



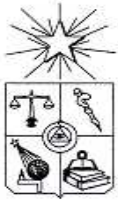
**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**EXPRESIÓN DEL ANTÍGENO MENOR DE
HISTOCOMPATIBILIDAD HA-1 EN PACIENTES
HEMATO-ONCOLÓGICOS Y DONANTES DE BANCO
DE SANGRE**

**TESIS PROFESIONAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE TECNÓLOGO MÉDICO
CON MENCIÓN EN BIOANÁLISIS CLÍNICO, HEMATOLOGÍA Y BANCO DE
SANGRE**

**AUTOR: Haydeé Gallardo Aguilera
TUTOR: Claudio Pérez Núñez
Jorge Alfaro Lucero**

2009



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGIA MEDICA

EVALUACION FINAL

La Tesis Profesional para obtener el Título Profesional de Tecnólogo Médico en la Mención Bioanálisis Clínico, Hematología y Banco de Sangre, titulada: “EXPRESIÓN DEL ANTÍGENO MENOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD HA-1 EN PACIENTES HEMTO-ONCOLÓGICOS Y DONANTES DE BANCO DE SANGRE”, así como el desempeño de la alumna que la realizó Srta. **Haydee Gallardo Aguilera**, ha sido calificado con nota final 7.0 (siete punto cero).



Leonor Armanet B.
Prof. T.M. Leonor Armanet B.
Directora
Escuela de Tecnología Médica

Santiago, Enero 11 de 2010.



Santiago, Diciembre 10 de 2009

Señora
Prof. Leonor Armanet B.
Directora
Escuela de Tecnología Médica
PRESENTE


Estimada Prof. Armanet:

Con mucho agrado he revisado la Tesis Profesional de la alumna Haydeé Gallardo A., de la Mención Bioanálisis Clínico, Hematología y Banco de Sangre de la Carrera de Tecnología Médica, Titulada "**Expresión del Antígeno Menor de Histocompatibilidad HA-1 en Pacientes Hemato-Oncológicos y Donantes de Banco de Sangre**"

Estimo que la realización de esta tesis, contribuye a generar conocimientos valiosos, que ayudan a comprender mejor los aspectos genéticos e inmunológicos relacionados con los trasplantes alogénicos.

Cabe destacar, que esta tesis está muy bien escrita y muy bien presentada. Cumple con los objetivos propuestos y discute los resultados con mucha claridad. Califico esta tesis con nota 7,0 (siete).

Saluda atentamente a usted.


Prof. Elena Llop R



Universidad de Chile
Facultad de Medicina

Santiago 29 de Diciembre de 2009

Estimada Sra. T.M. Leonor Armanet
Directora Escuela de Tecnología Médica
Universidad de Chile

El trabajo titulado "EXPRESIÓN DEL ANTIGENO MENOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD HA-1 EN PACIENTES HEMATO-ONCOLÓGICOS Y DONANTES DE BANCO DE SANGRE" presenta datos relevantes sobre los niveles de transcrito para HA-1 tanto en sujetos controles, donde no se aprecian diferencias significativas en cuanto a edad ni sexo, como en pacientes que padecen diferentes enfermedades hemato-oncológicas, en este último grupo el dato mas relevante es el hallazgo de una disminución en la expresión de HA-1 en pacientes que sufren leucemia mieloide crónica en remisión, lo que deja una serie de interrogantes sobre la capacidad de HA-1 como agente inmunoterapéutico.

La estructura de la tesis en general se basó en el método científico presentando una introducción sólida, objetivos claros y una hipótesis sustentada en la problemática y los antecedentes presentados. Con respecto a la metodología, la alumna utilizó PCR cuantitativo para estudiar las copias del transcrito, esto le aporta un peso extra en calidad a este trabajo y potencia sus opciones de publicación, sin dejar de destacar el arduo trabajo que debió realizar la alumna en la estandarización de la técnica.

La Srta. Gallardo presentó los datos de manera impecable y utilizó herramientas estadísticas adecuadas para informar sobre la significancia de sus hallazgos. También eligió los gráficos adecuados para entregar la información de manera clara. Los datos mostrados en esta tesis son inéditos y de calidad indiscutible.

Luego de revisar y corregir el manuscrito de esta tesis puedo informar que la alumna Haydeé Gallardo desarrolló la tesis de manera óptima, mi nota es un (7,0) siete coma cero.

Saludos cordiales.

T.M. Alejandra Espinosa (PhD)
Escuela de Tecnología Médica
Universidad de Chile



Santiago, 03 de septiembre de 2009

Sra. Prof. T.M
Leonor Armanet Bernales
Directora
Escuela de Tecnología Médica
Facultad de Medicina
Universidad de Chile
PRESENTE

Estimada Prof. Armanet:

Envío a Ud. la evaluación de Tesis Profesional *“Expresión del Antígeno Menor de Histocompatibilidad HA-1 en pacientes hematológicos y donantes de Banco de Sangre”* de la Alumna Srta. Haydeé Gallardo Aguilera.

Debido al interés constante de la alumna, su responsabilidad, iniciativa, el manejo de técnicas y la discusión crítica de los resultados, el trabajo de Tesis desarrollado por la Srta. Gallardo en el laboratorio de Terapia Celular ha sido calificado con nota 7,0 (siete).

Saluda Cordialmente,



BQ. Claudio Pérez Núñez

Tutor

LABORATORIO DE TERAPIA CELULAR- BANCO DE SANGRE
Santos Dumont 999 Independencia Santiago
Fono 978 8067

Agradecimientos

Finalizar esta tesis significó más que una simple nota en mi carrera, significó conocer a personas muy valiosas tanto en lo personal como en lo profesional. Agradezco a mi tutor Claudio Pérez del laboratorio de Terapia Celular quien confió en mí y a la vez me brindó su apoyo constante, al Dr. Jorge Alfaro quien con su ayuda y consejos en el completo desarrollo de mi tesis me motivó a seguir en el área de la investigación, a Ramón Rabanales quien hizo mi estadía en el laboratorio muy grata.

Una mención especial merece el laboratorio de inmunología de la Universidad de Chile, quienes cooperaron en gran parte en la realización de este trabajo, al Dr. Milton Larrondo quien en la jefatura del Banco de Sangre del Hospital Clínico de la Universidad de Chile aceptó que obtuviera las muestras desde el Banco de sangre y a los pacientes quienes participaron gustosamente del estudio.

Agradezco, también a mi familia, por darme la oportunidad y el apoyo de finalizar ésta ardua tarea desde los comienzos.

A mi padre quien siempre se interesó en mis avances

A mi madre por su cariño

I. Índice

I. Índice	8
II. Resumen	9
III. Introducción	10
IV. Marco teórico	11
V. Materiales y Método	18
VI. Resultados	24
VII. Discusión	29
VIII. Conclusión	32
IX. Bibliografía	33
X. Anexo	
i. Consentimiento Informado	37
ii. Entrevista y consentimiento informado	38
iii. Tamaño Muestral	40
iv. Separación de células mononucleares de concentrados leucocitarios mediante inmunobeads	42
v. Citometría de Flujo	44
vi. Extracción de RNA y síntesis de cDNA	45
vii. PCR convencional	47
viii. Extracción en gel de agarosa	48
ix. Estandarización de MgCl²	49
x. Clonamiento	50
xi. Resultados de Clonamiento	57
xii. PCR cuantitativo (Q-PCR)	61
xiii. Tabulación de datos	65

II. Resumen

La compatibilidad del sistema HLA entre donante y receptor es esencial en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Sin embargo, no es suficiente e incluso con una compatibilidad HLA completa, se genera en el receptor importantes respuestas inmunológicas tales como la actividad de injerto contra tumor (ICT) y la enfermedad injerto contra huésped (EICH). Estas alorespuestas serían originadas por diferencias polimórficas no HLA entre donante y receptor que involucran a péptidos inmunogénicos, denominados antígenos menores de histocompatibilidad (mHAg). Un gen reconocido como mHAg es HA-1, cuya expresión se restringe a células hematológicas tanto benignas y malignas, por lo cual, la respuesta inmune contra HA-1 está circunscrita a estas poblaciones celulares.

Existe poca información respecto a los niveles de expresión de HA-1 y de cómo podría esto variar con el tratamiento recibido por el paciente, la edad (en individuos sin enfermedad hematooncológica) o el origen tumoral de la subpoblación estudiada, afectando la respuesta inmune.

El objetivo de esta investigación fue estudiar la expresión del mRNA de HA-1 en subpoblaciones celulares hematológicas normales, en donantes de sangre y en pacientes hemato-oncológicos mediante PCR cuantitativo (Q-PCR), con un n=50 en donantes y n=48 en los pacientes. Nuestros resultados indican que el mRNA de HA-1 se expresa en todas las subpoblaciones hematológicas estudiadas. Los niveles de expresión no variaron según edad o género de los donantes de sangre. En pacientes con Leucemia Mieloide Crónica, la expresión del antígeno HA-1 fue mayor en los blastos leucémicos (Phi+) que en células de los mismos pacientes en remisión (Phi -), este hallazgo podría estar relacionado con la respuesta de los pacientes con LMC a la infusión de linfocitos del donante, que logra que los pacientes en recaída post alotransplante entren en remisión.

III. Introducción

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TAPH), también denominado trasplante de médula ósea, es un tratamiento efectivo contra enfermedades hematológicas malignas, donde los pacientes trasplantados desarrollan respuestas inmunológicas gatilladas por el sistema inmune del donante (Nelson J. Chao y col., 2004). Por otro lado, se estima que el 99,9 % del genoma humano es idéntico entre 2 individuos, la diferencia de 0,1% es atribuida a polimorfismos genéticos (Ann Mullally y col.,2007). Esta discrepancia podría explicar las respuestas inmunológicas observadas en los pacientes sometidos a trasplante alogénico.

Los antígenos menores de histocompatibilidad (mHAGs), pertenecen a este 0,1% y, derivan de genes polimórficos. Al existir al menos un alelo inmunogénico, presentado en un contexto de histocompatibilidad adecuado, se desencadenará la respuesta inmunológica. El número de mHAGs identificados en pacientes trasplantados ha aumentado considerablemente, siendo el antígeno HA-1 uno de los más estudiados e importantes (E.Simpson y col., 2002).

La actual investigación evaluó el nivel de expresión del mRNA del antígeno HA-1 en subpoblaciones de células hematológicas, en pacientes con enfermedades hemato-oncológicas y en donantes del Banco de Sangre. La presencia del antígeno en las células (medición cualitativa) y su nivel de expresión (medición cuantitativa) son importantes en la génesis de la respuesta inmune, por lo que, el presente estudio será una contribución a:

- i. Descripción del antígeno HA-1 y evaluación de su expresión en membrana.
- ii. Estimación del potencial de la utilización de HA-1 como blanco en terapias inmunológicas.
- iii. Aportar información para el conocimiento de la enfermedad injerto contra tumor.

El trabajo contó con la autorización del Comité de Ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y los recursos necesarios para su desarrollo.

IV. Marco Teórico

Transplante Alogénico de Progenitores Hematopoyéticos (TAPH)

Un donante apropiado para un TAPH, requiere de la compatibilidad en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad HLA con el receptor. Existe un 25% de probabilidades de encontrar dos hermanos HLA idénticos (N. Chao y col., 1989). Sin embargo, esto es un requerimiento inicial, ya que existen diferencias genómicas no HLA que influyen en el desarrollo y éxito del trasplante.

Una vez seleccionado el donante, se obtienen los precursores hematopoyéticos, que a diferencia de un transplante autogénico, carece de células malignas y es rico en linfocitos que son capaces de originar una respuesta inmune contra antígenos presentes en el receptor. Esta acción es benéfica cuando es dirigida contra células tumorales (ICT) y perjudicial cuando daña tejidos u órganos sanos del huésped (EICH) (Cuadro 1, Mary M. Horowitz y col., 1990; Olle Ringdén y col., 2009).

Cuadro 1.- Manifestaciones Inmunológicas en trasplantes alogénicos:

a.- Enfermedad injerto contra huésped. Respuesta post-TAPH de una mujer de 36 años que se manifestó con un rash cutáneo a los 30 días post trasplante. **b.-** Efecto injerto contra tumor. Seguimiento de paciente con Linfoma no Hodgkin sometido a un TAPH. Se observa la disminución gradual del tamaño del tumor, atribuida a injerto contra linfoma. El paciente no estaba con medicación farmacológica (Guido Osorio S., 2008).

a)



b)



Respuesta inmunológica en el TAPH:

Es necesario señalar que individuos que han sido expuestos a un péptido determinado a nivel tímico en el desarrollo inmune fetal, no generarán una respuesta inmune a ese péptido debido principalmente al desarrollo de tolerancia a antígenos propios (autoantígenos) mediante mecanismos de anergia o delección de linfocitos T específicos. Es decir, si el donante y el receptor no presentan diferencias genómicas no habrá una respuesta inmunológica, puesto que todos los antígenos son reconocidos como propios. Por el contrario, mientras mayor sea la diferencia genética entre dador y receptor, la posibilidad de una respuesta inmune contra esas discrepancias es más grande (Jan Klein y col., 2000).

En el caso del TAPH entre individuos HLA compatibles, los aloantígenos del receptor son reconocidos por linfocitos T maduros que se encuentran en el injerto proveniente del donante. Se desconoce si linfocitos T generados *de novo*, a partir de células progenitoras del donante, reconocerían aloantígenos como propios haciéndose tolerantes. O si algunos precursores de linfocitos T pueden escapar a la regulación tímica llevando a la generación o a la persistencia de clones aloreactivos.

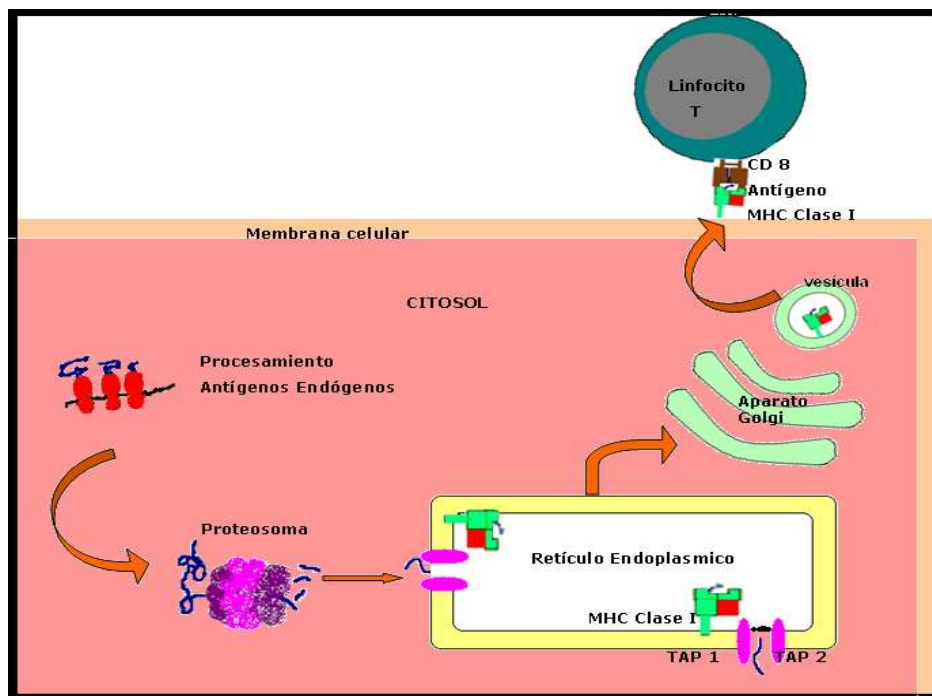
Independientemente de la forma de activación de estas subpoblaciones de linfocitos T, estos originan las manifestaciones inmunológicas aloreactivas ICT y EICH (C.Solano, 2003; J.F. Tomás y col.,2003). El desarrollo tanto de ICT como de EICH es parte del proceso de aloreactividad desencadenada frente a diferencias polimórficas no HLA entre el dador y el receptor. Uno de los tipos de polimorfismos genéticos, incluyen a mHAgs. Estos antígenos son péptidos derivados de proteínas y son presentados sobre una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase I o II en la superficie de células presentadoras de antígenos al linfocito T (E. Simpson y col., 2002), ver Cuadro 2.

