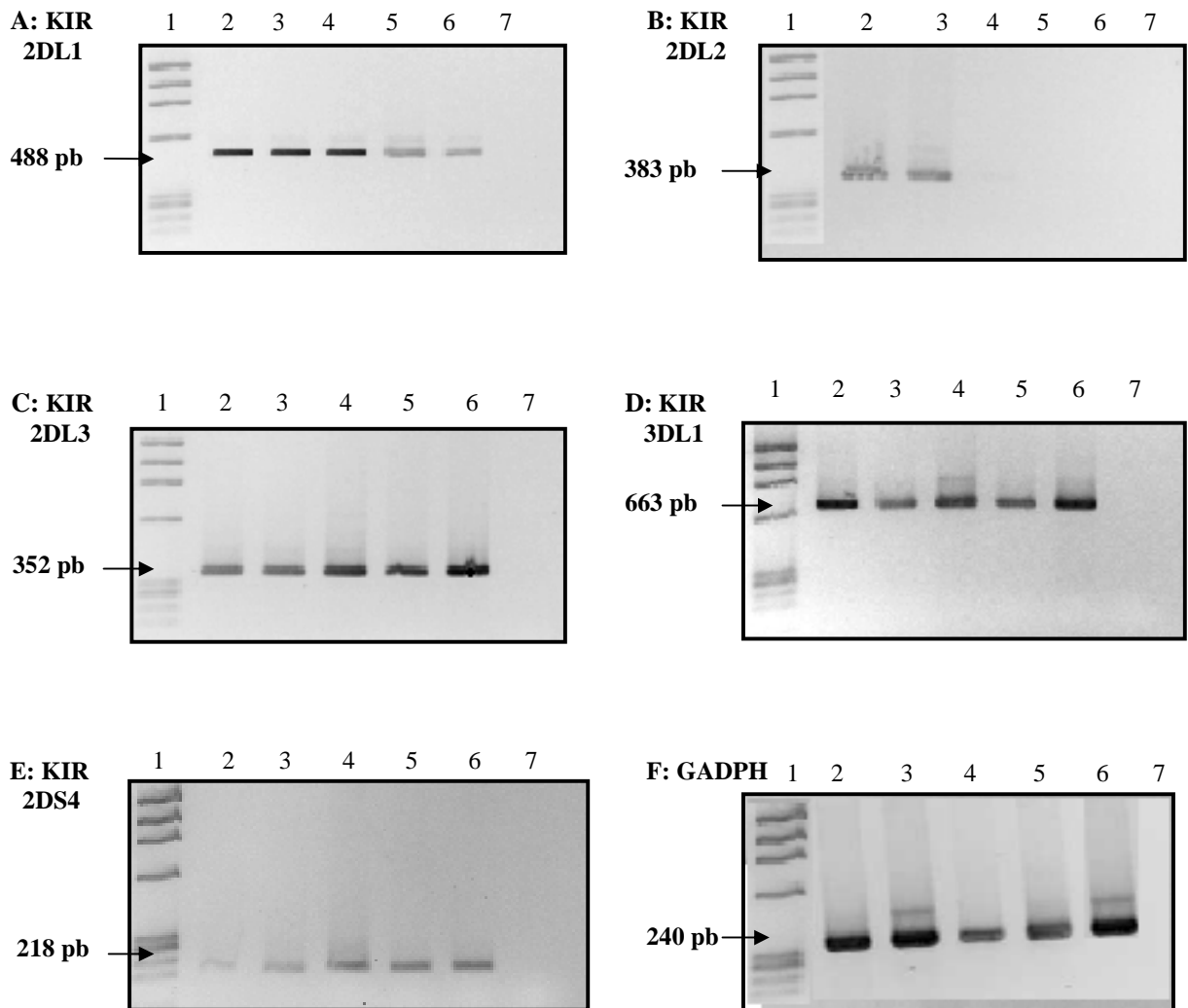


Figura 9.- Registros fotográficos de productos de amplificación mediante RT-PCR, de los receptores KIR y GADPH. KIR 2DL1 (A), 2DL2 (B), 2DL3 (C), 3DL1 (D), 2DS4 (E) y el control interno GADPH (F). Las muestras utilizadas en la RT-PCR corresponden a los controles presentados en la tabla IV. Φ 174 (1), Control 1 (2), C2 (3), C3 (4), C4 (5), C5 (6), C. con agua como templado (7).

En la tabla IV se muestran los resultados obtenidos de la expresión del ARNm en comparación a su respectivo genotipo.

Se obtuvo que en los 5 individuos analizados los receptores KIR se expresan de acuerdo a la presencia o ausencia del gen; esto se determinó analizando los productos de la RT-PCR en los registros fotográficos de los geles de agarosa (figura 9). Como se puede apreciar en la tabla IV, los 5 individuos estudiados presentan y expresan los genes KIR 2DL1, 2DL3, 3DL1 y 2DS4, mientras que sólo dos de ellos poseen y expresan el gen para el receptor KIR 2DL2, por lo tanto la frecuencia de aparición de este receptor (40 %) es menor que la del resto de receptores (100 %). Puesto que los genes KIR 2DL2 y 2DL3 se segregan juntos, es posible encontrar individuos homocigos KIR 2DL2/2DL2 y 2DL3/2DL3, así como individuos heterocigos KIR 2DL2/2DL3, por tanto según lo reportado en la tabla, de los 5 individuos presentados, los individuos 1 y 2 (40 %) son heterocigos para estos receptores puesto que poseen ambos genes y los individuos 3, 4 y 5 (60 %) son homocigos para el receptor inhibidor 2DL3.

Tabla IV.- Relación entre la presencia de los genes correspondientes a los receptores KIR y su expresión a nivel de ARNm.

CONTROL	2DL1		2DL2		2DL3		3DL1		2DS4	
	G	ARNm	G	ARNm	G	ARNm	G	ARNm	G	ARNm
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
4	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
5	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+

G corresponde a la presencia o ausencia del gen evaluado.

+ Presencia de la expresión del ARNm por RT-PCR.

- Ausencia de la expresión del ARNm por RT-PCR.

Puesto que hay una relación directa entre la presencia de estos genes y la expresión de los mismos y dado que todos los individuos son positivos para estos genes y los expresan, no se pudo realizar la prueba de Chi cuadrado para encontrar la asociación entre genotipo y expresión; sin embargo se puede afirmar que para los genes KIR 2DL1, 2DL3, 3DL1 y 2DS4, la técnica de RT-PCR presenta un 100 % de sensibilidad. En cuanto al receptor 2DL2, donde tampoco se pudo determinar la asociación, se obtuvo 100 % de sensibilidad y 100 % de especificidad entre genotipo y expresión mediante RT-PCR.

3.- Estudio de la expresión de ARNm por PCR tiempo real.

3.1.- Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real para el estudio de la expresión a nivel del ARNm.

En esta parte del estudio, incluimos 10 controles y 10 pacientes. Paralelo al análisis de la expresión a nivel de ARNm, se determinó en el laboratorio, mediante una PCR de secuencia de iniciadores específicos (PCR-SSP), el genotipo de KIR de estos individuos (tabla V). El estuche comercial empleado en esta técnica permite la identificación de los 14 genes y 2 pseudogenes y además permite diferenciar entre dos grupos de variantes alélicas para el receptor KIR 2DS4, los alelos *001 al *002 y por otro lado los alelos *003, *004 y *006, puesto que se amplifica el ADN genómico en 2 pozos diferentes de la placa utilizada para la amplificación, cada uno correspondiente a cada conjunto de alelos KIR 2DS4.

En tal sentido, nuestros resultados muestran que todos los individuos poseen el gen KIR 2DL1 y el 2DS4. Con respecto a este receptor, el análisis de este polimorfismo que se realizó para 16 de los individuos, mostró que 7/16 individuos (43,75 %) poseen alguna variante alélica *001 o *002; 5 (31,25 %) poseen las otras formas alélicas, *003, *004 o *006 y 4 individuos (25 %) poseen ambas formas alélicas. En cuanto a KIR 3DL1, 2DL2 y

2DL3, 19 de 20 individuos poseen el gen 3DL1; 10 de los individuos poseen el gen KIR 2DL2 (50 %) y 19 (95 %) poseen el gen KIR 2DL3; en este particular, el 45 % de los individuos son heterócigos puesto que poseen ambos genes, 50 % son homócigos para KIR 2DL3 y sólo el 5 % es homócigo para KIR 2DL2. El genotipaje nos permitirá conocer si hay correspondencia entre la posesión del gen y los resultados de expresión obtenidos mediante PCR tiempo real.

Tabla V.- Genotipaje de KIR de los individuos (controles y pacientes) incluidos en este estudio.

		2DL1	2DL2	2DL3	3DL1	2DS4		
						2DS4	*001-*002	*003-*004-*006
CONTROLES	1	+	-	+	+	+	+*	
	2	+	+	+	+	+	+*	
	3	+	+	+	-	+	+	
	4	+	-	+	+	+	+*	
	5	+	+	+	+	+	+	
	6	+	+	+	+	+		+
	7	+	-	+	+	+	+	+
	8	+	-	+	+	+	+	
	9	+	+	+	+	+	+	
	10	+	+	+	+	+	+*	
PACIENTES	1	+	-	+	+	+	+	+
	2	+	-	+	+	+	+	+
	3	+	-	+	+	+	+	
	4	+	+	+	+	+		+
	5	+	+	+	+	+		+
	6	+	+	-	+	+		+
	7	+	-	+	+	+	+	
	8	+	-	+	+	+	+	+
	9	+	+	+	+	+	+	
	10	+	-	+	+	+		+

+ Presencia del gen.

- Ausencia del gen.

* Polimorfismo no identificado.

En la PCR en tiempo real, el colorante SYBR Green I se une a los surcos menores del ADN doble cadena. Durante los ciclos consecutivos de amplificación, las cantidades de los productos de PCR van incrementando exponencialmente emitiendo una fluorescencia que es proporcional a la cantidad de producto formado.

