



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE
ADHESIÓN Y DE MATRIZ EXTRACELULAR EN CÉLULAS
U-937 ESTIMULADAS A TRAVÉS DE LA
AMINOPEPTIDASA N (CD13)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

HERNÁNDEZ BAZÁN VIRIDIANA SUJHEY



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: María Eugenia Torres Márquez

VOCAL: Profesor: Constantino III Roberto López Macías

SECRETARIO: Profesor: Enrique Ortega Soto

1° SUPLENTE: Profesor: Perla Deyanira Maldonado Jiménez

2° SUPLENTE: Profesor: Ileana Licona Limón

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología del cual es titular el Dr. Enrique Ortega Soto, perteneciente al Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. Enrique Ortega Soto

Irma Ileana Licona Limón

SUSTENTANTE :

Viridiana Sujhey Hernández Bazán

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, con el apoyo económico de CONACYT (proyecto 80301) y de DGAPA, UNAM (proyecto 222008). Recibí una beca por parte de CONACYT (Número de becario 15652).

Agradezco a la M. en IBB. Claudia A. Garay Canales por su apoyo técnico a lo largo del desarrollo de este trabajo.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la Facultad de Química por aceptarme y brindarme una formación académica, social y personal durante todos estos años, debido a las grandes experiencias, algunas buenas y otras malas, y a las personas que cruzaron este camino conmigo, tanto amigos, conocidos y profesores.

A mis padres, por su apoyo tanto económico como moral y ¿porque no? También por aguantarme durante todo este tiempo, tanto en las buenas como en las malas. A mi hermano, quien a pesar de que nos peleamos, insultamos, gritamos, etc., etc., etc., siempre ha estado para apoyarme como el buen hermano mayor que es.

Al Dr. Enrique Ortega por haberme dado la confianza y oportunidad de trabajar en su laboratorio, de igual manera a todos los demás integrantes de este laboratorio, algunos han venido y otros se han ido (Iraís, Aurora, Clau "la madre académica del lab", Raymundo, Lupe, Sergio, Natalia, la sra. Raquel, etc.) ya que por muy pequeño que sea todos me ayudaron a que el proyecto fuera posible y sobretodo a Ileana que se tomó la molestia de ser mi supervisora técnica. A "Ana" Diana que llegó conmigo al lab y juntas hemos luchado por permanecer en el a lo largo de todo este tiempo.

A mis compañeros y amigos que estuvimos juntos en la Facultad a pesar de ser de distintas carreras, desde el primer semestre hemos mantenido la amistad junto a otros que fueron llegando y otros que se han alejado pero se recuerdan, formamos ese gran grupo de amigos que siempre nos apoyamos tanto para reír como para solucionar problemas ya fueran académicos o simplemente sociales, es decir a todos los integrantes del "hospicio" (Lalo, Joel, Diana Betsabé, Wicho, Vivi, Tomás, Sam, Josué, Zup, Carlini, Mairoslav, Karla (ahh ojo niños! Jaja), Editzia Chesperta, Monse, Laura, Bochm, Diana Leticia, Angie, Susy, Macedo, Rodolfo, Rojo, Torta, Aspiazu, Hugo, Hugo el oso,

Julio, supongo que me faltará alguien seguramente pero bueno básicamente la lista es casi infinita jaja).

A aquellos que sufrieron la carrera de QFB conmigo durante clases: Piby, Laura, Zup, Josué, Sam, Pauuu (samy y pua como olvidar el 4444 y 1111 jaja), Diana, Iván, Lucoca, Narda, Arely, Isaac, Viry Jefa, el cuña!, chiva, Oscar "pervers", Lucio, Iztli, Esteban, Bostik bla bla bla).

A Pauuuu, Saaam, Viri zup, Josué, Piby, Laura, Carli que hemos llegado a ser como una gran familia!