La mayoría de los genes que codifican antígenos menores presentan formas bialélicas que se originan de mutaciones en un solo nucleótido (Joke den Haan, 1998). La inmunogenicidad de cada mHAgs está restringida en el contexto de moléculas HLA, es

decir, un péptido puede ser antígeno en el contexto de un paciente HLA-A2, pero no en un paciente HLA-A3 (Jan Klein y col., 2000), circunscribiendo la acción inmunológica a tejidos que expresen el antígeno y a células que sean capaces de presentarlos en un contexto HLA apropiado (Joke den Haan, 1998).

Cuadro 2.-Presentación Antigénica de clase I: el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) es un grupo de genes ubicados en el brazo corto del cromosoma 6. Se divide en 3 regiones; clase I, clase II y clase III (Abbas, 2001). El proceso de presentación antigénica de clase I se inicia con el procesamiento de proteínas endógenas en el inmunoproteosoma, generando péptidos que son transportados por proteínas llamadas TAP1 y TAP2 (TAP = proteína transportadora de antígenos) e introducidas al retículo endoplasmático (RE) por la proteína Tapasina. En el RE, los péptidos se incorporan a la molécula MHC clase I de acuerdo a su tamaño y afinidad por dicha molécula, para luego ser conducidas a la superficie de la célula presentadora de antígeno como complejo MHC-péptido, donde son presentadas a linfocitos T (J.H.Frederik Falkenburg y col., 2003).

Figura 1.- Presentación Antigénica en el contexto de MHC clase I



El Antígeno Menor de Histocompatibilidad HA-1

Estructura y Función: La función de los antígenos HA-1, como de otros antígenos, HA-2 y HA-3 identificados de diferentes pacientes, pueden estar vinculados entre sí en una cascada de señalización implicadas en la reordenación del citoesqueleto. HA-1 y HA-3 interactúan con efectos opuestos sobre un tipo de Rho GTPasas (enzimas que catalizan la hidrólisis de GTP). Los miembros de esta familia controlan la adhesión celular, la motilidad y forma de actina en la formación del citoesqueleto (E.Spierings y col.,2004). Actualmente se ha descrito para HA-1, tres dominios: uno es el RhoGAP que incrementa la actividad de una GTPasa, el segundo es el dominio homólogo a Fes/CIP4 y tercero, la región C1 conservada de Proteína kinasa C que puede interactuar selectivamente con diacilglicerol (un diéster de glicerol y 2 ácidos grasos) o con cualquier metal iónico o zinc. (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Frecuencia poblacional de HA-1: La aplicación de terapias clínicas contra HA-1 depende de las frecuencias génicas de sus alelos. En un reporte mundial de estudios multicéntricos se analizaron las frecuencias genotípicas y fenotípicas de varios antígenos menores de histocompatibilidad, incluyendo el gen HA-1, en las seis etnias más importantes de la población (E. Spierings y col. 2007). Aunque no hubo diferencias significativas, se observa una frecuencia mayor del alelo inmunogénico HA-1^H en la etnia Negra que en los individuos de etnia Caucásica. B.Pietz y colaboradores (2005) estudiaron la presencia del antígeno HA-1 inmunogénico (HA-1^{HH} ó HA-1^{HR}) en individuos sanos que es de 0,65 aproximadamente, ver TABLA 1.

TABLA 1.-Frecuencias del mHAg en 259 personas sanas etnia Caucásica

Locus	HA-1	HA-2	HA-3	HA-8
Frecuencia del Antígeno (%)	64,5	96,1	84,9	65,6

El estudio en las etnias, estimó en ocho mHAg restringido a células hematopoyéticas, la posibilidad de tener al menos un mHAg inmunogénicos (tasa de disparidad), corregido con la frecuencia del HLA apropiado. En el caso de la frecuencia del genotipo de HLA-A2, en combinación con la tasa de disparidad para HA-1 entre los individuos, señala a HA-1 como el antígeno menor más favorable para la aplicación clínica.

Expresión de HA-1 en células hematopoyéticas y no hematopoyéticas: La expresión de HA-1 está restringida a células hematológicas (M. Wilke y col., 2003) y excepcionalmente en células tumorales no hematológicas (Christoph A. Klein y col., 2002). Además, el nivel de expresión del antígeno HA-1 aumenta levemente en poblaciones celulares no hematológicas cuando se utiliza TNF, IL-1 y IFN como estímulo (M. Wilke y col., 2003).

Respuesta Inmune contra HA-1: El gen HA-1 presenta dos formas alélicas, H y R. El primero genera un péptido inmunogénico con la secuencia de aminoácidos VLHDDLLEA (histidina en la posición 139) restringido al alelo HLA-A*0201 y puede ser reconocido por linfocitos T. Su homólogo R (arginina en la posición 139) con una secuencia VLRDDLLEA no es inmunogénico debido a su bajísima afinidad por la molécula HLA-A*0201 (Brigitte Wieles y col., 2005).

Si linfocitos T de un donante homocigoto para el gen del antígeno HA-1^R reconociera péptidos inmunogénicos HA-1^H presentes en células del receptor desarrollaría una respuesta inmune para eliminarlos. En el caso inverso (donantes homocigotos HA-1^H) no se desarrolla esta respuesta inmune contra el péptido R, debido a la pérdida de afinidad del péptido por la molécula de HLA-A*201 (Sarah Nicholl y col., 2009). Se ha descrito en modelos de trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos que LT actúan preferentemente contra productos de genes polimórficos (mHAg) o genes sobre-expresados en tumores malignos. Específicamente, se ha demostrado la presencia de linfocitos T específicos anti HA-1^H, postulándose que la inducción de la actividad celular T

se asocia a la abundancia y/o la expresión de HA-1, según la observación de la expresión de mRNA en las neoplasias hematológicas (M.Wilke y col.,2003).

Blancos inmunoterapéuticos: Para utilizar al antígeno HA-1 en terapias de inmunomodulación, es indispensable conocer su frecuencia fenotípica en la población en estudio, la distribución en los tejidos y su expresión funcional en la membrana.

A su vez, la expresión génica puede ser modificada por el tratamiento oncológico (Sorich MJ y col. 2008), el silenciamiento génico (Jon A. Oyer y col., 2009), el envejecimiento celular (Stephen Welle y col., 2004) y/o por los mecanismos de evasión a la respuesta inmunológica (Louis M. Staudt y col., 2005; Salazar O. Flavio, 2000).

Els Goulmy y colaboradores (2006) han propuesto la aplicación clínica mediante la vacunación con mHAgs propios del paciente, en donde el reconocimiento específico por parte de células T contra éstos es preparada previamente por las células presentadoras de antígeno derivadas del paciente expresando mHAgs, incrementando la respuesta inmune.

Se ha demostrado, en un modelo murino de trasplante alogénico que la vacunación, post-trasplante, incrementa la respuesta selectiva ICT por células T derivadas de un donante previamente sensibilizado a mHAgs o antígenos diferencialmente expresados en células leucémicas, permitiendo mejorar la sobrevida sin exacerbar EICH (H. Dolstra y col. 2002).

Por tanto, el polimorfismo de los mHAgs, es importante en la respuesta inmunológica observada en los alotransplantes. Sin embargo, existe poca información respecto a los niveles de expresión de estos mHAgs y su significado en la clínica.

Proyecto

Hipótesis

La expresión del mHAg HA-1 se encuentra en todas las subpoblaciones hematológicas estudiadas, no existiendo diferentes niveles de expresión en las distintas leucemias derivadas de progenitores hematopoyéticos. Estas variaciones tampoco se ven afectadas por edad o condición de género de los individuos. Esto significa que:

- i. El mHAg HA-1 se encuentra en subpoblaciones de linfocitos B, linfocitos T, monocitos y células dendríticas
- ii. Los niveles de expresión de mHAg HA-1 serán iguales para la población de células enriquecidas con Phi+ versus la población celular enriquecida Phi-.
- iii. Los niveles de expresión de mHAg HA-1 serán iguales en donantes según edad y sexo.

Objetivo General

Estudiar la expresión cuantitativa del mRNA HA-1 en pacientes hemato-oncológicos y donantes de Banco de Sangre provenientes del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

Objetivos Específicos

- i. Separación de subpoblaciones de: linfocitos T, Linfocitos B, monocitos por inmunobeads.
- ii. Obtención de células dendríticas derivadas de monocitos desde cultivo celular.
- iii. Extracción de RNA desde: donantes de sangre, de pacientes hematooncológicos y subpoblaciones celulares en estudio.
- iv. Detectar la expresión del gen HA-1 en las diferentes subpoblaciones celulares hematológicas mediante RT-PCR.
- v. Cuantificar la expresión del gen HA-1 en pacientes hemato-oncológicos y donantes de Banco de Sangre mediante Q-PCR.
- vi. Evaluar la expresión diferencial del gen HA-1 en los individuos estudiados.

V. Materiales y Método

1. Selección de la población en estudio

Se diseñó un estudio basado en muestras de pacientes hematooncológicos y paralelamente un grupo de individuos sanos, seleccionados según los siguientes criterios de inclusión.

Criterios de Inclusión

Selección de Pacientes hematooncológicos:

- Diagnóstico de Enfermedad Hematooncológica (Leucemia Mieloide Crónica, Leucemia Mieloide Aguda, Leucemia Linfática Aguda).
- Con o sin tratamiento oncológico para su enfermedad.
- Cualquier estado de remisión de su enfermedad. Pacientes con Leucemia Mieloide Crónica en estado de Remisión Parcial son Philadelphia positivo (Phi+) para test PCR anidada y en estado de Remisión Completa son Philadelphia negativo (Phi-) para test PCR anidada.
- Aprobar el ingreso al estudio mediante conocimiento y firma del Consentimiento Informado (Anexo i)

Selección de Donantes:

- Ser donante de Banco de Sangre del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.
- Aprobar el ingreso al estudio mediante conocimiento y firma del Consentimiento Informado desde Banco de sangre (Anexo i –Anexo ii).

Criterios de Exclusión

- Paciente menor de edad, sin previo consentimiento informado de sus padres o tutores.
- Paciente embarazada
- Ausencia de consentimiento informado firmado
- Pacientes con menos de 1000 leucocitos/ μ l al momento del estudio

- Pacientes con tamizaje positivo para virus VIH, Sífilis, Hep B, Hep C, HTLV-1 y Chagas en cualquier fase de su evaluación

El cálculo del tamaño muestral se detalla en el anexo iii. Las características de las poblaciones de individuos seleccionados se muestran en las siguientes tablas:

Tabla 2.- Número de donantes de Banco de Sangre	n=50
Sexo Femenino	n=22
Sexo Masculino	n=28
Edad (19-25), (30-49), (50-70)	n= 8,n= 24,n=24

Tabla 3.- Número de pacientes	n= 48
Sexo Masculino	n=28
Sexo Femenino	n=23
Edad (18-29),(30-49),(50-80)	n=9,n=12,n=27
Pacientes LMC con Remisión Molecular Nula o Menor (Phi+)	n=12
Pacientes LMC con Remisión Molecular Mayor o completa (Phi-)	n=19
Pacientes al Diagnóstico	n=17
LLA	n=7
LMC	n=7
LMA	n=3

LLA=Leucemia Linfática Aguda, LMC=Leucemia Mieloide Crónica, LMA=Leucemia Mieloide Aguda

2. Purificación de poblaciones celulares hematológicas

Separación de células mononucleares de concentrados leucocitarios mediante

immunobeads: Separamos la población de linfocitos T, células B y monocitos, mediante inmunobeads conjugado a anti CD3, anti CD20 y CD14, respectivamente (MACS®Technology). La purificación se realizó mediante columnas de inmuno afinidad, es decir, se incuban las células con un anticuerpo monoclonal específico de linaje conjugado con esferas magnéticas, y luego, la suspensión celular se pasa a través de la columna sostenida en un magneto, quedando retenida la población leucocitaria de interés. Por

último, se lavó la columna con buffer y luego se eluyeron las células sacando la columna del magneto (anexo iii), la citometría de flujo se realizó en la etapa final para evaluar el grado de purificación. Las células dendríticas maduras e inmaduras y las líneas celulares HeLa, células EBV y fibroblastos N1H1L3 fueron donadas por el Laboratorio del Dr. Flavio Salazar (Programa de Inmunología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile).

Citometría de Flujo: El análisis de purificación obtenido por inmunobeads se realizó por citometría de flujo, según el protocolo descrito en el anexo iv. El porcentaje obtenido de pureza fue evaluado según la cantidad de células leídas por el equipo Citometro de flujo Becton Dickinson FACSCANTO II Programa FacsDiva.

3. Expresión del gen HA-1

El RNA de las células purificadas fue extraído mediante el Método de Chomczynski-fenol (anexo v). Luego, se generó cDNA a partir de 10 µl de RNA y se realizó el PCR convencional con 2 µl del cDNA generado (anexo v y vi).

PCR para HA-1: Para la técnica de PCR convencional utilizamos la siguiente secuencia de partidores:

Partidor	Secuencia 5´-3´
HA-1 RNA reverse	GACGTCGTCGAGGACATCTCCCATC
HA-1 RNA forward	GAAGGCCACAGCAATCGTCTCCAGG

El amplificado resultante se visualizó en un gel de agarosa al 2% (anexo vi) y la banda del mRNA de HA-1 correspondió a 312 pb.