Como parte de la estandarización de la técnica para obtener las condiciones de amplificación ideales para el estudio de la expresión del ARNm de los receptores KIR, se

evaluaron como variables, la población celular a estudiar, por lo cual se utilizaron dos poblaciones celulares diferentes, linfocitos de sangre periférica (LSP) y células NK, el volumen de muestra de ADNc a emplear y la concentración de los iniciadores específicos para cada gen KIR.

En la figura 10 se muestran los resultados de una curva de amplificación para el receptor KIR 2DL1 con muestras de dos controles, para las dos poblaciones celulares, LSP (curvas señaladas con la letra “a”) y células NK (curvas identificadas con la letra “b”).

Para fines de cuantificación relativa, se utilizó el parámetro en la PCR en tiempo real el parámetro Ct (*Threshold cycle*), que representa el número del ciclo en la amplificación al cual se alcanza el nivel umbral de fluorescencia (*Threshold*).

Se puede observar que el número de ciclos al que las muestras de LSP alcanzan el valor umbral de fluorescencia es mucho mayor que el número de ciclos al que la población de células NK lo hace. Esto se debe a que al estar constituida la población de LSP, por linfocitos T y B y células NK y dado que, como se ha mencionado anteriormente, la expresión de estos receptores está restringida a las células NK, ésta se diluye en la muestra; mientras que en la suspensión de células NK la expresión de los mismo está más concentrada y por ende emite más fluorescencia.

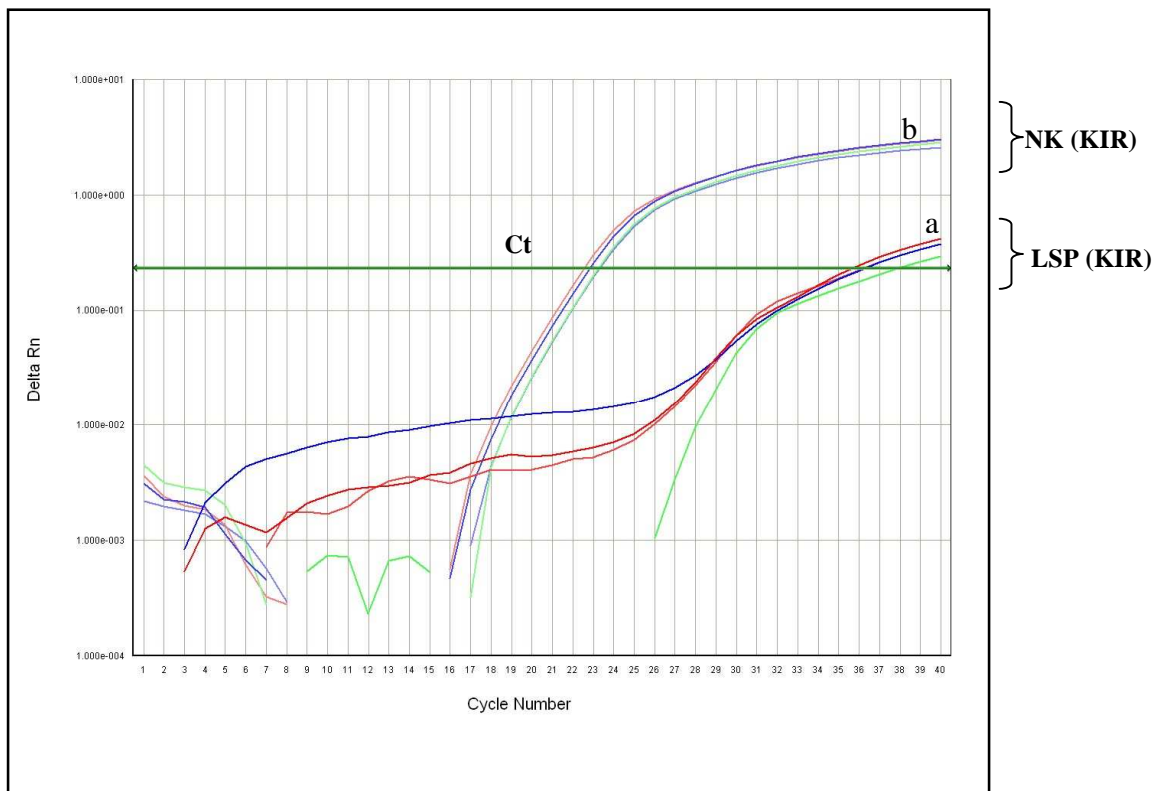


Figura 10.- Cuantificación relativa de la expresión del ARNm representado en una curva de amplificación. En esta gráfica se muestra un modelo de la cinética de amplificación para el receptor 2DL1. En el eje Y se presentan los valores de magnitud de la señal de fluorescencia generada en la amplificación y en el eje X el número de ciclos de la reacción. (a) LSP (KIR); (b) Células NK (KIR).

En la figura 11 se presentan dos ejemplos representativos de curvas de disociación para el receptor KIR 2DL3 (11A) y del control interno GADPH (11B). En estas curvas se muestran las temperaturas de fusión de los amplificadores (T_m), la cual oscila entre 80 y 85 °C en ambos casos (A y B). Cada fragmento de ADN amplificado tiene una T_m característica, que depende principalmente de su longitud y de la composición de sus bases. Esta curva permite comprobar la especificidad de los fragmentos detectados en la PCR, verificándose la presencia de un único amplificado.

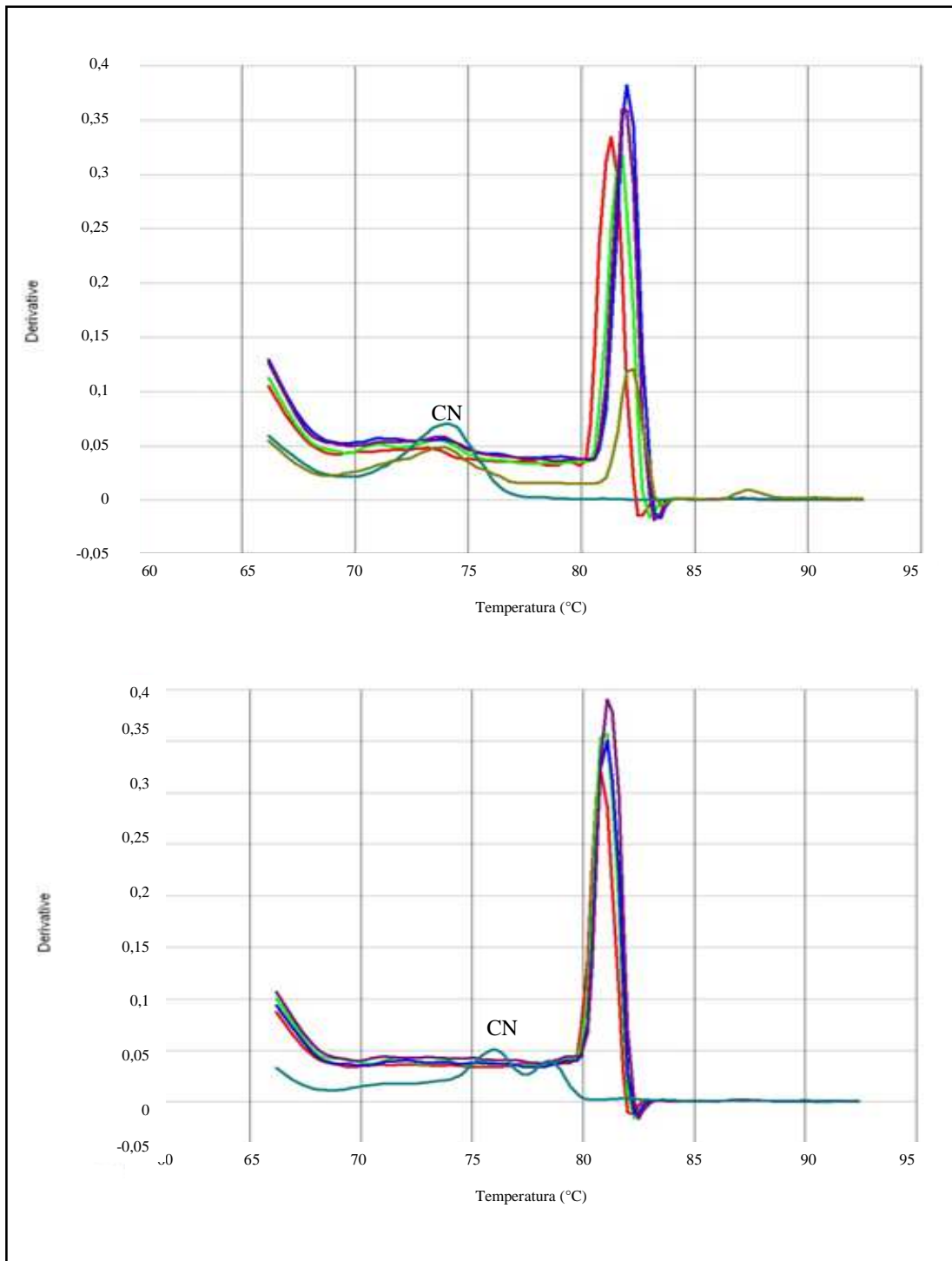


Figura 11.- Curvas de disociación para el ARNm del receptor KIR 2DL3 (A) y el control interno GADPH (B), como índice de la especificidad de los amplificandos. En el eje X se presentan los valores de temperatura y en eje Y la fluorescencia emitida. CN, corresponde al control negativo. Las líneas de colores indican cada uno de los individuos a los que se les realizó este análisis.