Indice

1. Marco Teórico -----	8
1.1. Adhesión celular -----	12
1.1.1 <i>Integrinas</i> -----	14
1.1.2. <i>Selectinas</i> -----	16
1.1.3. <i>Cadherinas</i> -----	17
1.1.4. <i>Superfamilia de las Inmunoglobulinas</i> -----	18
1.2. Matriz Extracelular -----	20
1.2.1. <i>Colágenas</i> -----	21
1.2.2. <i>Fibronectinas (FN)</i> -----	22
1.2.3. <i>Lamininas</i> -----	22
1.2.4. <i>Metaloproteinasas de matriz (MMPs)</i> -----	23
1.2.5. <i>Otras moléculas</i> -----	24
1.3. Aminopeptidasa N/ CD13 -----	24
2. Antecedentes -----	30
3. Planteamiento del problema -----	32
4. Hipótesis -----	32
5. Objetivo -----	33
5.1. Objetivos particulares -----	33
6. Materiales y Métodos -----	34
6.1. Cultivo celular -----	34
6.2. Anticuerpo -----	34
6.3. Metodología para el análisis de la expresión de 84 genes codificantes para moléculas implicadas en procesos de adhesión por medio de un arreglo para PCR en tiempo real ----	34
6.3.1 <i>Ensayos de agregación homotípica</i> -----	34
6.3.2. <i>Extracción de ARN</i> -----	35
6.3.3. <i>Purificación de ARN</i> -----	37
6.3.4. <i>Tratamiento con DNasa</i> -----	38
6.3.5. <i>Síntesis de cDNA</i> -----	39
6.3.6. <i>PCR en tiempo real</i> -----	39

6.4. Metodología para el análisis de los genes CNTN1, COL6A2 y MMP10 por PCR en tiempo real -----	41
6.4.1. <i>Diseño de cebadores o iniciadores</i> -----	41
6.4.2. <i>Estandarización y rango dinámico</i> -----	43
6.4.3. <i>Rango dinámico con pre-amplificación</i> -----	45
6.4.4. <i>Ensayos de agregación homotípica</i> -----	47
6.4.5. <i>Extracción de ARN</i> -----	47
6.4.6. <i>Síntesis de cDNA</i> -----	48
6.4.7. <i>PCR en tiempo real</i> -----	48
6.5. Inhibición de síntesis de proteínas con cicloheximida-----	49
7. Resultados -----	52
7.1. Agregación homotípica de células U-937 -----	52
7.2. Obtención de ARN -----	54
7.3. Expresión de 84 genes codificantes para moléculas implicadas en procesos de adhesión -----	57
7.4. Expresión génica de MMP10, CNTN1 y COL6A2 en células U-937 estimuladas con anti-CD13 -----	67
7.4.1. <i>Estandarización del método de pre-amplificación</i> -----	67
7.4.2. <i>Cinética de la expresión de COL6A2, CNTN1 y MMP10 cuando se entrecruza a CD13</i> -----	70
7.5. Inhibición de la síntesis de proteínas con cicloheximida --	71
8. Discusión -----	73
9. Conclusión -----	80
10. Referencias -----	81
11. Anexos -----	86
11.1. Anexo I (PCR en tiempo real) -----	86
11.2. Anexo II (Temperaturas de disociación) -----	88
11.3. Anexo III (Preparación de soluciones) -----	92

1. Marco Teórico

El sistema inmune se compone por una gran variedad de tipos celulares (principalmente leucocitos) que cumplen distintos papeles en los mecanismos de defensa del cuerpo contra infecciones por microorganismos patógenos. Para cumplir de manera eficiente las funciones de defensa, las células del sistema inmune colaboran entre ellas y con células de otros tejidos u órganos. Esta colaboración puede requerir interacciones directas (contacto célula-célula) o bien estar mediada por moléculas solubles como citocinas u otros factores que ayudan a montar una respuesta inmune efectiva para la eliminación de patógenos o células infectadas.

Dentro de las células que participan en los mecanismos de defensa, las células del sistema fagocítico-mononuclear (monocitos, macrófagos, células dendríticas y sus precursores) son leucocitos que juegan papeles muy importantes, tanto como células efectoras (monocitos y macrófagos), como por ser las células dendríticas esenciales para el inicio de una respuesta inmune adaptativa.