Clonamiento HA-1 (ver anexo vii): Brevemente, para realizar el clonamiento se obtuvo mediante PCR el segmento de cDNA de HA-1. Luego, el segmento fue ligado en el plasmidio pGEM-T easy, transfectado en bacterias *E. coli* y sembradas en placas de Agar-Ampicilina. Posteriormente, se realizó un PCR de colonias para seleccionar colonias HA-1 positivas. Las colonias HA-1 positivas fueron purificadas (Kid comercial Wizard Plus SV

Minipreps DNA Purification System) y secuenciadas en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Q-PCR para HA-1/GUS: Las secuencias utilizadas para Q-PCR (Stratagene/ Programa MxPro) del gen normalizador GUS, previamente confeccionada, y HA-1 confeccionada para este proyecto (ver anexo viii) fueron las siguientes:

Partidor	Secuencia 5' - 3'
GUS Sonda Taqman	TGAACAGTCACCGACGAGAGTGCTGG
GUS reverse	CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA
GUS forward	CTCATTTGGAATTTTGCCGATT
<hr/>	
Partidor	Secuencia 5' - 3'
HA-1 Sonda Taqman	CAGGAGTTCGAGAAGGCCCTGGA
HA-1 right	ACTCGGACACTGTGCTACTGAA
HA-1 left	GGTCAAAGCCTTCCATTATGAG

La amplificación y cuantificación fue a través de una sonda de ensayo TaqMan, el programa se describe a continuación:

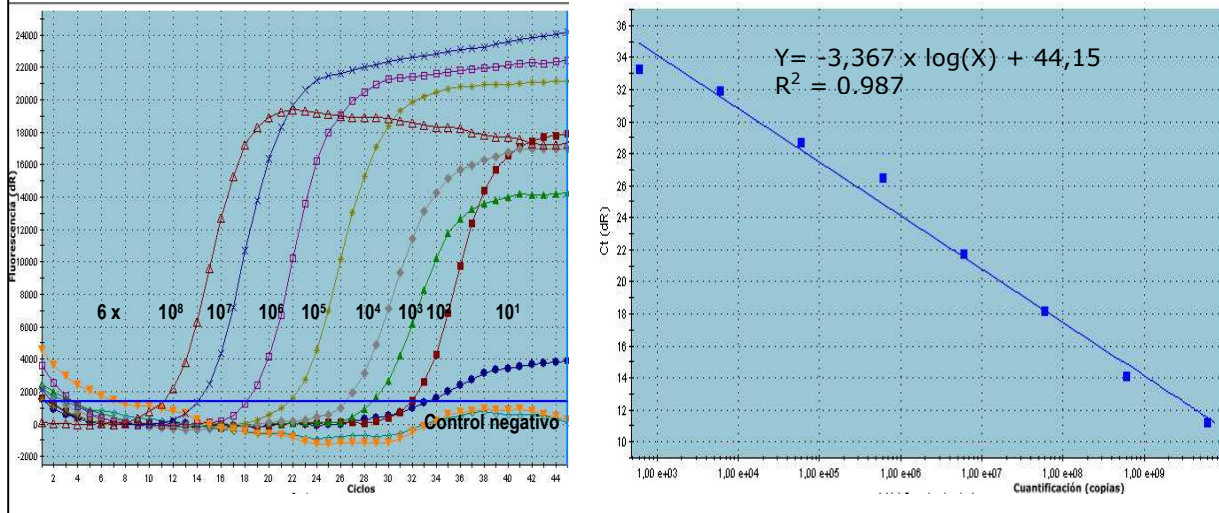
Paso de Activación enzima 95°C 10min

95°C 10 segundos	}	45 ciclos
65°C 20 segundos		
72°C 10 segundos		

Estandarización del método de Q-PCR para cuantificar HA-1 y el gen

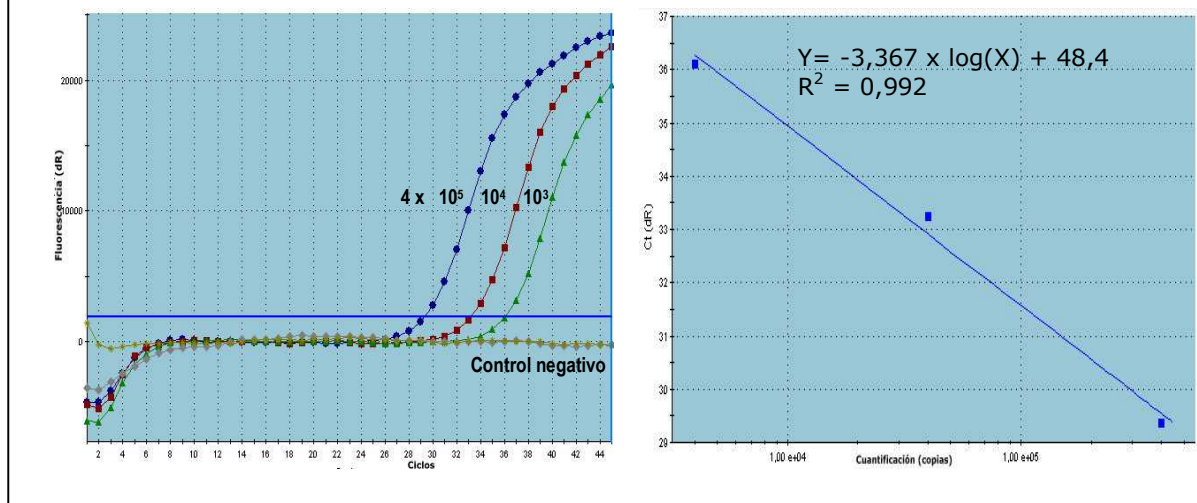
normalizador GUS: Para cuantificar los niveles de expresión del mRNA del antígeno HA-1 se realizó una curva de calibración con cantidades 6×10^9 hasta 60 moléculas de HA-1 con separación de 1 orden de magnitud entre cada estándar (Gráfico 1, ver anexo ix)

Gráfico 1.- Curva de calibración de HA-1: a partir del inserto se obtuvieron diferentes diluciones del mRNA de HA-1.



Para la cuantificación del gen GUS, se realizó una curva de calibración desde 4×10^5 hasta 4×10^3 . Los estándares fueron adquiridos en la Empresa Ipsogen, New Haven, USA.

Gráfico 2.- Curva de calibración de GUS: realizada con estándares comerciales



4. Tabulación de Datos

Los datos fueron tabulados de acuerdo a la expresión de HA-1 en subpoblaciones de células hematopoyéticas y el nivel de expresión de HA-1 en individuos sanos y pacientes hemato-oncológicos (anexo xi)

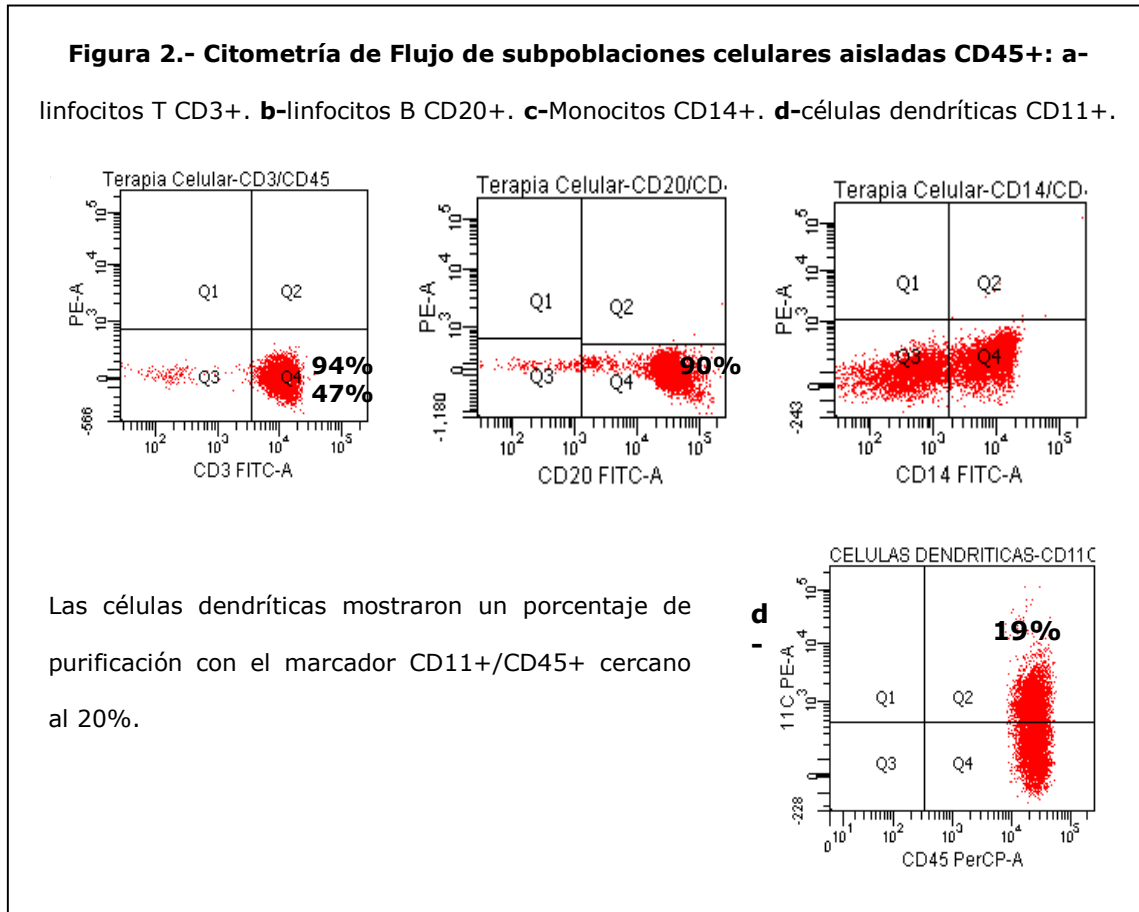
5. Método Estadístico

El análisis estadístico para los resultados de este trabajo se realizó con t-student no paramétrico para dos grupos y test Kruskal Wallis no paramétrico para 3 grupos con el programa GraphPadPrism 3.

VI. Resultados

El mRNA HA-1 es expresado en subpoblaciones hematológicas:

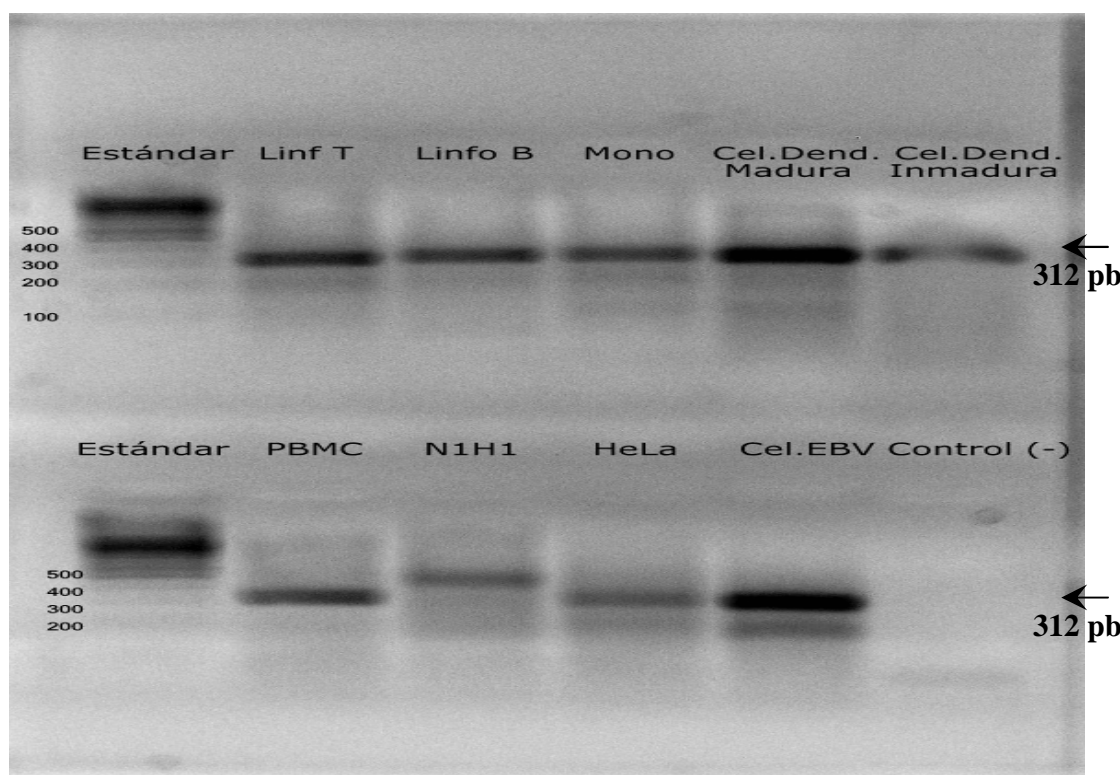
A partir de concentrados leucocitarios de donantes de Banco de Sangre se aislaron subpoblaciones hematológicas mediante inmunobeads, y su grado de pureza se evaluó por citometría de flujo mostrando un porcentaje de purificación sobre el 90% para linfocitos B y T, mientras que para monocitos (CD14+) fue de 47% (Figura 2). Además, se obtuvieron células dendríticas maduras e inmaduras derivadas de monocitos diferenciados de cultivos celulares.



Para verificar la expresión del mRNA HA-1 en las subpoblaciones hematológicas obtenidas, realizamos un PCR y los productos fueron corridos en un gel de agarosa 2%, los resultados se observan en la Figura 3. Todas las subpoblaciones hematológicas

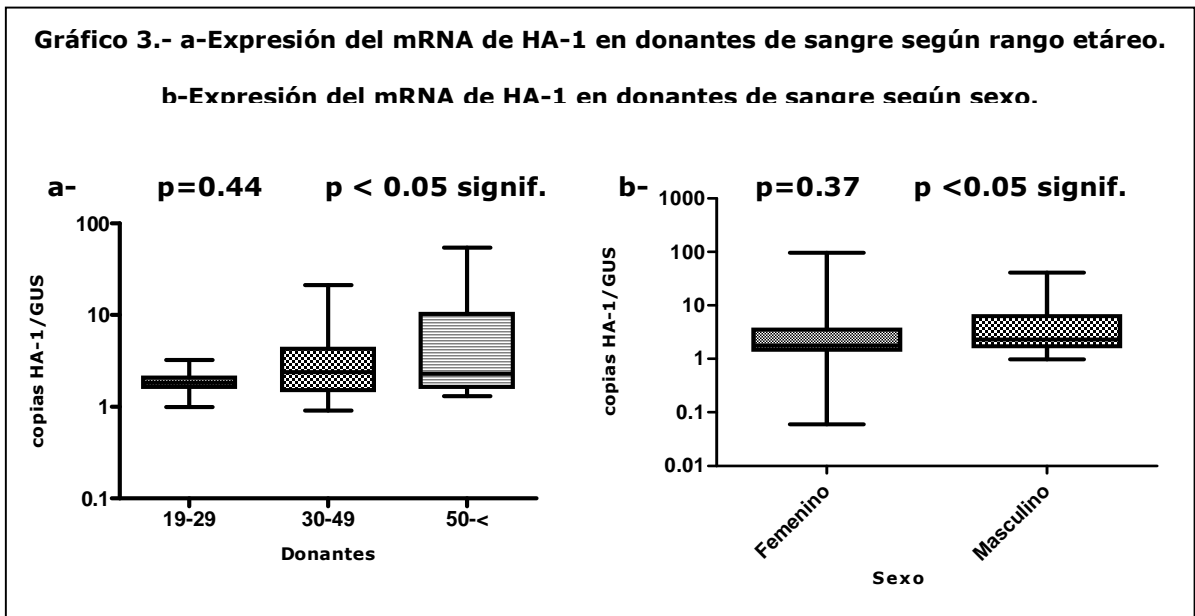
testeadas expresan el mRNA de HA-1. Sin embargo, la línea celular N1H1L3, derivada de fibroblastos presenta una banda de mayor tamaño, esto podría deberse a un producto inespecífico.

Figura 3.- Expresión del mRNA de HA-1 en diferentes subpoblaciones hematológicas: en un gel de agarosa al 2%, se obtuvieron bandas de 312 pares de bases del mRNA de HA-1 en linfocitos T, linfocitos B, monocitos, células dendríticas maduras e inmaduras, población de células sanguíneas mononucleares (PBMC), líneas tumorales como; N1H1L3 (fibroblastos), células HeLa y células linfocitos B transformadas-EBV, control negativo (-).