En la figura 12 se presentan dos ejemplos de curvas de amplificación correspondientes al receptor KIR 2DL3 (figura 12A) y GADPH (figura 12B), usado como control interno para normalizar la cantidad de ADNc contenida en cada reacción inicial, para controles y pacientes. Los valores del cambio en la fluorescencia durante la reacción (eje Y) se expresan como ΔR_n , que corresponde al radio de la intensidad de la emisión de fluorescencia del colorante reportero y de la emisión del colorante pasivo de referencia (R_n) menos el cambio de fluorescencia en los primeros ciclos de amplificación (línea de base). El colorante reportero es en este caso, el que se une al ADNc, y el colorante pasivo es el que provee un señal interna de fluorescencia con la cual la señal del colorante reportero puede ser normalizada por el equipo durante el análisis de los datos; la normalización es necesaria para corregir las fluctuaciones en la fluorescencia causadas por las variaciones en los volúmenes de las muestras. En el eje X se encuentran el número de ciclos de la reacción; por lo tanto en estos gráficos se representa la intensidad de la emisión de fluorescencia en cada ciclo de la reacción. Se observa que a medida que los ciclos de amplificación aumentan, la fluorescencia emitida por los productos de amplificación es mayor y sigue aumentando de forma exponencial hasta alcanzar una fase donde la señal de fluorescencia se hace constante.

Las curvas ubicadas más hacia la derecha de la gráfica A, corresponden a las muestras que presentan menor expresión o que son negativas para el gen (caso particular del paciente 6, P6). En todas las reacciones se usó un control negativo (CN), con agua como templado, para confirmar la especificidad de la PCR.

Se puede observar que en la mayoría de las curvas de GADPH los valores de Ct son menores que para las curvas de KIR 2DL3, lo que indica que el umbral de fluorescencia para este gen constitutivo se alcanza más rápido que para el receptor KIR. Este

comportamiento se observó en todas las curvas de amplificación correspondientes a los otros receptores KIR.

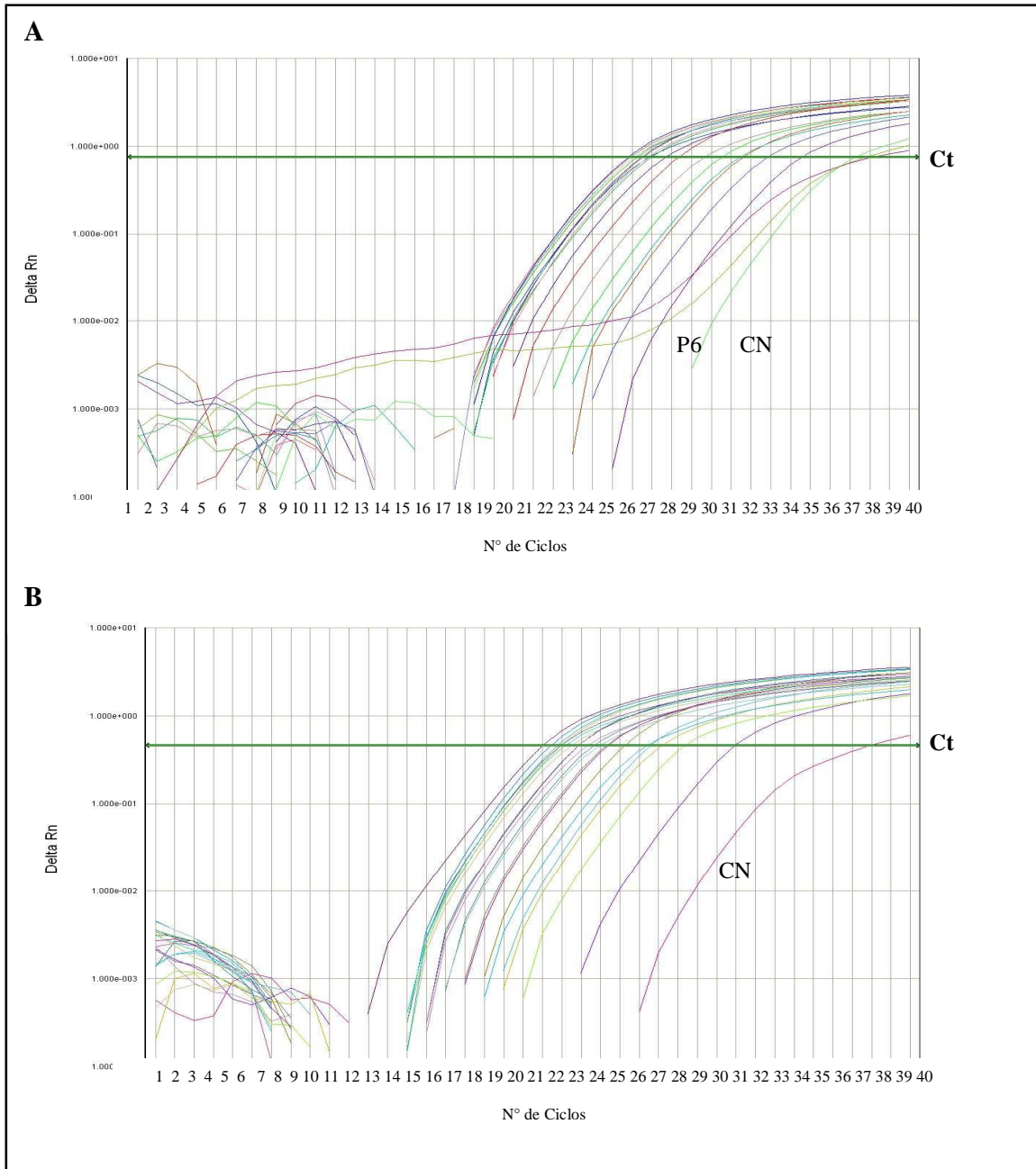


Figura 12.- Cuantificación relativa de la expresión del ARNm mediante PCR en tiempo real representado en una cinética de amplificación. En esta gráfica se muestra un modelo de amplificación para el receptor 2DL3 (A) y el control interno GADPH (B). En el eje Y se presentan los valores de magnitud de la señal de fluorescencia generada durante la amplificación y en el eje X el número de ciclos de la reacción.

3.2.- Comparación de la cuantificación relativa de la expresión de ARNm para KIR en el grupo de pacientes VHC⁺ respecto al grupo control.

Para determinar cuantitativamente el nivel de expresión a nivel de ARNm de los receptores KIR en individuos sanos y pacientes crónicamente infectados con VHC, se realizó una PCR en tiempo real.

En la tabla VI se presentan los valores de dCt, siendo estos valores inversamente proporcional a la cantidad de los transcritos de KIR presentes en la muestra, normalizados con los valores obtenidos para el control interno GADPH. Este valor, dCt, se refiere a la diferencia entre los valores de Ct de cada individuo, para cada receptor y los valores de Ct de cada individuo para el GADPH (CtKIR – CtGADPH). De acuerdo a los resultados obtenidos en el dCt para cada individuo, se estableció un valor de referencia tomando en cuenta el genotipaje de los individuos, para aquellos receptores donde hubiese algún individuo negativo para ese gen en particular. En comparación a la presencia del gen en los individuos, los 20 individuos expresan el receptor KIR 2DL1, los 10 individuos que poseen el gen KIR 2DL2, lo expresan; los 19 individuos positivos para el gen KIR 2DL3 lo expresan; el gen KIR 3DL1 sólo es expresado por 17 de los 19 individuos positivos para el gen y el receptor KIR 2DS4 sólo lo expresan 18 individuos. Cabe acotar, que ya que el individuo negativo para el gen KIR 3DL1 (control 6) no generó lecturas en valores Ct y dos individuos positivos para el gen presentan el mismo resultado, tomamos como umbral el Ct igual a 38, como lo reportan en su estudio, Cooley y colaboradores (2007).

Tabla VI.- Resultados de la expresión de los receptores KIR en función del valor dCt, obtenidos mediante PCR tiempo real.

		2DL1	2DL2	2DL3	3DL1	2DS4
CONTROLES	1	2,874	14,342	3,251	4,89	9,632
	2	3,84	4,329	5,768	8,359	8,047
	3	3,355	5,633	1,972	-	7,38
	4	3,013	13,584	4,111	8,389	7,61
	5	0,695	6,601	5,437	10,635	6,846
	6	7,001	4,965	6,4	10,069	10,875
	7	4,756	14,327	5,146	7,959	9,551
	8	7,255	-	6,879	11,077	10,624
	9	7,255	7,061	8,665	14,033	13,538
	10	10,14	8,463	9,3	13,144	15,215
PACIENTES	1	3,423	11,389	2,179	6,785	5,901
	2	4,314	12,856	3,446	13,523	8,791
	3	5,011	-	3,616	9,164	8,837
	4	6,547	7,804	6,3	-	10,694
	5	4,444	1,741	3,051	8,745	6,94
	6	7,269	4,383	15,403	8,294	7,47
	7	7,793	13,901	4,07	10,154	16,154
	8	5,087	12,092	3,98	10,293	11,304
	9	3,664	6,003	3,399	-	8,649
	10	4,18	8,868	3,28	9,175	11,462

- En estas muestras no se obtuvo valores de Ct y corresponden a genes negativos.

□ Estos valores corresponden al Ct de los genes negativos y por lo tanto son considerados negativos para la expresión del ARNm por PCR tiempo real.

Los valores de expresión del ARNm de los controles y pacientes se promediaron para comparar el nivel de expresión de cada receptor entre las dos poblaciones de estudio (figura 13). En general se observa que, en el grupo control los niveles de expresión de los receptores son bastante cercanos, siendo el menor valor de dCt (que corresponde a una mayor expresión del ARNm) el correspondiente al receptor inhibidor KIR 2DL1 y el mayor (que corresponde a una expresión menor del mensajero) al receptor activador KIR 2DS4.