Las células de este linaje, al igual que todas las células sanguíneas (eritrocitos, leucocitos y plaquetas), se originan a partir de un precursor hematopoyético pluripotencial mediante un proceso que se denomina hematopoyesis. Este proceso se lleva a cabo en la médula ósea, y durante el mismo la célula hematopoyética pluripotencial, dependiendo de las condiciones (citocinas y factores de crecimiento presentes en el microambiente) tiene la capacidad de autorenovarse y también de diferenciarse para dar origen a dos precursores principales: el progenitor linfoide y el progenitor mieloide. El progenitor linfoide da origen a linfocitos B, linfocitos T y células NK, mientras que el progenitor mieloide da origen a precursores de eritrocitos, de plaquetas , de

granulocitos (eosinófilos, células cebadas y basófilos) y a un progenitor granulocito-monocito, el cual se puede diferenciar a monocito o neutrófilo (Figura 1) [34].

Los monocitos, que constituyen del 5 al 10% de los leucocitos circulantes en sangre, permanecen en circulación por varios días. Algunos monocitos de la circulación migran en condiciones basales (en ausencia de inflamación) a los tejidos en donde se pueden diferenciar a macrófagos tisulares que reciben nombres específicos dependiendo del tejido, o diferenciarse a células dendríticas residentes en los tejidos como la piel, mucosas, etc. (Figura 1) [35]. Además de esta migración basal que tiene por finalidad mantener a las poblaciones de macrófagos y células dendríticas residentes en los tejidos, los monocitos de sangre periférica también pueden migrar a tejidos en los que haya una reacción inflamatoria. Al arribar al tejido inflamado, bajo la acción de citocinas y/o productos microbianos, los monocitos se diferencian a macrófagos y se activan.

La activación de los macrófagos es un proceso complejo, y puede seguir varias vías o rutas. La activación clásica, inducida por LPS e interferón en los tejidos, aumenta su capacidad fagocítica y la producción de radicales de oxígeno y de enzimas hidrolíticas, de tal manera que estas células tienen una alta actividad fagocítica y microbicida. La activación alterna, inducida por IL-4, genera macrófagos con baja capacidad de producir radicales libres de nitrógeno y oxígeno, por lo que su actividad microbicida contra patógenos intracelulares es limitada. Sin embargo, secretan componentes de la matriz extracelular y por eso se ha sugerido que su función principal está relacionada a la reparación de daño tisular.

Los macrófagos pueden reconocer a los patógenos a través de dos tipos de receptores: receptores que reconocen directamente estructuras

del patógeno (receptores de reconocimiento de patrones) o bien a través de receptores para anticuerpos o factores del complemento (receptores para opsoninas).

Los macrófagos también son células presentadoras de antígeno, y son capaces de secretar una variedad de citocinas, quimiocinas y otros mediadores solubles como interleucina 1 (IL-1), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6), las cuales promueven una respuesta inflamatoria y son responsables de afectar el centro de regulación de la temperatura en el hipotálamo, provocando fiebre, o promueven la activación de linfocitos por IL-1. [35]