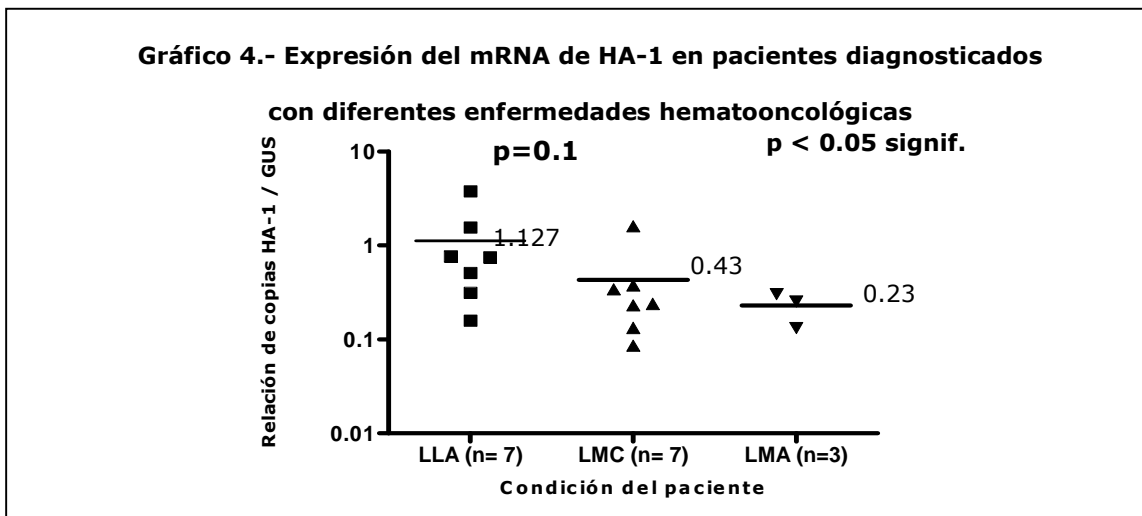


Expresión del mRNA del gen HA-1 no varía de acuerdo a la edad de los individuos: Las muestras de donantes fueron separadas en tres grupos etáreos: 19-25 años $n=8$, 30-49 años $n=24$, 50-65 $n=24$, esta división fue arbitraria, la razón de copias HA-1/GUS vario de 0.99 a 3.22 con una media 1.9, 0.915 a 21.32 una media de 3.96 y de 1.31 a 54.59 con una media de 10.6 para cada grupo respectivamente. No

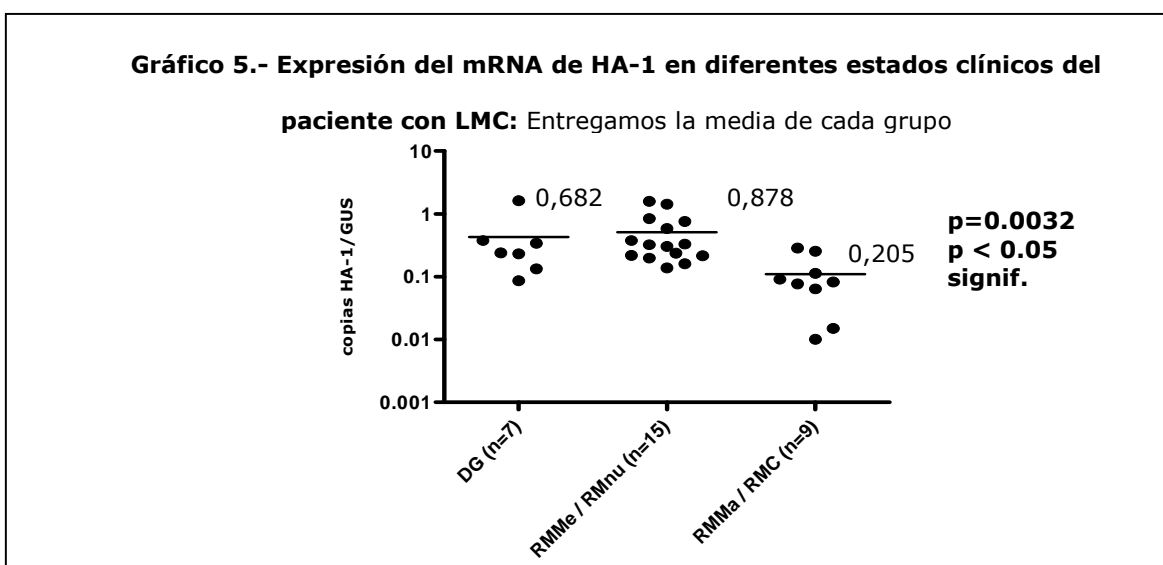
encontramos diferencias significativas entre éstos grupos (Gráfico 3). También realizamos la división de acuerdo al sexo de los individuos en las cuales tampoco demostraron tener diferencias significativas, los rangos oscilaron entre 0.06-96.13 con una media de 10.47 copias HA-1/copias GUS en el sexo femenino y 0.99-40.61 con una media de 5.52 para el sexo masculino.



mRNA del gen HA-1 no varía de acuerdo a la naturaleza de la enfermedad: Dentro de los 48 pacientes hematooncológicos, solo se recolectaron 17 en estado diagnóstico, los cuales fueron agrupados según la naturaleza de la enfermedad; leucemia linfática aguda (LLA), leucemia mieloide crónica (LMC) y leucemia mieloide aguda (LMA) (Gráfico 4). En los pacientes la relación HA-1/GUS vario desde 0.16-3.82 con una media de 1.127 para LLA, de 0.0858-1.61 con media de 0.43 para LMC y de 0.132-0.304 con media de 0.23 para LMA. No existieron diferencias significativas entre los grupos comparados, lo cual indicaría una tendencia del mRNA de HA-1 a no variar de acuerdo a la naturaleza de la enfermedad.

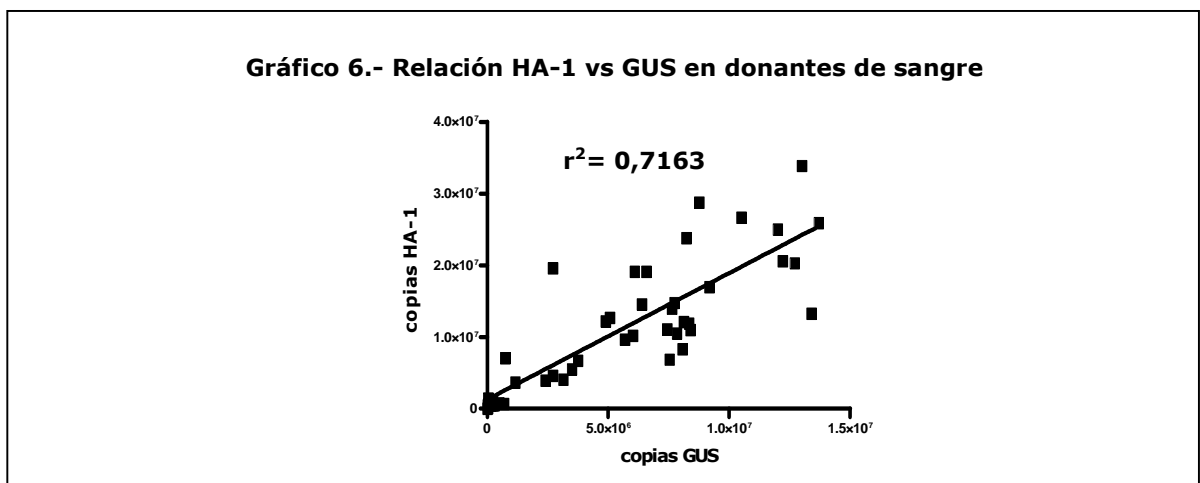


mRNA de HA-1 disminuye en pacientes con Remisión Molecular Mayor o Completa en Leucemia Mieloide Crónica: Las muestras fueron agrupadas según el estado clínico de los pacientes; diagnóstico de LMC (n= 7), Remisión Molecular Menor o Nula (n=19) y Remisión Molecular Mayor o Completa (n=12). El Gráfico 5 muestra que la expresión de mRNA de HA-1 varío entre el grupo diagnóstico, desde 0,0858 hasta 3,82 una media de 0,682, y el grupo con RMMa/RMC, desde 0,000476 hasta 0,844 con una media de 0,205. La comparación estadística entre ambos grupos fue realizada con la test de Kruskal-Wallis, observándose diferencias significativas entre los 3 grupos.



Los niveles de HA-1 y el gen housekeeping GUS están correlacionados

positivamente: Se analizaron las muestras de los donantes, aquellos valores outliers fueron eliminados para el análisis estadístico. Las copias de HA-1 con las copias del gen normalizador GUS en donantes se correlacionaron positivamente (Gráfico 6) con un $r > 0,8$.



VII. Discusión

Distribución del antígeno menor de histocompatibilidad HA-1 en tejido: los mHAgs restringidos a células hematopoyéticas son blancos cruciales para la inducción de una respuesta injerto contra tumor en un TAPH. Es importante señalar, que el gen HA-1 se expresa en células hematopoyéticas y posee una expresión no significativa en piel, hígado, colon e intestino delgado (Wieger J. Norde, 2008).

Este estudio confirma la expresión del mHAg HA-1 en subpoblaciones hematológicas, habiendo encontrado su expresión en Linfocitos T y B, Monocitos y células dendríticas. Sin embargo, encontrar el mRNA de HA-1 no indica que éste se exprese como antígeno funcional en la célula, y que además que sea un péptido inmunogénico, ya que depende de la molécula HLA-A2.

Estos hallazgos son altamente significativos en las subpoblaciones de LT y LB, debido al alto grado de pureza que alcanzan con la técnica empleada en su purificación. En la subpoblación de Monocitos y células dendríticas el grado de purificación alcanzado se debe al bajo recuento inicial de éstas a partir de los concentrados leucocitarios.

Nivel de expresión mHAg HA-1 en donantes de sangre: En este estudio se consideró un n=50 de donantes de Banco de sangre, libres de patologías graves. Utilizamos la técnica RT-PCR/Q-PCR para cuantificar las copias de mRNA de HA-1 y copias del gen normalizador GUS. Nuestros resultados muestran que no existieron diferencias significativas según edad o género de los donantes. A pesar de lo anterior, una muestra mayor permitiría detectar diferencias estadísticas más pequeñas (anexo iii). No encontramos en la literatura revisada estudios que cuantifiquen HA-1 en individuos sanos. Nuestros datos indican que se requiere una muestra de al menos 122 pacientes y 192 donantes para establecer un resultado más categórico.

mHAg HA-1 y pacientes hematooncológicos: Al evaluar la expresión del mRNA del gen de HA-1 en los pacientes hematooncológicos, los resultados indican que los niveles de expresión del gen HA-1 no varían según la enfermedad hematológica de los individuos

(n= 7 LLA, n= 7 LMC y/o n= 3 LMA), pero si de acuerdo al estado de remisión de aquellos pacientes con LMC (diagnóstico, remisión molecular menor, remisión molecular mayor o completa). Los pacientes portadores de LMC activa, con mayor masa tumoral (Phi positiva), expresan HA-1 con mayor intensidad que aquellos que se encuentran en remisión, con una alta proporción de sus células Phi negativas. Esto podría tener relación con la respuesta a la infusión de linfocitos del donante en paciente con LMC en recaída, al afectar con mayor intensidad a la población de células neoplásicas.

Un estudio interesante será comparar los pacientes en estado diagnóstico con donantes del Banco de Sangre. Si bien al comparar los 17 pacientes con diagnóstico de LMC con 50 donantes (datos no mostrados), estos dos grupos mostraron algunas diferencias significativas, el tamaño muestral requiere ampliarse, para disminuir la tasa de error estadístico.

Aplicaciones futuras del mHA_g HA-1: Se han explorado mHA_g inmunoterapéuticos para el uso contra las neoplasias malignas hematológicas recurrentes después del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, porque el antígeno menor de histocompatibilidad expresado en células hematopoyéticas sólo se considera para aumentar los efectos de ICT sin aumentar el riesgo en la supervivencia del paciente que involucra la enfermedad injerto contra huésped.

Los estudios muestran que HA-1 tiene una expresión en células sanguíneas y una expresión aberrante en tejidos sólidos, tales como carcinomas de células renales, esto indica que HA-1 puede ejercer una respuesta inmune tejido específica.

Se espera que los alo-antígenos sean más poderosos que la mayoría de los antígenos tumorales que derivan de la sobreexpresión de proteínas para activar esta respuesta, y así la inmunoterapia basada en mHA_gs pueda dar lugar a una nueva modalidad de tratamiento de neoplasias de alto riesgo (Yoshiki Akatsuka y col., 2007)

Actualmente existen estudios que evalúan a los antígenos menores de histocompatibilidad según tamaño, expresión en tejido, frecuencia genotípica y algoritmo

de expresión antigénica, asignando a HA-1 como el mejor evaluado junto con HA-3 (David S. De-Lluca y col., 2009)

Un dato interesante, observado en este estudio en el grupo de donantes de sangre, evidenció que las copias de HA-1 con las copias del gen normalizador GUS, dieron una correlación positiva que podría proyectar a HA-1 como un gen normalizador de la expresión de genes en las subpoblaciones sanguíneas. Algunas de las características que debe tener un buen gen de referencia para ser usado en estudios de expresión de genes, es que éste no se exprese en altísimos niveles, ya que no detectará modificaciones de otros genes que pueden tener una baja o alta regulación, por esto, debe tener una expresión estable (Cluzel-Tailhardat y col.,2007).

VIII. Conclusiones

Los mHAgS dan cuenta de las respuestas inmunológicas de pacientes trasplantados, en ausencia de discrepancias HLA. Debido a que su expresión antigénica se encuentra restringida a HLA, su estudio es extremadamente difícil, esto porque una pareja donante-receptor, generará mHAgS propios dependiendo de su polimorfismo y constitución HLA.

A pesar de lo anterior, se han ido generando conocimiento que permiten saber más respecto a la naturaleza de estos mHAgS. Esta tesis ha explorado la presencia del mHAg HA-1 en células de extirpe hematológica en sujetos normales (donantes de Banco de Sangre), encontrando según la hipótesis la expresión de éste en las líneas de origen hematopoyético.

Al explorar el nivel de expresión de HA-1 en células provenientes de pacientes con LMC, se ha podido observar que la expresión es mayor en aquellas células enriquecidas Phi+, versus las células estudiadas en remisión Phi-. Este interesante hallazgo, que deber ser corroborado con una muestra de mayor tamaño y controles de individuos sanos, podrían explicar por qué los pacientes en recaída de una LMC responden a la inmunoterapia con infusión de linfocitos del donante. Se abre así una interrogante que trasciende los objetivos de esta tesis.

IX. Bibliografía

1. Nelson J. Chao, Stephen G. Emerson y Kenneth I. Weinberg (2004) *Stem Cell Transplantation (Cord Blood Transplants)* The American Society of Hematology pág. 354-371
2. Ann Mullally y Jerome Ritz (2007) *Beyond HLA: the significance of genomic variation for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation* Blood The American Society of Hematology vol. 109 pág. 1355-1362
3. E. Simpson, D. Scott , E. James, G. Lombardi, K. Cwynarski, y col. (2002) *Minor H antigens: genes and peptides*. Elsevier Science vol. 10 pág 115-123.
4. N.J. Chao, K.G. Blume (1989) *Bone marrow transplantation. Part I-Allogeneic*. West J Med vol. 151 pág. 638-643.
5. Mary M. Horowitz, Robert Peter Gale, Paul M. Sondel y col. (1990) *Graft-Versus-Leukemia Reactions After Bone Marrow Transplantation*. Blood vol. 75 nº3 pág. 555-562
6. Olle Ringdén, Steven Z. Pavletic, Claudio Anasetti, A. John Barrett, Tao Wang, Dan Wang y col. (2009) *The graft-versus-leukemia effect using matched unrelated donors is not superior to HLA-identical siblings for hematopoietic stem cell transplantation* Blood vol.113 No 13 pág. 3110-3118.
7. Guido Osorio S. (2008) *Hematología: diagnóstico y terapéutica* Ed. Mediterráneo 3ªEdición.
8. Jan Klein y Akie Sato (2000) *The HLA system*. The New England Journal of Medicine. Advances in Immunology. 1ª parte vol.343 nº 10 pág.702-709.
9. C.Solano (2003) *EICH Cronica y Alo-Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos de Sangre Periférica* Haematologica (ed.esp) vol. 87, supl.6 pág. 129-135
10. J.F. Tomás, A. Sánchez-Salinas, A. Román y D. Subirá (2003) *Estrategias para discriminar EICH y EICL* Haematologica (ed.esp) vol. 87, supl.6 pág. 139-147

11. Joke den Haan, Leslie Meadows, Wei Wang, Jos Pool, Els Blokland, Tracie Bishop y col.(1998) *The Minor Histocompatibility Antigen HA-1: A Diallelic Gene with a Single Amino Acid Polymorphism* Science vol.279 nº5353 pág.1054-1057.
12. Abbas (2001) *Inmunología celular y molecular* 5ta Edición MGH capítulo 4 y 5 pág 65-103.
13. J.H. Frederik Falkenburg, Lisette van de Corput, Erik W.A. Marijt y Roel Willemze (2003) *Minor histocompatibility antigens in human stem cell transplantation* Experimental Hematology-Elsiever vol. 31 pág. 743-751.
14. Eric Spierings, Brigitte Wieles, Els Goulmy (2004) *Minor histocompatibility antigens: big in tumour therapy* Elsevier Ltda TRENDS in Immunology Vol.25 No.2
15. Página web:
[www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=23526&log\\$=databasead&logdbfrom=nucore](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=23526&log$=databasead&logdbfrom=nucore).
16. Spierings E, Hendriks M, Absi L, Canossi A, Chhaya S, y col. (2007) *Phenotype frequencies of autosomal minor histocompatibility antigens display significant differences among populations*. PLoS Genet vol. 3(6) pág 1108-1119.
17. Bradley C. Pietz, Melissa Warden, Brian DuChateau y Thomas Ellis (2005) *Multiplex Genotyping of Human Minor Histocompatibility Antigens* Hum Immunol vol.66 pág.1174-1182.
18. Wilke M., Dolstra H., Maas F., Pool J, Brouwer R, Frederik JH, y al. (2003) *Quantification of the HA-1 gene product at the RNA level; relevance for immunotherapy of hematological malignancies*. The Hematology Journal vol. 4 pág. 315-320.
19. Christoph A. Klein, Martina Wilke, Jos Pool, Corine Vermeulen, Els Blokland, Elke Burghart y col. (2002) *The Hematopoietic System-specific Minor Histocompatibility Antigen HA-1 Shows Aberrant Expression in Epithelial Cancer Cells* J Exp Med vol.196 nº3 pág.359-368.