Se encontró diferencia significativa entre la expresión del receptor KIR 2DL1 y los receptores KIR 3DL1 ($P=0,0016$) y 2DS4 ($P=0,0093$), no encontrándose diferencias en relación a los receptores KIR 2DL2 y 2DL3. Para el grupo de pacientes, el mayor nivel de expresión lo presenta el receptor KIR 2DL3, y los menores niveles de expresión correspondieron a los receptores KIR 2DS4 y 3DL1. Se encontró diferencia significativa entre los niveles de expresión del receptor KIR 2DL3 y el los receptores KIR 2DL1 ($P=0,029$), 3DL1 ($P= 5,46 \times 10^{-7}$) y 2DS4, ($P= 2,81 \times 10^{-5}$), siendo la mayor diferencia en relación al receptor KIR 3DL1. No se encontró diferencia entre KIR 2DL3 y 2DL2 ($P=0,222$).

Comparando ambos grupos, se observa que el grupo control tiene mayor expresión del receptor KIR 2DL1, ambos presentan igual expresión de KIR 2DL2 y el grupo de pacientes tiene mayor expresión de los receptores KIR 2DL3, 3DL1 y 2DS4, siendo esta diferencia significativa para los niveles de expresión de ARNm del receptor 2DL3 ($P=0,029$), al compararlo con el grupo control, como se reporta en la figura 13. Los resultados en cuanto a la expresión de 2DL3 en pacientes concuerda con lo que está reportado en la literatura, sobre la asociación de este receptor y la infección por el VHC.

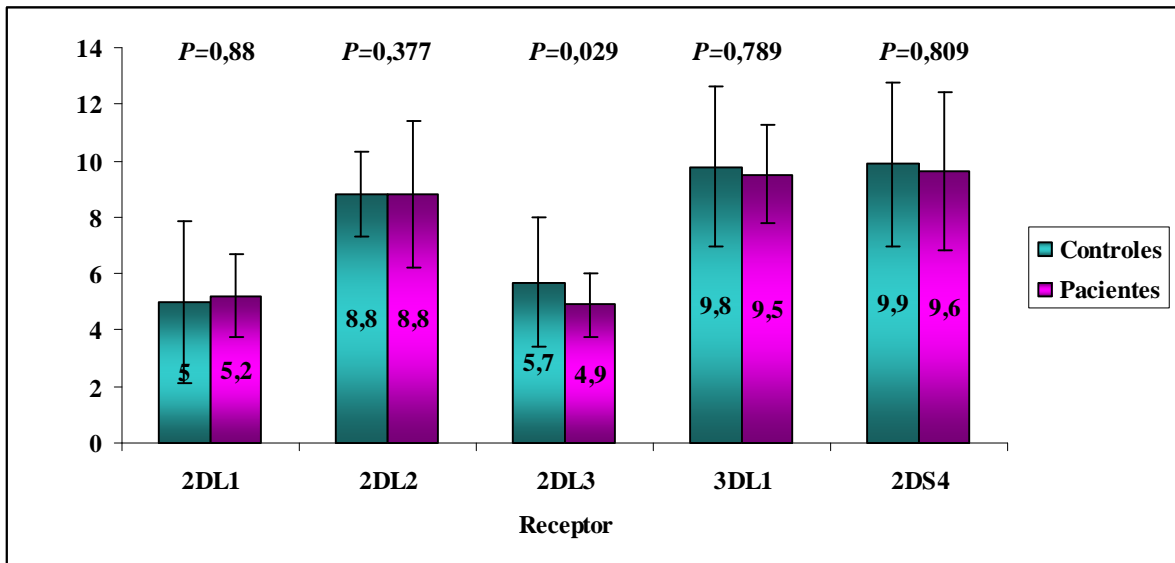


Figura 13.- Comparación de los valores promedios de la expresión a nivel de ARNm por PCR en tiempo real, de los receptores KIR en controles y pacientes. En el eje X se presentan los receptores KIR y en el eje Y los valores de dCt. Se presenta además la significancia entre las muestras para cada receptor.

4.- Relación de la expresión de KIR a nivel de ARNm y proteína.

En la tabla VII se presentan los resultados obtenidos mediante RT-PCR (antes presentados en la tabla IV) para 5 de los individuos controles, reportando la presencia (+) o ausencia (-) del gen y del amplificado, además los valores de expresión (dCt) obtenidos mediante PCR tiempo real y el porcentaje de expresión en superficie de los receptores evaluados. De acuerdo a estos resultados no se encontraron diferencias en cuanto a la expresión del ARNm mediante RT-PCR y PCR tiempo real. Los 5 individuos poseen los genes para los receptores KIR 2DL1, 2DL3, 3DL1 y 2DS4 (A) y lo expresan en ARNm según lo obtenido mediante RT-PCR y PCR en tiempo real, así mismo a nivel de superficie, según lo obtenido mediante citometría de flujo; en este particular se consideraron como positivas las muestras que presentan un porcentaje mayor al 3 %. En cuanto al receptor

KIR 2DL2 (B) 2 individuos poseen el gen y lo expresan en ARNm como se determinó mediante RT-PCR y tiempo real.

Tabla VII.- Comparación de la expresión de los receptores KIR determinada mediante RT-PCR, PCR tiempo real y citometría de flujo, de acuerdo al genotipaje de cada individuo.

A INDIVIDUOS	2DL1				3DL1			
	G	RT-PCR	dCt	%E	G	RT-PCR	dCt	%E
1	+	+	2,874	37,7	+	+	4,89	34,3
2	+	+	3,84	30	+	+	8,359	11,9
3	+	+	10,14	18,9	+	+	13,144	8,52
4	+	+	4,756	27	+	+	7,959	10,3
5	+	+	3,013	8,31	+	+	8,389	0,69

B INDIVIDUOS	2DL2				2DL3			
	G	RT-PCR	dCt	%E	G	RT-PCR	dCt	%E
1	+	+	8,463	ND	+	+	9,3	23,6
2	+	+	4,329	ND	+	+	5,146	15,3
3	-	-	14,342	ND	+	+	3,251	32,6
4	-	-	14,327	ND	+	+	5,768	13,1
5	-	-	13,589	ND	+	+	4,111	27

C INDIVIDUOS	2DS4			
	G	RT-PCR	dCt	%E
1	+	+	9,632	0,1
2	+	+	8,047	ND
3	+	+	15,215	0,84
4	+	+	9,551	16
5	+	+	7,61	0,26

G corresponde al gen evaluado.

+ Presencia de expresión.

- Ausencia de expresión.

dCT expresión del ARNm por PCR tiempo real.

% E porcentaje de expresión en superficie.

□ Estos valores son considerados negativos para la expresión del ARNm por PCR tiempo real

ND, no determinado.

Por otro lado, mediante citometría de flujo se determinó que todos los individuos del estudio expresaron el gen KIR 2DL1 en superficie; todos los controles y el 90 % de los pacientes expresaron el gen KIR 2DL3; 80 % de los controles y pacientes expresaron KIR 3DL1, mientras que 60 % de los controles y 30 % de los pacientes expresaron el receptor KIR 2DS4 en superficie; estos resultados se corresponden con los obtenidos en la expresión a nivel de ARNm, para los 5 individuos mediante RT-PCR, excepto para el receptor 2DS4, donde uno de los 5 individuos no expresa el gen en superficie.

Con estos datos, se realizó una comparación entre la expresión de los receptores KIR 2DL1, 2DL3, 3DL1 y 2DS4 a nivel de ARNm y la expresión a nivel de superficie, para conocer si existe alguna correlación entre ambos tipos de expresión. Para ello se usó la prueba estadística de correlación de Pearson. Se encontró para todos los receptores una correlación inversa muy baja ($-0,5 < 0 < 0,5$). En términos numéricos esto es lógico puesto que a menores valores de dCt, que se traducen en una mayor expresión a nivel de ARNm, mayor porcentaje de expresión en superficie. No se encontró asociación significativa para ningún receptor.

Tabla VIII.- Correlación entre el nivel de expresión de los receptores 2DL1, 2DL3, 3DL1 y 2DS4 a nivel de ARNm y su expresión en superficie y su nivel de significancia.

RECEPTOR	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (r)	P
2DL1	-0,411	0,078
2DL3	-0,3058	0,2029
3DL1	-0,1220	0,6409
2DS4	-0,2781	0,249

Con los datos obtenidos, se pudo determinar que de los 7 individuos que poseen los alelos *001 o *002 del receptor 2DS4 (tabla V), 4 (57,14 %) lo expresan sólo a nivel de ARNm; 2 individuos (28,57 %) lo expresa en ambos niveles (ARNm y superficie); 1 individuo (14,28 %) no expresa el receptor a nivel de ARNm ni superficie.

De las variantes alélicas restantes, de los 5 individuos que las presentan, 4 de ellos (80 %) lo expresan sólo a nivel de ARNm y el individuo restante (20 %) lo expresa en ambos niveles (ARNm y superficie).

DISCUSION

Los genes KIR son receptores exclusivos de las células NK y de una subpoblación de células T. La región de estos genes en el cromosoma 19q13.4 en humanos tiene aproximadamente 150 kb dentro del complejo receptor de leucocitos (LCR). Los haplotipos de KIR están organizados alrededor de 3 marcos de lectura de genes conservados, donde 3DL2 y 3DL3 se ubican en los extremos y 2DL4 en el medio, y presentan un espaciado regular de los genes KIR de 2,4 kb entre cada uno (Unhberg y col. 1997).

Entre estos genes se encuentran dos regiones, de contenido variable de genes, en donde la duplicación génica, las deleciones, mutaciones e hibridaciones por recombinación asimétrica están facilitadas por la proximidad de los genes y la similitud en las secuencias intergénicas (Shilling y col. 2002). En líneas generales, los genes KIR presentan entre sí un alto nivel de homología de secuencia (entre el 85 y 99 %) predisponiendo los genes a evolucionar por un mecanismo de recombinación homóloga no alélica; la propensión de los genes a experimentar este tipo de recombinación permite explicar la expansión y contracción del locus KIR y provee un análisis razonado para la naturaleza poligénica de los haplotipos de KIR (Khakoo y Carrington, 2006).