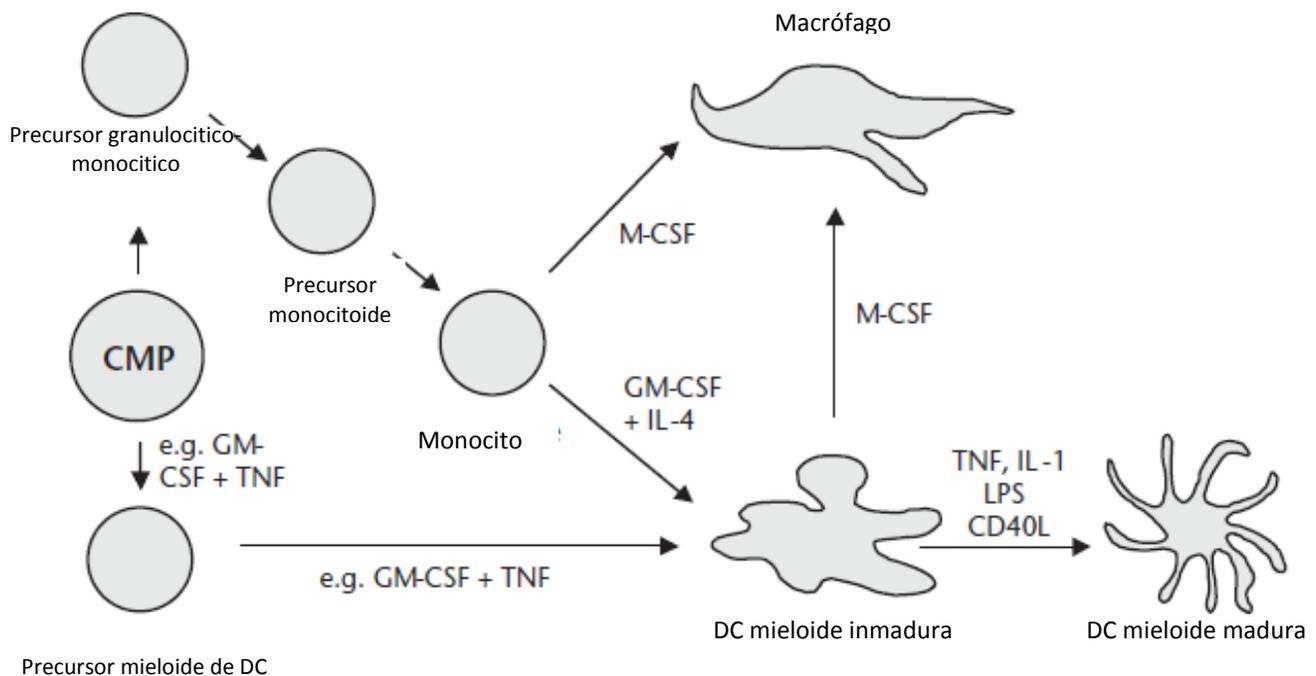


Figura 1. Relación entre monocitos, macrófagos y células dendríticas mieloides (o convencionales). El progenitor común de células mieloides (CMP) da lugar al precursor granulocito-monocito y éste a monocitos. En un ambiente con factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF) los monocitos se desarrollarán a macrófagos; por otra parte, monocitos expuestos a IL-4 y el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) genera células dendríticas mieloides inmaduras, las cuales maduran en la presencia de TNF e IL-1 o bien al contacto con un patógeno (LPS) o con células T (CD40L).

Las células dendríticas que residen en tejidos, expresan una gran cantidad de receptores de reconocimiento de patrones, y una vez que a través de estos receptores capturan el antígeno en los tejidos ya sea por fagocitosis o endocitosis, migran al órgano linfoide secundario más cercano. Durante la migración, las células dendríticas “maduran”, aumentando su expresión de moléculas del MHC de clase II y la expresión de moléculas de coestimulación (CD80 y CD86) lo que las hace capaces para la presentación de antígenos y estimular a linfocitos T naive o vírgenes.

Durante distintos procesos en los que participan las células del sistema inmune, como los mencionados anteriormente, es de gran importancia la participación de moléculas de adhesión para dirigir y fortalecer la interacción entre leucocitos o bien entre leucocitos y otros tipos celulares (Figura 2), ya que gracias a la adhesión pueden darse fenómenos como la presentación de antígeno a linfocitos T y la migración transendotelial de leucocitos. En la sinapsis inmunológica que se forma entre la célula presentadora de antígeno (CPA) y el linfocito T, están involucradas distintas moléculas de adhesión pertenecientes a la familia de las integrinas y moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas, entre otras (Figura 2).

Para que los leucocitos puedan migrar de la sangre a los tejidos, requieren atravesar el endotelio vascular, requiriendo pasar de un estado no adherente a uno en el cual puedan adherirse a las células del endotelio para después deformarse y pasar a través del espacio intercelular. Durante este proceso, la participación de distintas moléculas de adhesión puede regularse ya sea por cambios en su afinidad por su ligando sobre la otra célula (como las integrinas), o bien por el aumento de su expresión en membrana, como las selectinas y/o moléculas de la familia de las inmunoglobulinas (como ICAM-1 y VCAM-

1, que aumentan su expresión en células endoteliales), y CD44, entre otras, tanto por parte de los leucocitos como de las células endoteliales. Las interacciones entre estas moléculas hacen posible el proceso de adhesión y migración transendotelial, que involucra distintos pasos (rodamiento, activación, adhesión firme y transmigración) [8 y12].