20. Brigitte Wieles, Jos Pool, Richard Derks, William J. Burlingham, Els Goulmy (2005) *Detection of Microchimerism by Minor Histocompatibility Antigen HA-1 Allele-Specific Nested Polymerase Chain Reaction*. American Society for Blood and Marrow Transplantation Biology of Blood and Marrow Transplantation vol. 11 pág. 345-348.
21. Sarah Nicholls, Karen P. Piper, Fiyaz Mohammed, Timothy R. Dafforn, Stefan Tenzer, Mahboob Salim y col. (2009) *Secondary anchor polymorphism in the HA-1 minor histocompatibility antigen critically affects MHC stability and TCR recognition* PNAS vol 106 nº10 pág. 3889-3894.
22. Sorich MJ, Pottier N, Pei D, Yang W, Kager L, y col. (2008) *In vivo response to methotrexate forecasts outcome of acute lymphoblastic leukemia and has a distinct gene expression profile*. PLoS Med 5(4): e83 pág. 646-656
23. Jon A. Oyer, Adrian Chu, Sukhmani Brar, Mitchell S. Turker (2009) *Aberrant Epigenetic Silencing Is Triggered by a Transient Reduction in Gene Expression*. PLoS ONE vol. 4(3) e4832 pág. 1-11.
24. Stephen Welle, Andrew I. Brooks, Joseph M. Delehanty, Nancy Needler, Kirti Bhatt, Bharati Shah y col. (2004) *Skeletal muscle gene expression profiles in 20-29 year old and 65-71 year old women*. Experimental Gerontology Elsevier vol.39 pág 369-377.
25. Louis M. Staudt y Sandeep Dave (2005) *The Biology of Human Lymphoid Malignancies Revealed by Gene Expression Profiling* Adv Immunol NIH vol. 87 pág. 163-208
26. Salazar O., Flavio (2000) *El sistema immune, herramienta estratégica en la batalla contra el cáncer* Rev.chil.pediatr. vol.71 nº4 pág.296-306.
27. Els Goulmy (2006) *Minor Histocompatibility Antigens: from Transplantation Problems to Therapy of Cancer* Human Immunology Elsevier vol 67 pág. 433-438.
28. H. Dolstra, B. de Rijke, T. Schattenberg, T. Dewitte y E. van de Wiel-van Kemenade (2002) *Minor Histocompatibility Antigens as targets for anti-leukemia Immunotherapy* Hematologica vol. 87 supl.1 pág. 301-305.

29. Wieger J. Norde, Ingrid M. Overes, Frans maas, Hanny Fredrix, Johanna C.M. Vos, Michel G. D. Kester y col. (2008) *Mieloid leukemic progenitor cells can be specifically targeted by minor histocompatibility antigen LRH-1-reactive cytotoxic T cells* Blood vol.113 nº10 pág.2312-2323.
30. Yoshiki Akatsuka, Yasuo Morishima, Kiyotaka Kuzushima, Yoshihisa Kodera y Toshitada Takahashi. (2007) *Minor histocompatibility antigens as targets for immunotherapy using allogeneic immune reactions*. Cancer science vol.98 nº8 pág.1139-1146.
31. David S. De-Luca, Britta Eiz-Vesper, Nektarios Ladas, Barbara Anna-Maria Khattab y Rainer Blasczyk (2009) *High throughput minor histocompatibility antigen prediction*. Pág. 01-07.
32. M. Cluzel-Tailhardat, M. Bonnet, H. Abaibou, D. Pelle De Queral, M. Vocanson, K. Lazou y col. (2007) *Which house-keeping genes for dendritic cell transcriptomic studies ?* EJD, vol. 17 nº15 pág. 457-459.

X. ANEXO

i. Consentimiento Informado

Yo,.....CI.....

..., Donante del servicio de Banco de Sangre, autorizo el uso de una muestra de mi sangre para un estudio de investigación a realizarse en el Laboratorio de Terapia Celular, Banco de Sangre, Hospital Clínico U. de Chile.

El estudio contempla la expresión de genes en dos poblaciones: pacientes hemato-oncológicos y donantes de sangre, siendo esta última utilizada como control de los resultados de la investigación. El estudio no posee costo ni efectos adversos para mi, pudiendo rechazar el uso de mi muestra o la eliminación del producto obtenido de ella, sin que me vea perjudicado(a). Por la donación de la muestra no recibiré compensación económica o de otra índole.

El conocimiento generado de esta investigación será dominio público, no así mi identidad. Por último, declaro que he comprendido completamente los alcances de este trabajo y que no he sido sometido(a) a presiones de ningún tipo para donar mi muestra de sangre, participando como Donante Voluntario en este estudio.

.....

Firma Donante

.....

Nombre y Firma del Entrevistador

ii. Entrevista-Consentimiento Informado

FICHA DEL DONANTE

Nombre		Hora	Fecha
<input type="text"/>		<input type="text"/>	<input type="text"/>
Rut	Fecha de Nacimiento	Edad	Actividad
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Domicilio			Comuna
<input type="text"/>			<input type="text"/>
Sexo	Tipo de dador		Fono
M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>	Relacionado <input type="checkbox"/>	Voluntario <input type="checkbox"/>	Aféresis <input type="checkbox"/>
Peso	Pulso	Presión Arterial	Ht ^o /Hb
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Causa de Rechazo		Aspecto general	
<input type="text"/>		<input type="text"/>	
Receptor	Transitorio <input type="checkbox"/>		Definitivo <input type="checkbox"/>
<input type="text"/>	Ubicación		<input type="text"/>

PREGUNTAS DE ESTADO GENERAL DE SALUD

Si No

1.- ¿Se Siente bien hoy?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2.- ¿Ha donado sangre alguna vez?, cuándo dónde	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3.- ¿Ha sido rechazado alguna vez como donante de sangre? ¿Por qué?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.- ¿Tuvo algún problema con la donación?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5.- ¿Ha consultado por problemas de salud en los últimos 12 meses?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6.- ¿Ha sido sometido a operaciones en los últimos 6 meses?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.- ¿Ha recibido transfusiones en los últimos 6 meses?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8.- ¿Ha tenido algún sangramiento importante?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9.- ¿Ha tenido desmayos?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10.- ¿Ha tomado aspirina o antiinflamatorios en los últimos 3 días?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11.- ¿Ha tomado algún medicamento en el último tiempo? ¿Cuál?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
12.- ¿Tiene alguna enfermedad crónica?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
13.- ¿Ha experimentado pérdida inexplicable de peso en los últimos 3 meses?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
14.- ¿Ha tenido diarrea en los últimos 5 días?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
15.- ¿Ha recibido hormona de crecimiento? ¿Cuándo?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
16.- ¿Ha viajado fuera del país en los últimos 3 años? ¿Dónde?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
17.- ¿Ha estado privado de libertad en los últimos 12 meses?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
18.- ¿Ha sido vacunado en los últimos 12 meses?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
19.- ¿Está Ud. embarazada o ha tenido parto o aborto en los últimos 6 meses?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
20.- ¿Ha tenido hepatitis después de los 12 años?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

21.-¿Ha tenido relaciones con persona con hepatitis, dializados o politransfundidos en los últimos 6 meses?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
22.-¿Usted o su pareja se han inyectado drogas por vía de piel o venas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
23.-¿Se ha hecho tatuajes, sometido a acupuntura o realizado perforaciones en el cuerpo en los últimos 6 meses?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
24.-¿Ha tenido relaciones sexuales con más de una persona en los últimos 6 meses?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
25.-¿Ha tenido relaciones con prostitutas, drogadictos, o personas privadas de libertad?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
26.-Si es hombre, ¿Ha tenido relaciones sexuales con otro hombre?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
27.-¿Usted quiere donar sangre solo para hacerse el examen de Sida?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
28.-¿Ha sido trabajador sexual o ha aceptado dinero o drogas por sexo?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
29.-¿Viene a donar sangre por dinero?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
30.- ¿Ha tenido la enfermedad de chagas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
31.- ¿Se ha hecho una endoscopia en los últimos 6 meses?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

CONSENTIMIENTO INFORMADO

He concurrido al Banco de Sangre a donar por libre y propia voluntad. Tuve la oportunidad de preguntar sobre el procedimiento, comprendo que existen eventuales reacciones adversas, entendí las preguntas que me formularon y contesté con la verdad.

 FIRMA DONANTE

 ENTREVISTADOR

INFORMACIÓN AL DONANTE

Informamos a Ud. que de acuerdo a Normas Ministeriales vigentes sobre la seguridad transfusional, los Hemocomponentes que ha donado en esta oportunidad serán sometidos a los siguientes exámenes **VIH (determinación de SIDA), Hepatitis B y C, Chagas y Sífilis**, más otros exámenes que el Banco, dada la situación epidemiológica, considere necesario. Ud. puede solicitar información adicional en el Banco de Sangre.

PARA SER LLENADO POR EL BANCO DE SANGRE

Duración extracción	Flebotomista	Reacciones adversas a la donación
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="radio"/> Lipotimia <input type="radio"/> Traumatismo <input type="radio"/> Hipocalcemia <input type="radio"/> Hematoma <input type="radio"/> Otra

Observaciones

iii. Tamaño Muestral

El cálculo del tamaño de la muestra se realizó con Excel para estimar una media entre los pacientes hematooncológicos. Pero, necesitamos de un estudio piloto para obtener los estimadores necesarios, para lo cual ocupamos el grupo de paciente hematooncológicos con LMC (n=31) y realizamos el siguiente cálculo en Excel:

error alfa	0,05
s	0,432
FE	0,0777
FEE	5,55984556
numerador	0,71690841
denom	0,00603729
(con z+5%)=	125
t inversa	1,97928009
numerador	0,73110879
denom	0,00603729
n (con t)=	122

Lo mismo con el grupo de donantes lo cual arrojo $n = 192$. En el laboratorio de Terapia Celular del Hospital Clínico de la Universidad de Chile las muestras recogidas a la fecha solo ascienden a 50 pacientes hematooncológicos, por lo que se trabajará con este tamaño muestral y no con el n determinado por la teoría, debido a los principales factores que no permiten contar con un mayor número de muestra, que son: los costos de realizar cada técnica, el no cumplimiento con alguno de los criterios de selección (condición del paciente, edad), el registro reciente de pacientes hematooncológicos en el laboratorio.

Para los primeros 3 objetivos específicos se requiere de la obtención previa de las subpoblaciones de Linfocitos T y B, células dendríticas y monocitos a través de una técnica de purificación de inmunobeads. El tamaño muestral de las subpoblaciones es de $n=1$ LT, $n=1$ LB, $n=1$ monocitos y $n=2$ células dendríticas.

La técnica RT/Q-PCR para la expresión del gen HA-1 tiene como definición conceptual expresión del mRNA del gen HA-1, que es la presencia de la síntesis obtenida por RT-PCR del gen. Dimensión del estudio es a nivel celular. Variable dependiente es la presencia o

ausencia del gen con una escala dicotómica (si/no) y variable independiente con escala nominal (linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas y células progenitoras).

Los 3 últimos objetivos contarán con la estandarización de la técnica Q-PCR para HA-1. Definición conceptual es cuantificación de la expresión del mRNA del gen HA-1, que fue medido por Q-PCR. Las dimensiones del estudio son pacientes con LLA, LMC, LMA; pacientes con LMC clasificados de acuerdo a su estado clínico (diagnóstico, remisión molecular nula, remisión molecular completa); donantes de sangre clasificados de acuerdo a su edad y de acuerdo a su sexo, que expresan mRNA HA-1. Variable dependiente es el número de copias HA-1/ copias GUS, con escala de razón (cantidad del gen expresado en nanogramos).

iv. Separación de células mononucleares de concentrados leucocitarios mediante inmunobeads

Reactivos

PBS 1X de Inova Diagnostic (PBS concentrado 40X) ó suero salino - Lymphoprep/Ficoll de Sigma - Buffer de columna frío - conteniendo 2 mM de EDTA - inmunobeads CD3, CD14 - Microbeads CD20 MACS Miltenyi Biotec

Materiales

Tubo de 15 ml - Tubo eppendorf 1.5 ml - Pipeta p1000 - Puntas para pipeta p1000 - Hielo - columna MS - columna LS - separador MidiMACS – embolo - soporte magnético

Equipo

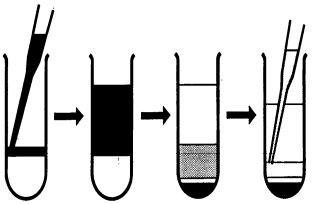
Centrífuga Thermo Electron Corporation modelo BR4i multifunción

Centrífuga Jouan modelo C312

Hemocitometro ABX pentra 80, Horiba ABX Diagnostics

Método

Aislamiento de Poblaciones celulares mononucleares

- 1) Diluir un volumen de concentrado leucocitario en 2 volúmenes de PBS o suero salino.
 - 2) Pipetear cuidadosamente sobre medio volumen de Lymphoprep (p.ej. 6ml sangre diluida: 3ml de Lymphoprep). Evitar que la sangre y el medio de separación se mezclen.
- 
- 3) Centrifugar a 400 g x 20 min a temperatura ambiente (T.A.) a 20°C aproximadamente, en un rotor oscilante. Si la sangre ha sido extraída hace más de 2 horas, centrifugar 30 min.
 - 4) Recoger la fracción mononuclear
 - 5) Diluir con 5 ml de PBS o suero salino.
 - 6) Centrifugar a 250g x 5 min a T.A.

- 7) Decantar o aspirar el sobrenadante (rico en plaquetas) y repetir 1 vez desde el paso 5.
- 8) Resuspender el pellet celular en suero salino o en PBS. Contar la cantidad de células en un hemocitómetro.