El análisis de la expresión a nivel de ARNm y de proteína demuestra que cada clon de célula NK presente en un individuo puede no expresar el conjunto completo de genes KIR que están codificados en su genoma, es decir que la posesión del gen no implica su expresión. En nuestro estudio, encontramos que todos los individuos presentaron y expresaron el receptor KIR 2DL1; 80 % expresó el receptor KIR 3DL1 y todos los

individuos presentaron alguna forma alélicas KIR 2DL2/2DL3, siendo el 2DL3 el más frecuente y expresado a nivel de ARNm.

En un estudio realizado por Leung y colaboradores en 2005, en donantes voluntarios, 7 % de 68 individuos presentaron el gen 2DL1 y 15 % de 67 el gen 3DL1 pero no los expresaron en superficie. Mientras que, al igual que en nuestro estudio, en todos los individuos evaluados encontraron una o ambas formas alélicas de 2DL2/2DL3, el receptor 2DL3 fue el más expresado en superficie, esto se encuentra en concordancia con lo reportado por Middleton y colaboradores (2002).

En esta investigación, de los 20 individuos estudiados el 95 % poseen el gen para el receptor 2DL3, mientras que sólo el 50 % de los individuos poseen el gen 2DL2, expresándolos todos a nivel de ARNm. Con relación a estos dos genes, el 45 % de los individuos de este estudio son heterócigos, puesto que poseen y expresan ambas formas alélicas, 50 % son homócigos para KIR 2DL3 y sólo el 5 % es homócigo para KIR 2DL2. Gracias a análisis de segregación de los genes KIR en el estudio de los diferentes haplotipos, se encontró que, contrario a lo que se pensaba de que los receptores KIR 2DL2 y 2DL3 estaban codificados por diferentes genes, estos son segregados por alelos de un mismo locus, y se sabe que la mayoría de los individuos poseen al menos alguna de las 2 formas alélicas (Bashirova y col. 2006), esto se debe a que si un individuo posee 2 copias de un gen o alelo KIR específico, tendrá mayor frecuencia de células NK que presenten y expresan ese gen, que un individuo que presente una sola copia (Khakoo y Carrington, 2006).

Células NK individuales expresan conjuntos específicos de receptores que pueden expresar funciones discretas, y estas funciones pueden ser dependientes de la expresión o pérdida de la expresión de ciertos genes KIR. La expresión de los genes KIR se ha

demostrado que puede ser altamente diversa e independiente en clones de células NK entre individuos (Maxwell y col. 2002). El ARNm de células NK en suspensión, representa un valor promedio de las células que expresan o no el gen, por lo tanto no se puede conocer la verdadera expresión del repertorio total de receptores en células NK de sangre periférica.

En este estudio se encontró que genotípicamente los receptores 2DL1 y 2DS4 están presentes en todos los individuos analizados y mediante RT-PCR se demostró una correspondencia entre la presencia del gen y su expresión a nivel de ARNm, evidenciando además la sensibilidad y eficiencia de la técnica. En un estudio realizado por Husain y col, en 2002, se determinó mediante la misma técnica, la expresión de 7 receptores KIR (2DL1, 2DL2, 2DL4, 3DL1, 2DS1, 2DS2 y 3DS1) en 38 clones de células NK, no estimuladas, de sangre periférica de 3 donantes voluntarios, donde se encontró que no hay un receptor universalmente expresado en cada clon de células NK analizado.

En nuestra investigación, adicionalmente se observó que la expresión de los receptores KIR 2DL1, 2DL2 y 2DL3 fue mayor a la del KIR activador 2DS4. En el estudio antes mencionado, se encontró también que en células no estimuladas (de controles) la frecuencia de los receptores inhibidores es mayor que las de los activadores. Sobre este particular, los autores reportan que las frecuencias de aparición y expresión de los receptores KIR 2DL1, 3DL1 y 2DL4 fueron mayores que la de KIR 2DL2. En nuestro estudio, si bien la frecuencia de aparición del receptor KIR 2DL2 fue menor que la de los receptores KIR 2DL1 y 3DL1, la expresión de KIR 2DL2 fue mayor que la de 3DL1.

Ahora bien, en un estudio realizado por Leung y colaboradores en 2005, donde se evaluó la expresión del ARNm mediante RT-PCR y PCR tiempo real y la expresión en superficie mediante citometría de flujo, de los receptores inhibidores KIR 2DL1, 2DL2, 2DL3 y 3DL1, obtuvieron al igual que en este trabajo, disparidad en cuanto a la frecuencia

de aparición y la expresión el gen en superficie, atribuyendo esta disparidad al polimorfismo alélico o a un silenciamiento epigenético. Encontraron que en superficie, el receptor más expresado fue el KIR 2DL3, mientras que por PCR tiempo real, el de mayor expresión fue KIR 3DL1, contrario a lo que se obtuvo en este estudio, donde el receptor más expresado en superficie fue KIR 2DL1 y en ARNm, en controles fue KIR 2DL1 y 2DL3, en pacientes.

En este estudio, la expresión del ARNm, de los receptores evaluados, mediante PCR tiempo real se determinó tomando en cuenta la ausencia de los genes para los receptores KIR y los valores de dCt arrojados para estos genes negativos y en algunos casos de positividad para el gen (como en KIR 3DL1 y 2DS4), se procedió como Cooley y colaboradores (2007) y se consideraron como positivos los valores de Ct menores a 38. En dicho estudio, Cooley y colaboradores, realizaron una investigación usando muestras de LSP y pudieron detectar mediante PCR tiempo real la expresión a nivel de ARNm de 12 de 14 genes KIR evaluados, de acuerdo a la presencia del gen para estos receptores. Además obtuvieron que para KIR 3DL1 y 2DS4 la correlación entre la presencia y expresión del gen fue menor, siendo para KIR 3DL1 indetectable la expresión en 80 % de los individuos que presentaron el gen; este porcentaje no se acerca al obtenido en este estudio, donde sólo 10,52 % corresponde a la población que presenta el gen y no lo expresa. Para KIR 2DS4 el porcentaje de individuos que no expresaron el gen fue de 74 % y en nuestro estudio fue de 20 %.

Los receptores KIR divergen en la frecuencia y en la intensidad con la cual se expresan entre la población de células NK de un individuo (Carrington y col. 2008). La expresión de KIR en células NK ocurre durante el desarrollo de las mismas, pero el mecanismo exacto de control de la diversificación de KIR sigue siendo un enigma. Los

patrones de expresión de KIR en células NK están determinados a nivel transcripcional con la contribución de elementos promotores reguladores unidos a diferentes factores de transcripción y diferentes grados de metilación del promotor (Xu y col. 2005).

A pesar de las similitudes en las secuencias entre los genes KIR, estos son regulados transcripcionalmente de forma independientemente, pero la diversidad de nucleótidos en las regiones de regulación afecta la capacidad transcripcional de algunos genes y sus alelos.

Con la excepción de algunos alelos de “no expresión” o alelos nulos, todos los genes KIR conocidos se expresan diferencialmente, incluso en diversos linajes de un solo individuo. Sin embargo esta expresión bien sea a nivel de ARNm o a nivel de superficie, está regulada por diversos mecanismos. Análisis de patrones de metilación del ADN, realizados en células NK, han demostrado que el extremo 5' del ADN y las pequeñas islas CpG que rodean el sitio de inicio de la transcripción de cada gen KIR están consistentemente hipometiladas en los genes KIR que se expresan y que la metilación de este extremo y de los dinucleótidos CpG está asociada con un silenciamiento en la transcripción y por lo tanto a los KIR no expresados. Los receptores KIR 2DL3, 3DL1 y 2DS4 no expresados, presentan patrones densos de metilación con sólo esporádicas ocurrencias de dinucleótidos CpG no metilados (Santourlidis y col. 2002; Chan y col. 2003). Este mecanismo de regulación debe ser el que ocasiona que algunos controles y pacientes no expresen el ARNm de los genes KIR 3DL1 aún cuando estos están presentes.

La inducción de la expresión de estos receptores, ha sido posible utilizando un inhibidor de metilación (como el inhibidor de metiltransferasa 5-aza-2'-deoxycytidine) durante varios días, obteniendo un aumento progresivo y cualitativo de la expresión del receptor, determinado por la intensidad de las bandas de los productos de RT-PCR (Leung

y col. 2005). Esto demostró que estos receptores pueden ser silenciados epigenéticamente por hipermetilación.

El conocimiento sobre el patrón de expresión de receptores en las células NK de sangre periférica es importante para entender como un número limitado de células NK controla las actividades anti virales y anti tumorales. La activación de la actividad citotóxica de las células NK está regulada por los receptores activadores presentes en las células efectoras, o a través de la interacción receptor-ligando que envíen señales de inhibición relativamente pobres. Un ejemplo de esto lo aporta el receptor KIR 2DL3 y su ligando HLA-C1C1, los cuales juegan un papel protector en la resolución de la infección por VHC. La afinidad de unión de KIR 2DL3 con su ligando es más baja que los receptores KIR 2DL1 y 2DL2 con sus respectivos ligandos, resultando en la transmisión de una señal inhibitoria débil para la célula efectora que se conjuga con la acción de alguno de los receptores activadores, como por ejemplo, KIR 3DS1, que se ha demostrado es beneficioso en la resolución de esta infección (Khakoo y col. 2004).

Los individuos homocigos para KIR 2DL3 tienen la probabilidad de presentar más células NK que están solamente bajo el control de este receptor inhibitor que la que tienen los individuos heterocigos KIR 2DL2/2DL3. De igual forma, los individuos que presentan el genotipo HLA-C1C1 y que por lo tanto ha perdido el ligando para KIR 2DL1, tienen más células NK bajo el control inhibitorio de KIR 2DL3 que aquellos que presentan el genotipo HLA-C1C2, donde la proporción de NK puede ser inhibida por KIR 2DL1 (Khakoo y col. 2004).