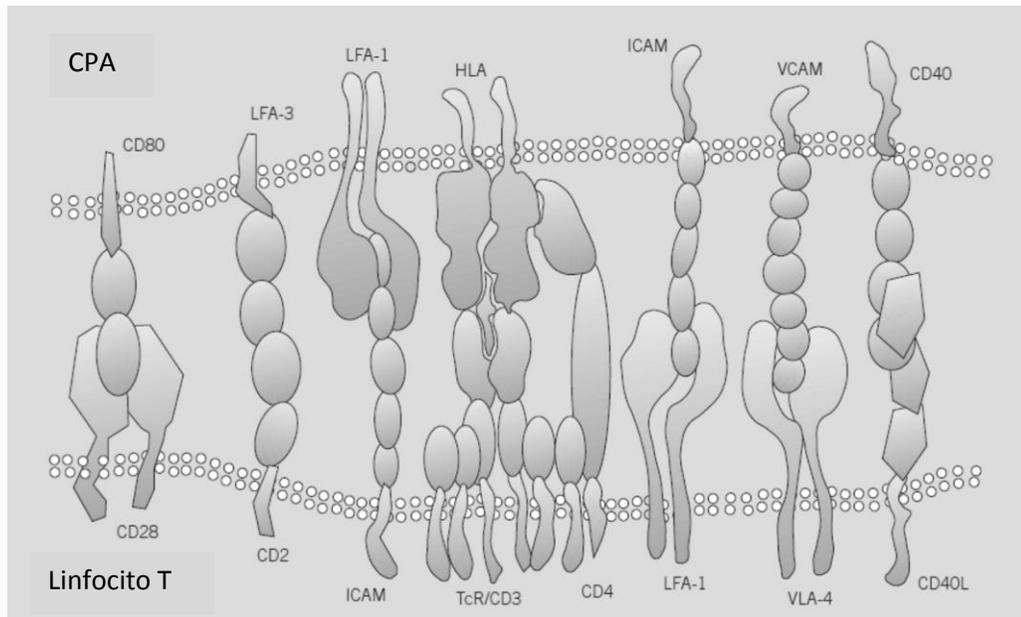


Figura 2. Representación esquemática de las interacciones entre moléculas de membrana en la sinapsis inmunológica durante la activación del linfocito T. Entre las moléculas de adhesión involucradas están las integrinas: LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$) y VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) y moléculas de la familia de las inmunoglobulinas: ICAM, VCAM [8].

1.1. Adhesión celular

El proceso de adhesión celular es el mecanismo mediante el cual se mantienen unidas dos células para poder llevar a cabo un gran número de funciones, dependiendo del tipo de células involucradas.

La adhesión puede ser homotípica o heterotípica (Figura 3), de acuerdo con las células que participen. En la adhesión homotípica

participan células del mismo tipo y en la heterotípica participan células de tipo diferente. Dependiendo de las moléculas involucradas, la adhesión puede ser homofílica cuando la interacción ocurre entre moléculas idénticas o heterofílica, cuando involucra moléculas distintas [9].

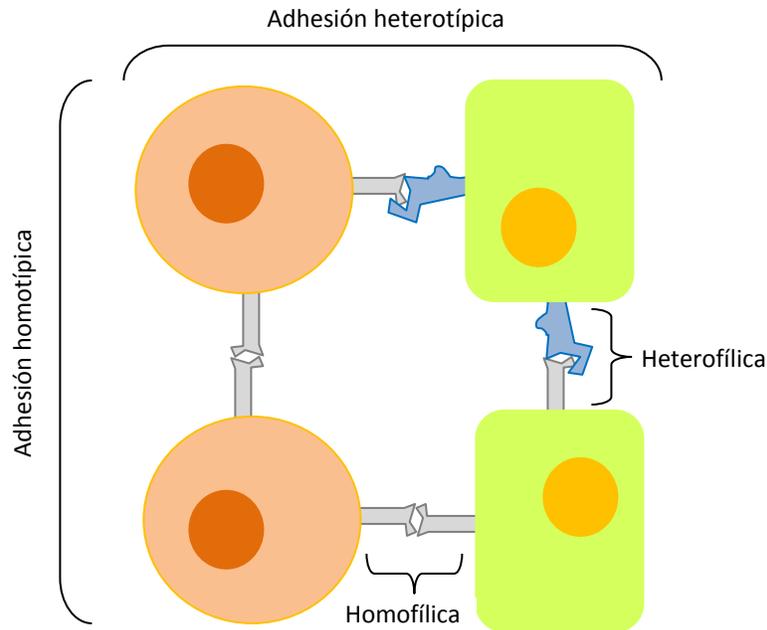


Figura 3. Tipos de adhesión dependiendo de las células y moléculas involucradas.