Purificación de Linfocitos T CD3+, Linfocitos B CD20+ y monocitos CD14+ desde células mononucleares mediante inmunobeads

a) Selección Positiva

1. Centrifugar las células obtenidas por gradiente y resuspenderlas en 80 μ L Buffer de columna frío conteniendo 2 mM de EDTA por cada 10^7 células.
2. Agregar 20 μ L de inmunobeads del anticuerpo correspondiente por cada 10^7 células.
3. Incubar por 15 minutos en Hielo.
4. Montar la columna MS en el soporte magnético y cebar la columna pasando 1 ml de Buffer de Columna.
5. Agregar 500 μ L de Buffer de Columna al tubo conteniendo las células y luego transferir la solución a la columna.
6. Colocar simultáneamente un tubo eppendorff limpio bajo la columna para recepcionar las células no adheridas.
7. Agregar 1 ml de Buffer de Columna.
8. Colectar alrededor de 1 ml en el tubo y poner un nuevo tubo bajo la columna.
9. Pasar 2 ml de Buffer de columna para lavar bien. Descarte el eluído.
10. Desmonte la columna y colóquela sobre un tubo eppendorff limpio.
11. Agregue 1 ml de Buffer de columna.
12. Coloque el embolo de la columna y empuje la solución.
13. La solución contiene las células CD14+ o CD3+ (según la célula aislada).
14. Pase 100 μ L solución por el hemocitómetro para contar las células y luego utilice 5 x 10^5 células para citometría de flujo.

v. Citometría de Flujo

Reactivos

anticuerpo anti CD45, anti CD20, CD14, CD3 - anticuerpo FITC o PE - PBS Becton Dickinson

Materiales

Tubos Kahn - Pipeta p20 - Puntas para pipeta p20 - Hielo

Equipos

Centrífuga ALC centrifuga PK120 Becton Dickinson

Citometro de flujo Becton Dickinson FACSCANTO II Programa FacsDiva

Método

1. Separar las células 5×10^5 células en dos fracciones.
2. Adicionar 20 μL de anticuerpo anti CD respectivo conjugado a FITC o PE a $2,5 \times 10^5$ células.
3. Marcar la otra fracción con anticuerpo FITC o PE control de isotipo.
4. Incubar en Hielo por 30 minutos
5. Centrifugar a 1500 rpm x 2 minutos.
6. Lavar las células con solución de PBS
7. Centrifugar a 1500 rpm x 2 minutos
8. Repetir paso 4-5 dos veces más.
9. Resuspender el pellet en 100 μL de PBS / 1 % paraformaldehído / 0.5 % SFB
10. Analizar en citómetro de flujo.

vi. Extracción RNA y Síntesis de cDNA

Reactivos

Buffer ACK 1X pH 7,2 (8.29 gr. NH_4Cl 0.15M – 1 gr. KHCO_3 – 0.037 gr. EDTA 0.1mM – 1000ml de Agua DEPC) - Chomczynski-Fenol – Cloroformo - Alcohol isopropílico - Alcohol etílico (preparado en H_2O -DEPC) - Agua DEPC – Kit comercial de Invitrogen : Random primers 50-250 ng/ul - dNTPs 10mM- First-Strand Buffer 5X - DTT 0.1 M - Enzima M-MLV RT 200U/ μl

Materiales

Tubos 15 ml - Pipeta p1000, p200, p100 - Puntas para p1000, p200, p100 - Tubos eppendorf 1.5 ml - Tubos eppendorf 0.2 ml - Hielo

Equipo

Centrífuga Thermo Electron Corporation modelo BR4i multifunción

Vortex

Freezer -20°C

Termociclador MiniCycler

Método

Extracción RNA: *Método de Chomczynski-Fenol;* en un tubo cónico se agrega 5 ml de sangre periférica ó 1 ml de médula ósea y se completa hasta 15 ml con Buffer ACK para lisar los eritrocitos. Luego de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, las muestras se centrifugan por 5 minutos a 300 x g. Se elimina el sobrenadante y el pellet leucocitario se resuspende en 1 ml de Chomczynski fenol, pipeteando repetidamente para homogenizar las células. Posteriormente, se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente y se agrega 0.2 ml de cloroformo, agitando vigorosamente por 15 segundos, e incubando nuevamente por 2 minutos a temperatura ambiente. Luego, se centrifuga a 12000 x g por 15 minutos a 4°C, se transfiere la fase superior acuosa a un tubo limpio y se adiciona 0.5 ml de alcohol isopropílico. Se mezcla e incuba por 10 minutos a temperatura ambiente, y se repite el paso de centrifugación anterior. Se

elimina el sobrenadante y se lava el precipitado de RNA con 1ml de alcohol etílico al 75% (preparado en H₂O-DEPC). Se mezcla y centrifuga a 7500 x g por 5 minutos a 4°C. Por último, se elimina el sobrenadante y el precipitado de RNA es disuelto en 100 µl de agua DEPC. Las muestras son incubadas a 55 °C durante 10 minutos y almacenadas a -20°C hasta su uso.

Síntesis de cDNA: Usando M-MLV RT se sintetiza la primera-hebra de cDNA, un volumen final de 20ul de la reacción puede ser usada para 1ng-5ng de RNA total o 1-500 ng para mRNA.

a) Agregar a un tubo de microcentrífuga libre de nucleasas:

1ul 50-250 random primers

1ng a 5ug de RNAtotal o 1ng a 500ng de RNAm (10µl)

1ul 10mM dNTP Mix

Completar con agua destilada hasta 12ul

b) Llevar a 65°C por 5 min y colocar luego en frío rápidamente. Agregar en el mismo tubo de microcentrífuga:

4ul 5X First-Strand Buffer

2ul 0.1 M DTT

c) Incubar a 37°C por 2 min

d) Agregar 1ul (200units) de M-MLV RT, mezclar el mix.

e) Incubar por 50 min a 37°C

f) Inactivar la reacción llevando a 70°C por 15 min. Usar sólo 10% de síntesis de la primera hebra de cDNA (2ul de la reacción anterior).

vii. PCR Convencional

Reactivos

Buffer PCR 10X - Mg Cl₂ 50mM - dNTPs 10mM Invitrogen - HA-1 reverse RNA 10μM - HA-1 forward RNA 10μM - Taq DNA pol 5U/μl - Agua DEPC

Materiales

Tubos eppendorf 0.2 ml - Pipetas p50, p20, p10 - Puntas para p50, p20, p10

Equipo

Termociclador Minicycler

Método

PCR para detección de mRNA HA-1:

Reactivo	Concentración final	Volumen (μl)
Buffer PCR 10X	1X	5
MgCl ₂ 50 mM	1.5 mM	1,5
dNTPs	0.2 mM	1
HA-1f RNA 10μM	0.2 μM	1
HA-1r RNA 10 μM	0.2 μM	1
cDNA*		2
Taq DNA pol 5 U/ μl	2.5 U	0,5
AGUA		38

* muestra puede provenir directamente de una colonia de cultivo sin realizar RT-PCR.

Colocar en Programa HA-1 (RNA)

Iniciación	5' a 95° C	} 30 ciclos
Denaturación	30'' a 95° C	
Alineamiento	60'' a 55° C	
Extensión/Elongación	60'' a 72° C	
Extensión final. 10' a 72° C. Dejar a 4° C		

viii. Electroforesis en gel de agarosa

Reactivos

Agarosa para biología molecular marca Wincler - TBE 1X (se utiliza TBE 10X marca Wincler) Agua Destilada - Bromuro de Etidio 10 mg/ml - Buffer de Tinción 6X – Estándar

Equipo

Cámara de electroforesis horizontal marca Bio JSP

Fuente de poder marca Consort E832

Microondas

Transiluminador luz UV marca Spectroline® TC 365R

Cámara Digital/Programa Picasa 3

Método

Agarosa al 2%: se agrega 1 gr. de agarosa + 50ml de TBE 1X y se disuelve en calor por microonda hasta obtener una solución homogénea transparente. Luego, se agrega 2.5 µl de Bromuro de etidio y se mezcla.

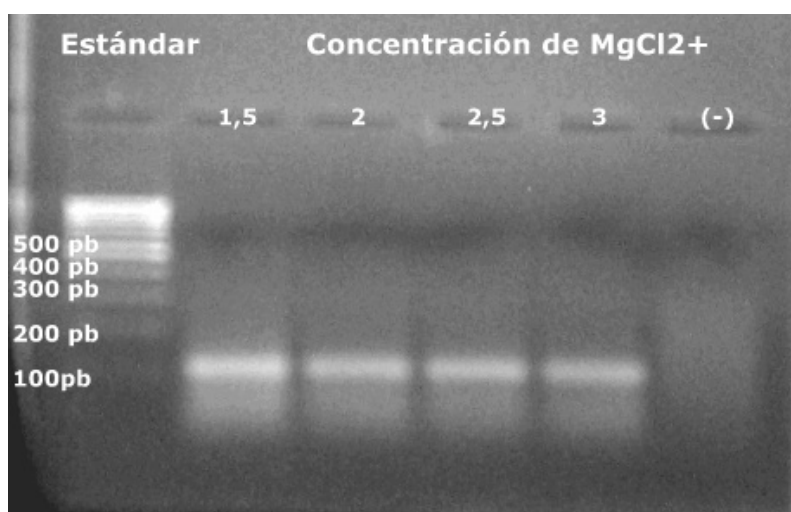
Luego se monta en la cámara de electroforesis horizontal y se deja polimerizar por 20 minutos. Luego se procede a cargar las muestras en cada pocillo del gel (2ul de Buffer de tinción y 10 ul de muestra), posteriormente se conecta a la fuente de poder y permanecerá conectado durante 30 minutos a 80 volts, para luego ser leído en el Transiluminador y obtener una imagen del gel.

ix. Estandarización de MgCl₂ para PCR

Se realizó una PCR de HA-1 mRNA con diferentes concentraciones de Cloruro de Magnesio (MgCl₂)

Concentración MgCl ₂					
	1	2	3	4	5
MgCl ₂	1.5 µl	2.0 µl	2.5 µl	3.0 µl	0 µl
Tampon 10x	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
HA-1 right	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
HA-1 left	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
dNTPs	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
cDNA	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
H ₂ O	38 µl	37.5 µl	37 µl	36.5 µl	38.5 µl
TaqPol	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl

Figura 4.- Diferentes concentraciones de MgCl₂ para PCR convencional



x.Clonamiento

Reactivos

Acetato de Sodio (EtOH – Na – Glicógeno) - Vector PGEM - Buffer 2X Rapad ATP – Ligasa - Agua DEPC - Bacterias PH5 alfa E.coli - Medio SOC - Placas LBE + Ampicilina - IPTG 100mM - XGAL 50 mg/ml - Kid comercial Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System - solución resuspensión celular - Solución de lisis celular - Solución Proteasa alcalina - solución neutralizadora - solución de lavado (adicionado con etanol) - Buffer de restricción- Endonucleasa Eco RI.

Materiales

KidUltra free-DA/ columna Millipore - Tubos eppendorff 1.5 ml - Pipetas p1000, p200, p100, p10 - Puntas para pipetas p1000, p200, p100, p10 - Spin Column

Equipos

Centrífuga eppendorff

Método

Purificación del producto de PCR: Para obtener el producto de PCR correspondiente al transcrito de HA-1 desde el gel de agarosa, se utilizó el Kit comercial "KidUltra free-DA / columna Millipore" (Promega). Las muestras (colonias 1 y 2), fueron corridas electroforéticamente, y luego la banda de 103 pares de bases fue cortada del gel con un bisturí y fueron depositadas en una columna Millipore, la que fue centrifugada a 13.200 rpm por 10 minutos. El filtrado obtenido (100 µl) se precipita con acetato de Sodio en el siguiente orden:

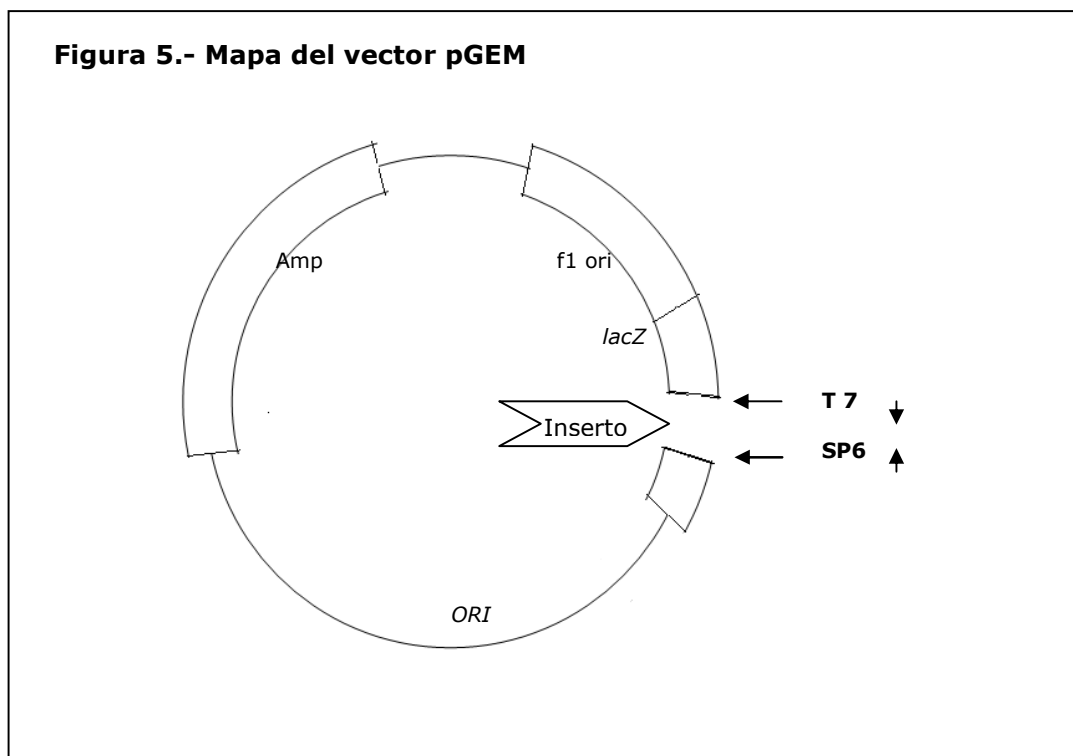
Reactivo	EtOH	Na	Glicógeno
Volumen del filtrado	2 volúmenes	por 1 volumen	por 1 µl por volumen de
	volumen de filtrado	volumen de filtrado	filtrado obtenido
	obtenido	obtenido	

Dejar a -20°C por 12 horas (toda la noche)

Ligamiento: Desde el precipitado incubado a -20°C se extrae un volumen de 2µl desde el tubo 1 y 3 del tubo 2. Se lleva a cabo la ligación del DNA obtenido con el vector:

Reactivo	Tubo 1	Tubo 2
Vector PGEM	1 µl	1 µl
Buffer 2X Rapad ATP	5 µl	5 µl
Ligasa	1 µl	1 µl
HA-1 (precipitado)	2 µl	3 µl
H ₂ O	1 µl	0 µl

Utilizando pGEM®-T Easy Vector: en este mapa se esquematizan los puntos de secuencia del sitio de inicio de transcripción de polimerasa RNA T7, espacio del inserto que se desea clonar, el sitio de inicio de transcripción de polimerasa RNA SP6, gen de resistencia a antibiótico Amp, lacZ que codifica la región N-terminal de la enzima B-galactosidasa y ORI que el lugar de origen de la replicación del DNA.



Transfección: A las bacterias PH5 alfa E.coli se les agrega el producto ligado se espera 30 minutos.

Se lleva a 42°C por 1 minuto 30 segundos

Se deja en hielo inmediatamente

Luego se agrega medio SOC 90 µl y se deja 1 hora a 37°C.

Se centrifuga a 3000 rpm por minutos, el pellet obtenido se siembra en la placa.

Procede a plaquear (Previamente las placas son preparadas con medio LBE el cual se compone de NaCl, triptona como fuente de nitrógeno, extracto de levadura, ajustado a pH 7.3 y H₂O, + Ampicilina, antes de sembrar las bacterias se le agrega a la placa 100 µl IPTG (100mM) y 100 µl de XGAL (50 mg/ml)).

PCR de las colonias bacterianas: Para comprobar si las bacterias fueron transfectadas con el vector que contiene la región HA-1 se realizó una selección de las colonias blancas y azules obtenidas de la placa. La colonia fue directamente tomada del cultivo como muestra para su identificación en una PCR convencional (anexo vi).

Purificación del Plasmidio: Kit comercial Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System

a) Centrifugación (Limpieza de la cepa)

Tomar 1-10 µl del Pellet de colonia cultivada por 5 minutos

Resuspender el pellet con 250 µl de solución resuspensión celular

Adicionar 250 µl Solución de lisis celular a cada muestra y agitar suavemente por inversión 4 veces, mezclando

Adicionar 100 µl de Solución Proteasa alcalina, agitar 4 veces mezclando suavemente e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente

Adicionar 350 µl de solución neutralizadora, agitar 4 veces.