A pesar de que se han encontrado diferencias significativas en cuanto a la expresión en superficie de los receptores inhibidores, más específicamente de KIR 2DL3 y 3DL1, en controles y pacientes crónicamente infectados con VHC (Khakoo y col. 2004; Oliviero y

col. 2009), los resultados obtenidos en este estudio solo se corresponde a lo reportado para el receptor KIR 2DL3, si se extrapolan los resultados obtenidos mediante la prueba de correlación de Pearson de la expresión en superficie y la expresión del ARNm con los resultados obtenidos en la comparación de la expresión del ARNm en ambas poblaciones de estudio. Dicho de otra manera, no se encontró diferencia entre la expresión a nivel de superficie y ARNm ni tampoco entre la expresión del ARNm para el KIR 3DL1 en pacientes y controles.

El efecto protector de KIR 2DL3 en la infección por el VHC aparentemente sólo se observa en individuos que al momento de la infección recibieron bajas dosis del VHC, lo que sugiere que la diferencia en la habilidad de los distintos genotipos de KIR y HLA para regular la actividad de las células NK en el desarrollo de la infección por VHC, es bastante grande cuando se enfrenta a bajas dosis del inóculo del virus. El efecto beneficioso de los receptores inhibidores de baja afinidad con sus ligandos en la infección por VHC es consistente con otros modelos de enfermedades, en las cuales las interacciones activadoras pueden ser ventajosas o desventajosas. Sin embargo, el impacto real de esta expresión en las funciones de las células NK aún sigue sin elucidarse, debido a que estos cambios fenotípicos no necesariamente reflejan una alteración en las funciones citotóxicas de las células NK. A pesar de esto, el conocimiento de que la interacción de la proteína E2 del VHC con el receptor CD81 en las células NK inhibe la activación de las células y que las funciones de estas puede ser deficientes en individuos crónicamente infectados con VHC sugieren que el virus pueda contribuir a el deterioro de la respuesta celular (Oliviero y col. 2009).

En cuanto a la expresión de los receptores KIR en superficie, como se presentó en los resultados, el receptor KIR 2DS4 fue el menos expresado a pesar de que el gen y el

transcripto estuvieran presentes, esto se debe a que no todos los transcritos permiten la expresión en superficie de una proteína funcional, debido a codones de parada tempranos, que por lo general generan moléculas inestables en la superficie celular.

En ocasiones, el ADNc del receptor KIR 2DS4 se caracteriza por codificar potencialmente a proteínas que son secretadas, debido a un codón temprano de parada en el exón 5 (de la estructura básica del gen ancestral, conformada por 9 exones) que codifica al dominio de inmunoglobulina D2. Secuenciaciones de varios amplicones de ADN genómico han revelado la presencia de una variante de KIR 2DS4, caracterizada por una delección de 22 pb en el segundo dominio tipo Ig (D2) y que el marco de lectura que se genera debido a esta delección termina en el primer codón de parada (TGA) que se localiza “río abajo” (a 25 nucleótidos) del inicio del exón 7 que codifica a la región transmembrana. Aunque la secuencia nucleotídica remanente es idéntica a KIR 2DS4, la secuencia aminoacídica resultante de la delección abarca una longitud nueva de 88 aa, la pérdida del dominio D2 y la terminación con una longitud final de 196 aa, un aminoácido dentro del dominio transmembrana putativo sin dominio citoplasmático discernible (Hsu y col. 2002).

Sin embargo, la secreción de la proteína puede deberse también a la ausencia de los exones 7 y 9 que codifican a las regiones transmembranas y citoplasmáticas respectivamente. En el caso particular del gen del receptor activador KIR 2DS4, específicamente los alelos *003 y *007, codifican un receptor truncado que por lo general es secretado y por lo tanto no se encuentra expresión en superficie (Maxwell y col. 2002). El método de RT-PCR usado en esta investigación, ideado por Thompson y colaboradores en 2006, discrimina entre los alelos de KIR 2DS4 por el tamaño del producto de PCR, sin embargo el gel de agarosa donde se corrieron los productos de amplificación no permitieron discriminar entre ambos fragmentos.

Las bandas de aproximadamente 218 pb corresponden al alelo KIR 2DS4*001 mientras que las bandas de 196 pb corresponden a alelos que presentan la delección de 22 pb en el exón 5. Sin embargo, el estuche comercial usado en la determinación del genotipaje de los receptores KIR permite diferenciar entre la presencia de los alelos *001 y *002 o *003, *004 y *006 de KIR 2DS4. Entre los 16 individuos a los que se les pudo determinar las variantes alotípicas, el 43,75 % presentó alguna variante alélicas del *001 o *002; el 31,25 % las otras formas alélicas, *003, *004 o *006 y el 25 % poseen ambas. Entre los individuos que presentaron las formas alélicas *001 o *002, el 57,14 % lo expresó sólo a nivel de ARNm indicando que la proteína codificada por dicho gen, no es funcional. El 28,57 % expresó en ambos niveles (ARNm y superficie) lo que implica que no se generaron modificaciones en el ADN y por lo tanto la transcripción se llevó a cabo con normalidad y el 14,28 % no expresa el gen, lo que indica un codón de parada temprano que impide la transcripción y por tanto la formación de la proteína de membrana.

Con respecto a las otras variantes alélicas restantes, de los individuos que las presentaron, el 80 % lo expresó sólo a nivel de ARNm y ese el 20 % restante lo expresó en ambos niveles (ARNm y superficie), no encontrándose ausencia de expresión. Según lo dicho anteriormente, la variante alélica *003, considerada como el gen nulo, codifica a una proteína que es secretada, por lo tanto podría inferirse que entre el 80 % que expresa el gen a nivel de ARNm hubo individuos que presentan esta variante alélica.

Si una versión truncada de KIR 2DS4 (desprovista de dominios transmembrana y citoplasmáticos) se expresa, no sólo se alteraría la mayoría de la secuencia de la proteína del dominio D2 y de toda la secuencia de la proteína, sino que la proteína no se podría anclar durante la traducción y probablemente será secretada (KIR soluble). También se ha

determinado que la pérdida de un ligando para un KIR particular, produce que esa proteína KIR en caso de generarse no sea funcional (Khakoo y Carrington, 2006).

Las variaciones alotípicas de los genes KIR también alteran la capacidad funcional de las proteínas de membrana en las células efectoras. El receptor KIR 3DL1 tiene 23 alelos encontrados hasta la fecha, incluyendo a su contraparte activadora, el receptor 3DS1 cuya homología de secuencia es mayor al 95 %. En trabajos previos, fue posible medir para 8 de estos alelos, su nivel de expresión en superficie mediante análisis realizados por citometría de flujo. De estos, los alelos *001, *002, *003, *008, *015 y *020 presentan una alta expresión en superficie mientras que los alelos *005, *006 y *007 presentan baja expresión y la forma alélica *004 no se expresa en superficie. Esto se debe a 7 sustituciones aminoacídicas en el D0 y D1 del alelo *004 (Gardiner y col. 2001; Pando y col. 2003). También está reportado que este receptor puede estar inhibido a diferentes grados por el mismo alotipo del MHC clase I (Khakoo y Carrington, 2006). Estas variaciones en el receptor 3DL1 muestra una amplia especificidad puesto que las diferentes combinaciones aminoacídicas son capaces de prevenir el reconocimiento de KIR 3DL1 permitiendo a las células NK positivas para este gen, ser activadas facilitando así la posibilidad de la detección viral por parte de la célula NK como resultado de una perturbación en la señal inhibitoria con la presentación de péptidos virales (O'Connor y col. 2005). También se conoce, como se menciono anteriormente, que el receptor 3DS1 que se asemeja a KIR 3DL1 en su dominio extracelular, genéticamente es segregado como un alelo de este, sin embargo puesto que en esta investigación no se incluye el receptor activador KIR 3DS1 no se puede deducir si los individuos que presentan el gen KIR 3DL1 son homocigos o heterocigos para este receptor.

En cuanto a los receptores KIR 2DL1 y 2DL2 no se ha reportado polimorfismo alélico ni polimorfismo fenotípico que influya en la ausencia de expresión, por tanto la mutilación sigue siendo la explicación dada para este hecho.

CONCLUSIONES

- 1.- Se logró obtener suspensiones celulares altamente enriquecidas de células NK mediante la técnica RosseteSep[®], con las cuales se pudo evaluar la expresión de los receptores KIR a nivel de ARNm.
- 2.- Mediante la técnica de RT-PCR se encontró una correspondencia entre la presencia o ausencia de los genes para los receptores KIR 2DL1, 2DL2, 2DL3, 3DL1 y 2DS4 evidenciándose además la eficiencia de la técnica.
- 3.- Se logró estandarizar las condiciones adecuadas de tipo de muestra, cantidad de ADNc, concentración de iniciadores y condiciones de amplificación para los receptores KIR inhibidores 2DL1, 2DL2, 2DL3, 3DL1 y el KIR activador 2DS4 por PCR en tiempo real.
- 4.- En el grupo control, se encontraron diferencias significativas entre la expresión del receptor inhibitor KIR 2DL1 y los receptores KIR 3DL1 y 2DS4.
- 5.- Para el grupo de pacientes, el receptor más expresado fue KIR 2DL3, encontrándose un aumento significativo de la expresión con respecto a los otros receptores. Se encontró diferencia significativa entre los niveles de expresión de este receptor y los receptores KIR 2DL1, 3DL1 y 2DS4
- 6.- En base a lo obtenido, se evidenció que funcionalmente los pacientes infectados con el VHC, muestran una mayor expresión de KIR que favorece señales débiles de inhibición de las células NK que pudiesen estar asociadas al control de la infección viral, sin embargo falta determinar los otros factores (como el genotipo de los ligando específicos, HLA-C o dosis del inóculo del VHC) que puedan estar asociados en la cronicidad de la enfermedad en estos pacientes.