Centrifugar a 13.200 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.

b) Obtención del plasmido DNA

Insertar Spin Column dentro del tubo de colección

Colocar todo el contenido del tubo dentro de la Columna Spin

Centrifugar a 13.200 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente

Descartar el filtrado del tubo de recolección y reinsertar la columna Spin dentro del tubo de colección

c) Lavado

Adicionar 750 μ l de solución de lavado (adicionado con etanol). Centrifugar por 1 minuto. Volver a descartar el filtrado y reinsertar la columna Spin dentro del tubo de colección

Repetir el paso 10 con 250 μ l de solución de lavado

Centrifugar a 13.200 rpm por 2 minutos.

d) Elusión

Transferir la Columna Spin a un tubo de 1.5 ml estéril

Adicionar 50 μ l de agua libre de nucleasas a la columna Spin. Centrifugar a 13.200 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente.

Descartar la columna Spin y el DNA filtrado resuspenderlo a -20°C.

Protocolo Digestión EcoRI: A partir del plasmidio obtenido de las colonias se prosigue el siguiente protocolo; en un tubo se pipetea sucesivamente los siguientes componentes de la reacción:

Muestra plasmidio eluído	8 μ l
Buffer de restricción	1 μ l
Endonucleasa Eco RI	1 μ l

Incubar a 37°C durante un mínimo de 2 horas

Prepara un gel de agarosa al 2% (anexo vii) para luego cargar las reacciones al finalizar la incubación:

Muestra plasmidio colonia	del según 1	Plasmidio colonia 1	Plasmidio colonia 4	Plasmidio colonia 6	Plasmidio colonia 12
Muestra	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl
Buffer para Eco RI (restricción)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Eco RI	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl

PCR para secuencias del vector

Reactivo	Volumen por muestra
Tampón PCR 10X	5 µl
MgCl ₂ 50 mM	1.5 mM
dNTPs	1 µl
T7	1 µl
SP6	1 µl
Templado	2 µl
Taq DNA Pol	0.5 µl
H ₂ O	39 µl

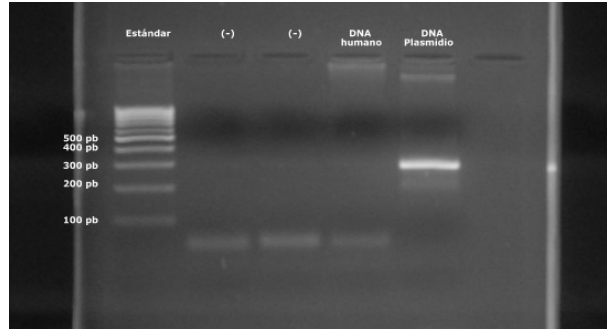
Colocar en Programa PLASM

Iniciación	5' a 94° C	} 30 ciclos
Denaturación	45'' a 94° C	
Alineamiento	45'' a 55° C	
Extensión/Elongación	1' a 72° C	

Extensión final. 10' a 72° C. Dejar a 4° C

Electroforesis: Correr los productos de PCR un gel de Agarosa al 1.5 % (anexo vi)

Figura 6.- Gel de agarosa para secuencia del mRNA de HA-1



Cuantificación Plasmidio por Espectrofotometría (λ 260/280). Equipo Espectrofotómetro marca Jenway modelo 6405 UV/Vis

Plasmidio	260 (nm)	280 (nm)	Ratio	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)
Clon 1	0.021	0.016	1.34	1.05
Clon 6	0.014	0.007	2.15	0.7
Clon 12	0.013	0.008	1.68	0.65

La concentración de DNA es de 50 ($\mu\text{g/ml}$) equivalente a 1 Densidad Optica (DO). Lo que nos da una pauta para preparar concentraciones Stock de nuestros plasmidios por clon de:

Plasmidio	Concentración Inicial ($\mu\text{g/ml}$)	Volumen inicial (μl)	Concentración final($\mu\text{g/ml}$)	Volumen final (μ)
Clon 1	262.5	8	10	184
Clon 6	175	8	10	140
Clon 12	162.5	10	10	163

$$10 \text{ } \mu\text{g/ml} \longrightarrow 10 \text{ ng}/\mu\text{l} \longrightarrow 1 \times 10^{-8} \text{ grs}$$

$$1 \times 10^{-8} \text{ grs} \longrightarrow 3100 \text{ pb}$$

$$X \longrightarrow 103 \text{ pb}$$

$$X = 0.033 \times 10^{-8} \text{ grs}$$

Para el cálculo del número de moléculas utilizamos la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{Moléculas} = \frac{\text{masa} \times \text{N}^\circ \text{avogadro}}{\text{PM base} \times \text{Largo templado}}$$

$$\text{PM base} \times \text{Largo templado}$$

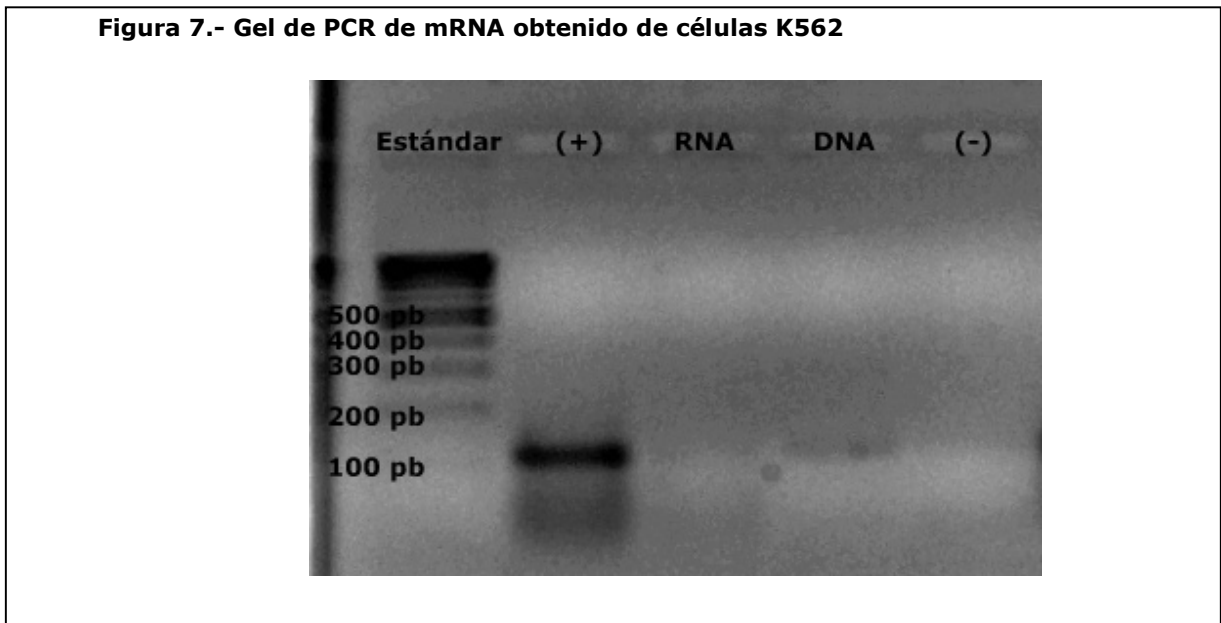
$$= \frac{0.033 \times 10^{-8} \times 6.023 \times 10^{23}}{660 \times 103}$$

$$660 \times 103$$

$$= 2.9 \times 10^9 \text{ moléculas}$$

xi. Resultados del clonamiento de mRNA de HA-1

Se evaluó la presencia de HA-1 previo clonamiento mediante PCR convencional utilizando los partidores creados para Q-PCR, donde se encontró una banda difusa con una muestra de DNA proveniente de células K562 y negativa con RNA utilizado como control de la técnica (Figura 7). Posterior al cultivo se obtuvieron colonias de E.coli transfectadas con el segmento de HA-1, según los resultados de la PCR convencional.



El clonamiento obtenido del cultivo que se realizó por 48 horas, mostró que el 100% de las colonias estudiadas fueron transfectadas con el inserto (Figura 8). La banda obtenida de 103 pares de bases refleja que está presente la secuencia de mRNA HA-1 requerida

para Q-PCR.

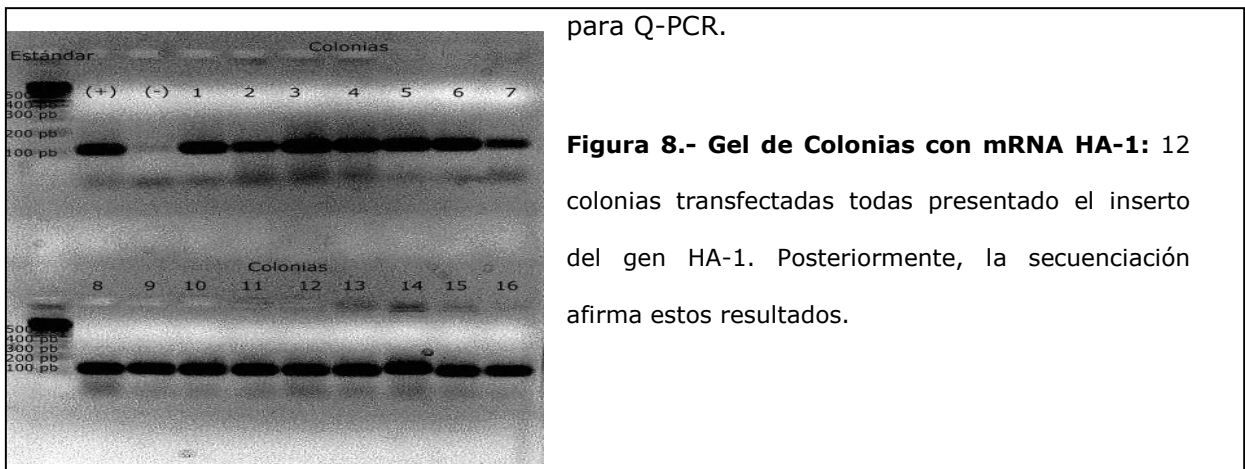
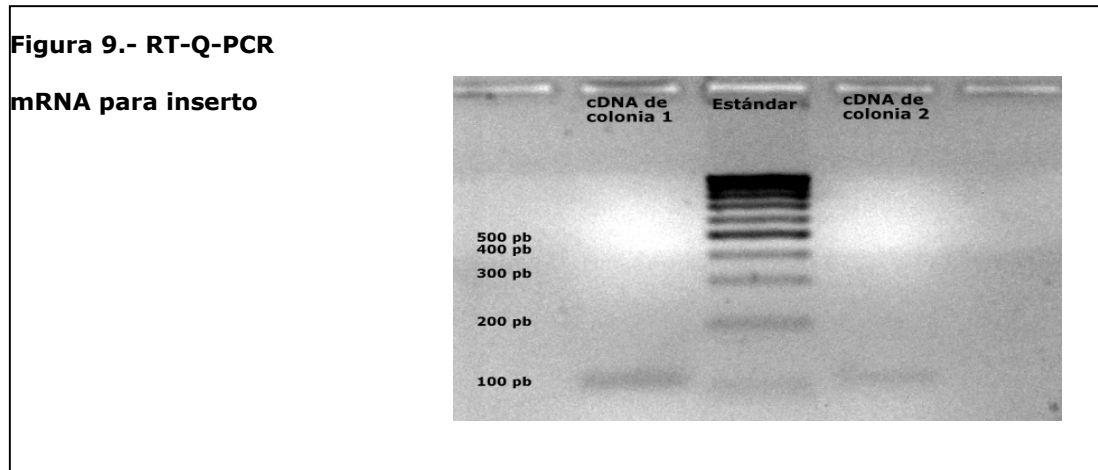
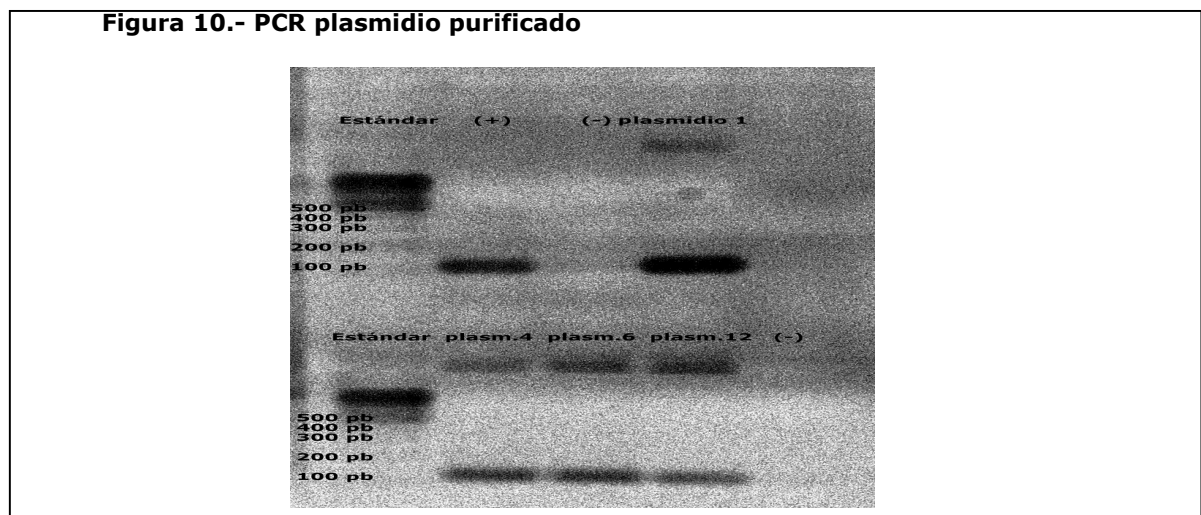


Figura 8.- Gel de Colonias con mRNA HA-1: 12 colonias transfectadas todas presentaron el inserto del gen HA-1. Posteriormente, la secuenciación afirma estos resultados.

Se seleccionaron las colonias 1 y 2 para probar los partidores de la Q-PCR, la cual amplifica una banda de 103 pares de bases.

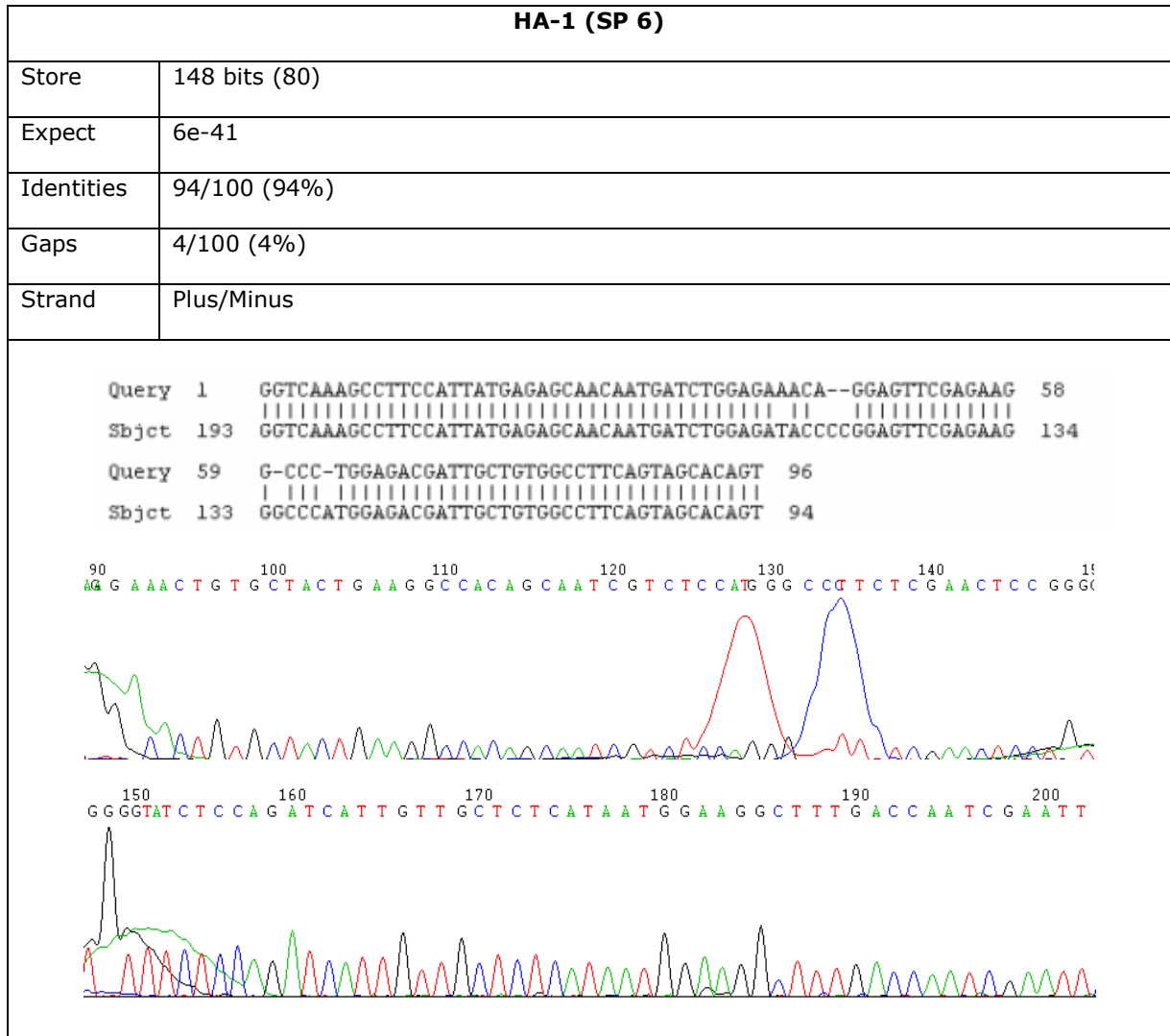


Secuenciación del plasmidio purificado: Se envió a secuenciar el plasmidio con el inserto para identificar presencia del mRNA de HA-1 en la secuencia del plasmidio. Previamente realizamos una digestión con enzimas de restricción con las secuencias T7 y SP6, en el gel de corrida se observó una banda de 269 pares de bases (datos no mostrados).