7.- A pesar de obtener una correlación cualitativa, en la mayoría de los casos, la correlación cuantitativa entre el nivel de expresión en ARNm y superficie es inversa y muy baja y no existe diferencia significativa en ninguno de los receptores.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA

- Abbas, A., Lichtman, A. 2004. Basic Immunology: Functions and disorders of the immune system. Saunders. Segunda Edición, Philadelphia, E.U.A.
- Ahmad, A., Alvarez, F. 2004. Role of NKT cells in the immunopathogenesis of HCV-induced hepatitis. *J. Leukoc. Biol.* **76**: 743-759.
- Bashirova, A., Martin, M., McVicar, D., Carrington, M. 2006. The Killer Immunoglobulin-Like Receptor gene cluster: Turning the genome for defense. *Annu. Rev. Genom. Hum. G.* **7**: 277-300.
- Boyton, R. J., Altmann, D. M. 2008. Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leukocyte antigen class I in disease. *Clin. Exp. Immunol.* **149**: 1-8.
- Boyum, A. 1968. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invt.* **21**: 77-89.
- Carrington, M., Martin, M., van Bergen, J. 2008. KIR-HLA intercourse in HIV disease. *Trends Microbiol.* **12**: 620-627.
- Cassinotti, A., Birindelli, S., Clerici, M., Trabattoni, D., Lazzaroni, M., Ardizzone, S., Colombo, R. y colaboradores. 2009. HLA and autoimmune digestive disease: A Clinically Oriented Review for Gastroenterologists. *Am J Gastroenterol.* **104**: 195-217.
- Chan, H., Kurago, Z., Stewart, A., Wilson, M., Martin, M., Mace, B., Carrington, M. y colaboradores. 2003. DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells. *J. Exp. Med.* **2**: 245-255.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.

- Cooley, S., Xiao, F., Pitt, M., Gleason, M., McCullar, V., Bergemann, T., McQueen, K., y colaboradores. 2007. A subpopulation of human Peripheral blood NK cells that lacks inhibitory receptors for self-MHC is developmentally immature. *Blood*. **110**: 578-586.
- Cooper, M., Fehniger, T., Caligiuri, M. 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *T. Immunol.* **11**: 633-640.
- Corado, J., Mora de Orta, S. 2003. Inmunología actual. Alfa Impresores. Primera edición. Carabobo, Venezuela.
- Cosman, D., Müllberg, J., Sutherland, C., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., Chalupny. 2001. ULPBs, novel MHC class I-Related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*. **14**: 123-133.
- Farag, S., Caligiuri, M. 2007. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev.* **20**: 123-137.
- Gardiner, C., Guethlein, L., Shilling, H., Pando, M., Carr, W., Rajalingam, R., Vilches, C., Parham, P. 2001. Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism. *J. Immunol.* **166**: 2992-3001.
- Gómez, N., Vilches, C. 2002. Genotyping of human killer-cell immunoglobulin-like receptor genes by polymerase chain reaction with sequence-specific primers: An update. *Tissue Antigens*. **59**: 184-193.
- Gosselin, P., Mason, L., Willette, J., Ortaldo, J., McVicar, D., Anderson, S. 1999. Induction of DAP12 phosphorylation, calcium mobilization, and cytokine secretion by Ly49H. *J. Leukoc. Biol.* **66**: 165-171.

- Guidotti, L., Chisari, V. 2006. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **1**: 23-61.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, S., Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology.* **10**: 413-417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology.* **11**: 1026-1030.
- Hsu, K., Liu, X., Selvakumar, A., Mickelson, E., O'Reilly, R., DuPont, B. 2002. Killer Ig-Like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *J. Immunol.* **169**: 5118-5129.
- Husain, Z., Alper, C., Yunis, E. 2002. Complex expression of natural killer receptor gene in single nature killer cells. *Immunology.* **106**: 373-380.
- Khakoo, S., Carrington, M. 2006. KIR and disease: a model system or system of models? *Immunol. Rev.* **214**: 186-201.
- Khakoo, S., Thio, C., Martin, M., Brooks, C., Gao, X., Astemborski, J., Cheng, J. y colaboradores. 2004. HLA and NK cell inhibitory receptors genes in resolving Hepatitis C Virus infection. *Science.* **305**: 872-874.
- Kulkarni, S., Martin, M., Carrington, M. 2008. The yin and yang of HLA and KIR in human disease. *Semin. Immunol.* **20**: 343-352.
- Leung, W., Iyengar, R., Triplett, B., Turner, V., Behm, F., Holladay, M., Houston, J., y colaboradores. 2005. Comparison of Ig-like receptor genotyping and phenotyping for selection of allelic blood stem cell donors. *J. Immunol.* **174**: 6540-6545.

- Luque, J., Herráez, A. 2002. *Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Elsevier Science. Madrid, España.
- Margin, R. 1996. *Fundamentos de Inmunología e Inmunoquímica*. Medica Panamericana. Quinta edición. Buenos Aires, Argentina.
- Maxwell, L., Wallace, A., Middleton, D., Curran, M. 2002. A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey. *Tissue Antigens*. **60**: 254-258.
- Meier, U., Owen, R., Taylor, E., Worth, A., Naoumov, N., Willberg, C., Tang, K. y colaboradores. 2005. Shared alterations in NK cell frequency, phenotype and function in chronic human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections. *J. Virol.* **19**: 12365-12374.
- Middleton, D., Curran, M., Maxwell, L. 2002. Natural killer cells and their receptors. *Transpl. Immunol.* **10**:147-164.
- Montes, M., Cano, J., Romero, M., Diago, M., Andrade, R., Carmona, I., Aguilar, J. y colaboradores. 2005. HLA-C and KIR genes in Hepatitis C virus infection. *Hum. Immunol.* **66**: 1106-1109.
- Mullis, K., Ferré, F., Gibbs, R. 1994. *The polymerase chain reaction*. Birkhäuser, Boston.
- Nijhout, F. 2004. Stochastic Gene Expression: Dominance, Thresholds and Boundaries. *The Biology of Genetic Dominance*. Págs. 81–95 en R., Veitia (ed). *The biology of genetic dominance*. Landes Bioscience. Texas, E.U.A.
- O'Connor, G., Hart, O., Gradiner, C. 2005. Putting the natural killer cell in its place. *Immunology*. **117**: 1-10.

- Oliviero, B., Varchetta, S., Paudice, E., Michelone, G., Zaramella, M., Mavilio, D., De Filippi, F. y colaboradores. 2009. Natural killer cell functional dichotomy in chronic hepatitis B y chronic hepatitis C virus infections. *Gastroenterology*. **137**: 1151-1160.
- Pando, M., Gardiner, C., Gleimer, M., McQueen, K., Parham, P. 2003. The protein made from a common allele of KIR3DL1 (3DL1*004) is poorly expressed at cell surfaces due to substitution al position 86 in Ig domain 0 and 182 in Ig domain 1. *J. Immunol*. **171**: 6640-6649.
- Poli, A., Michel, T., Thérésine, M., Andrés, E., Hentges, F., Zimmer, J. 2008. CD56^{bright} natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology*. **126**: 458-465.
- Presnell, S., Lei, Z., Ramilo, C., Chan, H., Lutz, C. 2006. Functional redundancy of transcription factor-binding sites in the killer cell Ig-like receptor (KIR) gene promoter. *Int. Immunol*. **8**: 1221-1232.
- Pujol, F., Loureiro, C. 2007. Replacement of Hepatitis C virus genotype 1b by genotype 2 over a 10-year period in Venezuela. *J. Clin. Gastroenterol*. **41**: 518-520.
- Rajagopalan, S., Long, E. 2005. Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease. *J. Exp. Med*. **7**: 1025-1029.
- Rauch, A., Laird, R., McKinnon, E., Telenti, A., Furrer, H., Weber, R., Smillie, D. y colaboradores. 2007. Influence of inhibitory killer immunoglobulin-like receptors and their HLA-C ligands on resolving hepatitis C virus infection. *Tissue Antigens*. **69**: 237-240.
- Sambrook, J. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor. Segunda edición. New York, E.U.A.

- Santourlidis, S., Trompeter, H., Weinhold, S., Eisermann, B., Meyer, K., Wernet, P., Uhrberg, M. 2002. Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. *J. Immunol.* **169**: 4253-4261.
- Shilling, H., Guethelein, L., Cheng, N., Gardiner, C., Rodríguez, R., Tyan, D., Parham, P. 2002. Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human genotype. *J. Immunol.* **168**: 2307-2315
- Thompson, A., van der Silk, A., Koning, F., van Bergen, J. 2006. An improved RT-PCR method for the detection of killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) transcripts. *Immunogenetics.* **58**: 865-872.
- Toro, F., Conesa, A., García, A., Bianco, N., De Sanctis, J. 1998. Increased peroxide production by polymorphonuclear cells of chronic hepatitis C virus-infected patients. *Clin. Immunol. Immunop.* **2**: 169-175.
- Toro, F., Conesa, A., García, A., Deibis, L., Bianco, N., De Sanctis, J. 1999. HCV RNA sequences in eosinophils of chronic HCV-infected patients. *J. Med.* **30**: 279-288.
- Trincheri, G. 1992. Natural Killer cells. Págs. 1136-1139 en I. Roitt, P. Delves (eds). *Encyclopedia of immunology*. Academic Press. Londres, Inglaterra.
- Uhrberg, M., Valiante, N., Shum, B., Shilling, G., Lienert-Weidenbach, K., Corliss, B., Tyan, D. y colaboradores. 1997. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity.* **7**: 753-763.
- Wong, T., Lee, S. 2006. Hepatitis C: a review for primary care physicians. *Can. Med. Assoc. J.* **174**: 649-659.