La secuencia utilizada del gen que codifica para el antígeno HA-1 es la siguiente:

**GGTCAAAGCCTTCCATTATGAGAGCAACAATGATCTGGAGAAACAGGAGTTCGAGAAGGCCCTGGA
GACGATTGCTGTGGCCTTCAGTAGCACAGTGTCCGAGTTCCTCATGGGTGAAGTG**



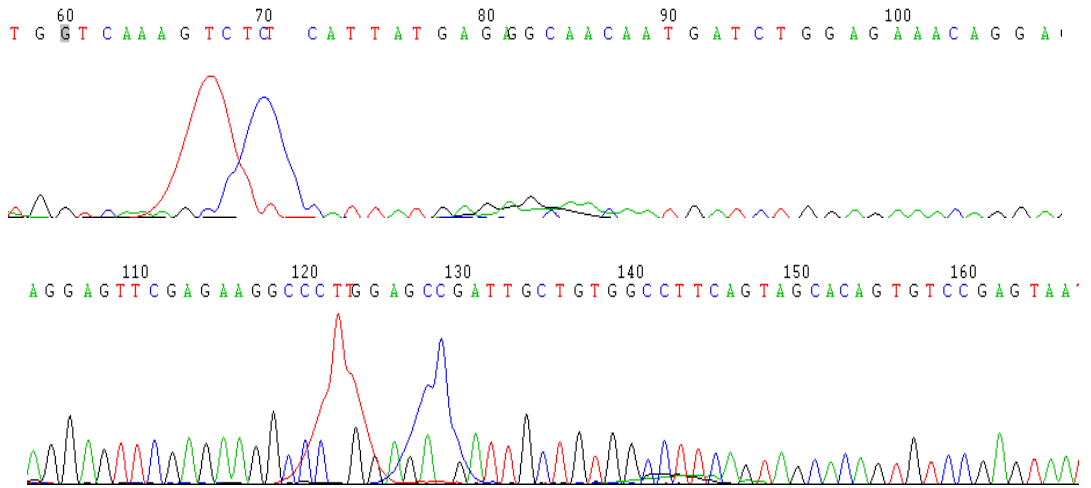
HA-1 (T-7)	
Score	159 bits (86)
Expect	6e-44
Identities	100/106 (94%)
Gaps	4/106 (3%)
Strand	Plus/Plus

```

Query 1  GGTCAAAGCCTTC-CATTATGAGA-GCAACAATGATCTGGAGAAACAGGAGTTCGAGAAG  58
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 59  GGTCAAAGTC-TCTCATTATGAGAGGCAACAATGATCTGGAGAAACAGGAGTTCGAGAAG  117

Query 59  GCCCT-GGAGACGATTGCTGTGGCCTTCAGTAGCACAGTGTCCGAG  103
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 118 GCCCTTGGAGCCGATTGCTGTGGCCTTCAGTAGCACAGTGTCCGAG  163

```



xii.PCR Cuantitativa

Diseño de Partidores: Obtener la secuencia mRNA del antígeno HA-1 desde el programa <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/40807044>, luego se selecciona una secuencia según los siguientes criterios en el programa *Primer3*:

- Especificidad de secuencia
- Primer usualmente posee 16-28 nucleotidos de largo.
- Contenido de GC entre 35 -65%
- Alta complejidad genética

Nombre de la secuencia	Secuencia
HA-1 Sonda (total nmol 19.27)	5´d FAM-CAGGAGTTCGAGAAGGCCCTGGA-BHQ-1 3´
HA-1 right (total nmol 59.97)	5´d ACTCGGACACTGTGCTACTGAA 3´
HA-1 left (total nmol 55.02)	5´d GGCAAAGCCTTCCATTATGAG 3´

Se reconstituye el liofilizado de cada primer de acuerdo al siguiente cuadro:

Nombre de la secuencia	Total nmol	Volumen de agua bidestilada/estéril	concentración final
HA-1 sonda	19.27	385 µl	50 µM
HA-1 right	59.97	120 µl	500 µM
HA-1 left	55.02	110 µl	500 µM

Luego, se procede a diluir cada primer:

Secuencia	Concentración inicial	Volumen inicial	Concentración final	Volumen final
HA-1 sonda	50 µM	20 µl sonda+180µl H ₂ O	5 µM	200 µl
HA-1 right	500 µM	4 µl primer+196µl H ₂ O	10 µM	200 µl
HA-1 left	500 µM	4 µl primer+196 µl H ₂ O	10 µM	200 µl

Q-PCR Concentración Templado: un exceso de templado inhibirá la reacción, por lo que 100ng de cDNA humano en 20µl reacción es normalmente suficiente (datos del laboratorio de Terapia Celular del Hospital Clínico de la UCh). Condiciones SensiMix Life:

Componente	Volumen (µl)	Concentración Final
5x SensiMix Life	4 µl	1x
Mix Enzima	1.5 µl	
50x SYBR Green solution	0.4 µl	1x
(vortex por 30 sec después del uso)		
Primer Forward (10µM)	0.4 µl	200nM
Primer Reverse (10µM)	0.4 µl	200nM
DNA templado	2 µl	
dH2O	11.3 µl	
Volumen Total	20 µl	

Protocolo de RT-PCR para obtención de mRNA:

Reactivo	Volumen por muestra
Tampón PCR 10X	5 µl
MgCl ₂ 50 mM	2.0 µl
DNTPs	1 µl
P1 rev actina	1 µl
P2 forwards actina	1 µl
cDNA/muestra	2 µl
Taq Pol	0.5 µl
H ₂ O	38.1 µl

PCR cuantitativa HA-1:

Reactivo

Sensimix Life (Buffer, MgCl₂, dNTPs) – Enzima - Partidores reverse, forward y sonda desarrollados en el anexo vii - Agua DEPC

Materiales

Tubos eppenforf 0.2ml (libre de DNAsas/RNAsas) – Puntas y pipetas p200, p10, p50, p20)

Equipo

Agitador

Stratagene/ Programa MxPro

Método

Control positivo se utiliza RNA de K562, previa transcripción reversa con el programa anterior.

Reactivos	Volumen (µl)
Sensimix Life (Buffer, MgCl ₂ , dNTPs)	4 µl
Enzima	1.5 µl
Primer Reverse	0.6 µl
Primer Forward	0.6 µl
Sonda 5 µM	1 µl
H ₂ O	10.5 µl
Muestra	2 µl

Dilución del Plasmidio con Agua DEPC:

Concentración del plasmidio	Volumen final
Plasmidio 1/10 ³	2 µl

Plasmidio 1/10 ⁴	2 µl
Plasmidio 1/10 ⁵	2 µl
Plasmidio 1/10 ⁶	2 µl
Plasmidio 1/10 ⁷	2 µl
Plasmidio 1/10 ⁸	2 µl
Plasmidio 1/10 ⁹	2 µl

Programa PCR Real Time en Stratagene

Iniciación/Hold		95°C	10´	
Cycling	Denaturación	95°C	10´´	} 45 ciclos
	Alineamiento	60°C	20´´	
	Extensión	72°C	10´´	
Cooling		40°C	30´´	

xiii.Tabulación de datos

CODIGO PACIENTES	COPIAS HA-1	COPIAS GUS	HA-1/GUS	CONDICION CLINICA
BM002	2,83E+05	9,31E+05	3,04E-01	DG
BM030	3,16E+04	2,39E+05	1,32E-01	DG
BM033	2,59E+04	1,08E+05	2,39E-01	DG
BM040	1,17E+03	7,30E+03	1,60E-01	DG
BM047	2,19E+04	2,92E+04	7,51E-01	DG
BM054	6,77E+04	1,77E+04	3,82E+00	DG
BM068	3,05E+05	3,97E+05	7,69E-01	DG
BM070	1,28E+05	3,74E+05	3,41E-01	DG
BM072	1,31E+05	2,56E+05	5,13E-01	DG
BM088	6,84E+03	2,15E+04	3,18E-01	DG
BM102	8,83E+04	3,48E+05	2,54E-01	DG
BM173	2,16E+05	1,34E+05	1,61E+00	DG
BM225	9,74E+04	9,43E+05	8,58E-02	DG
BM234	4,55E+04	2,91E+04	1,56E+00	DG
BM69	1,20E+05	3,19E+05	3,76E-01	DG
R07	5,29E+04	3,98E+05	1,33E-01	DG
R39	1,52E+05	6,56E+05	2,31E-01	DG
BM009	1,37E+05	2,36E+05	5,82E-01	RMMe
BM014	1,10E+05	2,93E+05	3,75E-01	RMMe
BM084	1,57E+04	2,46E+05	6,38E-02	RMMe
BM107	8,57E+04	2,65E+05	3,23E-01	RMMe
BM134	2,31E+04	6,76E+05	3,42E-02	RMMe
BM205	8,10E+04	5,11E+04	1,58E+00	RMMe
BM242	4,43E+05	1,35E+06	3,29E-01	RMMe
BM249	5,28E+04	3,70E+04	1,43E+00	RMMe
R11	9,15E+04	5,73E+05	1,60E-01	RMMe
R17	9,62E+04	4,47E+05	2,15E-01	RMMe
R19	1,79E+05	5,93E+05	3,02E-01	RMMe
R22	2,11E+05	3,46E+05	5,17E-01	RMMe
R23	2,60E+05	4,01E+05	4,69E-01	RMMe
R25	5,63E+04	4,10E+05	1,37E-01	RMMe
R26	1,47E+05	6,22E+05	2,37E-01	RMMe
R28	2,41E+05	1,22E+06	1,98E-01	RMMe
R30	1,07E+05	4,90E+05	2,18E-01	RMMe
R32	1,96E+05	5,27E+05	4,57E-01	RMMe
R37	1,50E+05	1,66E+04	9,06E+00	RMMe
BM116	1,62E+05	1,92E+05	8,44E-01	RMC
BM150	2,45E+05	3,40E+08	4,76E-04	RMC
BM245	2,91E+04	3,80E+05	7,67E-02	RMC
BM250	1,81E+05	1,98E+06	9,15E-02	RMC
BM253	9,48E+04	1,15E+06	8,24E-02	RMC
R05	9,20E+04	1,49E+05	6,17E-01	RMC
R06	1,00E+04	6,68E+05	1,50E-02	RMC
R21	1,88E+05	7,37E+05	2,55E-01	RMC
R24	1,07E+05	3,75E+05	2,86E-01	RMC
R40	9,17E+03	9,59E+05	9,57E-03	RMC
R41	7,86E+03	1,23E+05	6,40E-02	RMC
R42	1,17E+04	1,04E+05	1,13E-01	RMC

DG = Diagnóstico - RMMe = Remisión Molecular Menor - RMC= Remisión Molecular Completa

CODIGO DONANTES	COPIAS HA-1	COPIAS GUS	HA-1/GUS	RANGO ETAREO
32	3,96E+06	2,40E+06	1,65E+00	1
34	8,23E+05	4,91E+05	1,68E+00	1
37	1,70E+07	9,18E+06	1,85E+00	1
44	1,19E+07	8,34E+06	1,43E+00	1
46	3,70E+06	1,15E+06	3,22E+00	1
48	1,40E+07	7,63E+06	1,83E+00	1
49	1,33E+07	1,34E+07	9,95E-01	1
50	2,50E+07	1,20E+07	2,08E+00	1
51	1,54E+05	2,64E+06	5,85E-02	1
1	4,84E+05	1,63E+05	2,97E+00	2
4	1,10E+07	8,40E+06	1,31E+00	2
5	5,33E+05	2,86E+05	1,86E+00	2
6	1,23E+05	1,69E+04	7,25E+00	2
7	2,79E+04	1,31E+03	2,13E+01	2
8	3,49E+07	3,52E+06	9,92E+00	2
9	5,32E+05	2,34E+05	2,27E+00	2
12	1,11E+07	7,43E+06	1,49E+00	2
16	1,27E+07	5,06E+06	2,51E+00	2
18	7,08E+05	6,86E+05	1,03E+00	2
19	1,91E+07	6,57E+06	2,90E+00	2
20	1,91E+07	6,09E+06	3,13E+00	2
21	2,03E+07	1,27E+07	1,60E+00	2
22	9,69E+06	5,69E+06	1,70E+00	2
23	2,67E+07	1,05E+07	2,55E+00	2
24	1,21E+07	8,12E+06	1,49E+00	2
26	3,39E+07	1,30E+07	2,61E+00	2
28	5,69E+07	1,22E+07	4,66E+00	2
29	2,06E+07	1,22E+07	1,69E+00	2
30	1,96E+07	2,70E+06	7,27E+00	2
31	6,89E+06	7,53E+06	9,15E-01	2
40	1,48E+07	7,74E+06	1,91E+00	2
41	7,09E+06	7,35E+05	9,65E+00	2
42	8,32E+06	8,06E+06	1,03E+00	2
2	5,20E+05	1,27E+04	4,10E+01	3
3	1,46E+06	3,60E+04	4,06E+01	3
10	1,46E+07	6,39E+06	2,28E+00	3
11	1,07E+06	1,11E+04	9,61E+01	3
13	1,02E+06	2,28E+05	4,45E+00	3
14	4,66E+06	2,70E+06	1,72E+00	3
15	5,46E+05	1,00E+04	5,46E+01	3
25	2,88E+07	8,75E+06	3,29E+00	3
27	2,38E+07	8,23E+06	2,89E+00	3
33	6,42E+05	3,98E+04	1,61E+01	3
35	6,72E+06	3,75E+06	1,79E+00	3
36	2,59E+07	1,37E+07	1,89E+00	3
38	5,53E+06	3,50E+06	1,58E+00	3
39	4,10E+06	3,14E+06	1,31E+00	3

CODIGO DONANTE	COPIAS HA-1	COPIAS GUS	HA-1/GUS	RANGO ETAREO
43	1,02E+07	6,01E+06	1,70E+00	3
45	1,22E+07	4,89E+06	2,49E+00	3
47	1,05E+07	7,84E+06	1,33E+00	3