- Weighardt, F. 2007. GMO quantification in processed food and feed. *Nat. Biotechnol.* **11**: 1213-1214.
- Xu, J., Vallejos, A., Jiang, Y., Weyand, C., Goronzy, J. 2005. Distinct transcriptional control mechanism of Killer Immunoglobulin-like Receptors in Natural Killer (NK) and in T cells. *J. Biol. Chem.* **280**: 24277-24285.
- Zhi-ming, L., Yu-lian, J., Zhao-lei, L., Chun-xiao, W., Zhen-fang, D., Bing-Chang, Z., Yue-ran, Z. 2007. Polymorphisms of Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor Gene: Possible association with susceptibility to or clearance of hepatitis B virus infection in Chinese Han Population. *Croat. Med. J.* **6**: 800-806.

ANEXOS

CONSENTIMIENTO DEL SUJETO PARA PARTICIPAR EN UN PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

Número de Protocolo:

Nombre del Participante:

Historia Clínica N°: ____

TÍTULO DEL ESTUDIO:

Papel de la Respuesta Inmune Innata en el Control de la Infección por el Virus de Hepatitis C. Factores víricos y del hospedero que regulan dicha respuesta.

Investigador responsable: Dr. Félix Toro

Lugar de trabajo: Instituto de Inmunología, Facultad de Medicina, UCV

Teléfono: 693-4086, 605-3429

Médicos que dirigen la investigación:

Dra. Irma Machado: Instituto de Inmunología, Facultad de Medicina, UCV Teléfono: 693-4086, 605-3429

Dr.

INTRODUCCIÓN

Se le ha propuesto participar en un estudio de investigación. Uno de los miembros del equipo de investigación le explicará qué implica el estudio y cómo puede afectarlo. Este formulario de consentimiento describe el procedimiento del estudio, los riesgos y beneficios de participar en él, y la forma en que se preservará la confidencialidad. Por favor, tómese el tiempo que necesite para hacer las preguntas y para decidir con

Comodidad si desea participar o no. Este proceso se denomina consentimiento informado. Si usted decide participar en el estudio, se le solicitará que firme este formulario como constancia de su decisión.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

El objetivo de este estudio es determinar los factores que determinan que la infección con el virus de la Hepatitis C evolucione a una enfermedad crónica en un alto porcentaje de la población infectada.

En la actualidad no se ha podido desarrollar una vacuna contra la hepatitis C y el tratamiento antiviral actualmente en uso solo resulta efectivo en un porcentaje variable de la población infectada. De allí la importancia de realizar este estudio en población Venezolana infectada con el virus de la Hepatitis C para identificar los posibles factores que afectan la respuesta inmune del paciente limitando el control de la infección viral.

DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

En el presente estudio participarán 130 pacientes con infección comprobada por VHC provenientes de la consulta externa del Instituto de Inmunología (IDI), de la Unidad de Hígado, Sección de Gastroenterología del Hospital Domingo Luciani del Instituto Venezolano de los Seguros Sociales (IVSS) y del Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario de Caracas (HUC), 130 sujetos sanos, donantes voluntarios del Banco de Sangre del HUC y del IDI. Los pacientes serán atendidos por su médico tratante, el cual los evaluará y les explicará el estudio. Una vez obtenido su consentimiento informado para participar en el estudio, se procederá a la toma de muestra de sangre para la evaluación de la respuesta inmune celular responsable del rechazo de infecciones virales, representada por un tipo especial de células conocidas como células citotóxicas naturales. Esta actividad deberá realizarse en cada paciente, antes y después de finalizado el tratamiento anti-viral indicado por su médico tratante así como en los sujetos sanos.

Los médicos participantes en la investigación obtendrán información acerca de su persona a los fines de esta investigación.

TIEMPO DEL ESTUDIO

Se plantea que usted forme parte del estudio de acuerdo al siguiente esquema de trabajo:

1. Si decide participar, se le tomará una muestra de sangre de aproximadamente 50 ml. Esta muestra será procesada para realizar los exámenes de:

Genotipificación y expresión de los genes KIR y del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I

El equipo medico participante en esta investigación podría decidir excluirlo del estudio sin su consentimiento, Si:

- Usted no puede cumplir los requisitos del estudio;
- Su condición médica varía;
- Surge nueva información que indica que la participación en este estudio no lo beneficia.

- El estudio se interrumpe.

RIESGOS ASOCIADOS AL ESTUDIO

Los posibles riesgos en el estudio están asociados solo a la toma de la muestra de sangre e incluyen: posible malestar y dolor, moretones leves e hinchazón en el sitio del pinchazo de la aguja.

BENEFICIO DE PARTICIPAR EN EL ESTUDIO

Si usted acepta participar en el estudio, se le suministrará información pertinente a la tipificación de genes MHC clase I. Ningún otro beneficio directo será obtenido. Por otra parte, el conocimiento generado en esta investigación podría beneficiar a otras personas en el futuro.

¿CUÁL ES EL COSTO?

Ninguno. Todos los análisis que se realizarán a las muestra de sangre que usted done para el estudio serán cubiertos por el proyecto.

¿SE ME PAGARÁ POR PARTICIPAR?

La participación voluntaria en este proyecto no contempla ningún pago al paciente.

CONFIDENCIALIDAD

Los registros del estudio que lo identifican serán mantenidos bajo estricta confidencialidad. Los datos recogidos durante el estudio serán utilizados con los fines descritos en la planilla de consentimiento informado. Mediante la firma de este consentimiento, usted autoriza al equipo de investigadores para que accedan a sus registros médicos, entre los que se incluye su Información Médica Protegida. La Información Médica Protegida consiste en todo tipo de información médica personal, entre la que se incluyen sus antecedentes médicos, y la información nueva que se genere durante el estudio. El equipo de investigadores está formado por las personas que se enumeran en este formulario de consentimiento y el resto del personal que participa en el proyecto de investigación.

Los datos obtenidos como parte de este estudio podrían ser utilizados en publicaciones o presentaciones médicas. Para los efectos de la divulgación de los resultados de este estudio, en cualquiera de sus formas (publicaciones, presentaciones en congresos científicos, etc.) su identidad no será revelada. Si en algún momento quisiéramos consignar su información personal en las publicaciones le pediremos su autorización oportunamente.

¿Mis Muestras de sangre serán utilizadas en otros proyectos de investigación?

No, las muestras de sangre obtenidas para este estudio no serán utilizadas en otros proyectos de investigación. Las mismas estarán bajo la custodia del investigador responsable del proyecto durante el tiempo que dure el estudio.

¿CUÁLES SON MIS DERECHOS COMO PARTICIPANTE?

La participación en el estudio es voluntaria. Si usted decide no participar, su atención médica por parte del Instituto de Inmunología, no se verá afectada.

¿A QUIÉN DEBO LLAMAR SI TENGO ALGUNA DUDA O PROBLEMA?

Usted ha conversado con _____ acerca de este estudio y se le ha dado la oportunidad de hacer preguntas relacionadas con cualquier y todos los aspectos de la investigación. Si tiene mas preguntas sobre el estudio, usted puede comunicarse con la Dra. Irma Machado, Instituto de Inmunología al 605-3429/693-4086/6º5-3508

CONSENTIMIENTO

PARTICIPANTE

Se me han explicado el proyecto de investigación y los procedimientos asociados con él. Se han identificado los procedimientos experimentales y no se me ha ofrecido ninguna garantía acerca de los posibles resultados. He recibido una copia firmada de este consentimiento para mi archivo.

Acepto formar parte del estudio. Estoy consciente de que mi participación es voluntaria y que no debo firmar este formulario si no deseo formar parte del estudio de investigación.

Firma del participante:

Fecha: _____ Hora: _____ AM/PM (Indicar con un círculo)

PERSONA QUE OBTIENE EL CONSENTIMIENTO

Le he explicado a _____ la naturaleza y objetivo del estudio y los riesgos asociados con él. He contestado y contestaré todas las preguntas a mi mejor entender. Le he entregado una copia firmada del formulario de consentimiento al participante y su familia.

Firma de la Persona que Obtiene el Consentimiento:

Fecha: _____ Hora: _____ AM/PM (Indicar con un círculo)

INVESTIGADOR/ MÉDICO:

Firma del Investigador/ Médico

Fecha: Hora: AM/PM (Indicar con un círculo)

PADRE/ TUTOR/ O REPRESENTANTE AUTORIZADO LEGALMENTE:

Doy mi autorización para que mi hijo/ familiar participe en el proyecto de investigación descrito anteriormente.

Firma del Padre/ Tutor/ o Representante Autorizado Legalmente:

Fecha: Hora: AM/PM (Indicar con un círculo)

TESTIGO:

Doy fe de la información que se le ha suministrado a para su participación en el proyecto de investigación planteado.

Firma del Testigo:

Fecha: Hora: AM/PM (Indicar con un círculo)

CONSENTIMIENTO POR APODERADO/ SUBROGADO:

La persona en nombre de la cual presto consentimiento no tiene un representante legal o ese representante no se encuentra disponible a pesar de los esfuerzos por comunicarse con él/ ella. Creo que mi decisión como apoderado se conduce en la mayor medida de lo posible con lo que la persona hubiera decidido o hecho en estas circunstancias. Esta decisión se basa en lo que yo entiendo son las creencias personales, filosóficas, religiosas y /o morales de dicha persona y sus valores éticos respecto de la finalidad de la vida, la enfermedad, los procedimientos médicos, el sufrimiento y la muerte. Tan pronto como sea posible, se le informará a la persona acerca de su participación en este protocolo de investigación. Estos temas han sido considerados por los médicos que conducen la investigación y personalmente por mí.

Firma de la Persona que Presta el Consentimiento Subrogado:

Relación con el Participante:

Fecha: Hora: AM / PM (Indicar con un círculo)