La adhesión celular es importante para una gran variedad de procesos, como la embriogénesis, angiogénesis y en enfermedades como el cáncer durante la metástasis y la invasividad de tumores, en los cuales la agregación homotípica es crucial. También dependen de agregación celular procesos de relevancia inmunológica como la presentación de antígeno, citotoxicidad, migración de leucocitos y fagocitosis; en estos casos se ven involucrados principalmente procesos de agregación heterotípica [27-29].

En la adhesión celular participan distintas moléculas, conocidas como moléculas de adhesión [7], las cuales pueden ser de distintas

familias (integrinas, selectinas, superfamilia de las inmunoglobulinas, cadherinas y proteoglicanos)[9]. En los siguientes párrafos mencionaremos algunas de las características principales de cada una de estas familias:

1.1.1 Integrinas

Son moléculas heterodiméricas que se componen por dos cadenas, una α y una β . Se han identificado 20 cadenas α y 9 cadenas β distintas, dando lugar a una gran variedad de heterodímeros (Figura 4) [8].

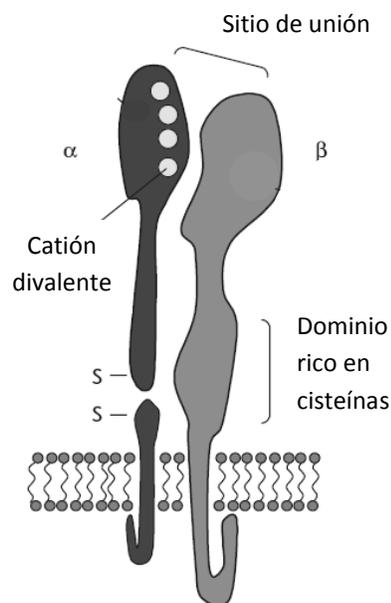


Figura 4. Representación esquemática de una integrina heterodimérica (α/β).

Las integrinas se encuentran involucradas en la morfogénesis, el mantenimiento de la homeostasis, la respuesta inmune y en procesos inflamatorios [7]. Pueden unirse tanto a distintos heterodímeros de integrinas, como a otras moléculas de adhesión y también a moléculas de la matriz extracelular.

Ambas subunidades (α y β) son proteínas transmembranales. Las colas citoplasmáticas de ambas cadenas interactúan entre sí de manera dependiente de un catión, para poder mediar las interacciones con el citoesqueleto o para la transmisión de señales al interior de la célula.

En células en reposo, las integrinas se encuentran en una conformación de baja afinidad, y pueden pasar a un estado de alta afinidad por dos mecanismos:

-Señalización de afuera hacia adentro: en este caso la integrina se encuentra en un estado de baja afinidad, al estar en contacto con su ligando, se activa y sufre un cambio conformacional pasando a su estado de alta afinidad. Este evento da pie a la activación de señales intracelulares que disparan diversos procesos como el rearrreglo del citoesqueleto o la transcripción de genes.

-Señalización de adentro hacia afuera: ocurre cuando la célula es estimulada a través de otros receptores, que inician cascadas de señalización intracelular (en las que participan PI3-K, fosfolipasa C y miembros de la superfamilia de GTPasas de RAS). La activación de estas vías induce el cambio conformacional de la integrina para pasar a su estado de alta afinidad. Un ejemplo de esto es la trombina que al estimular a plaquetas induce que la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ pase de un estado de baja afinidad a uno de alta afinidad [11 y 13].

1.1.2. Selectinas

Se han identificado tres tipos de selectinas: selectina L, selectina P y selectina E (Figura 5). Estas moléculas son proteoglicanos que en su extremo amino terminal tienen un dominio tipo lectina, que es capaz de interactuar de manera específica y dependiente de la presencia de Ca^{2+} extracelular, con carbohidratos presentes en proteínas de la superficie de otra célula [8 y 12].

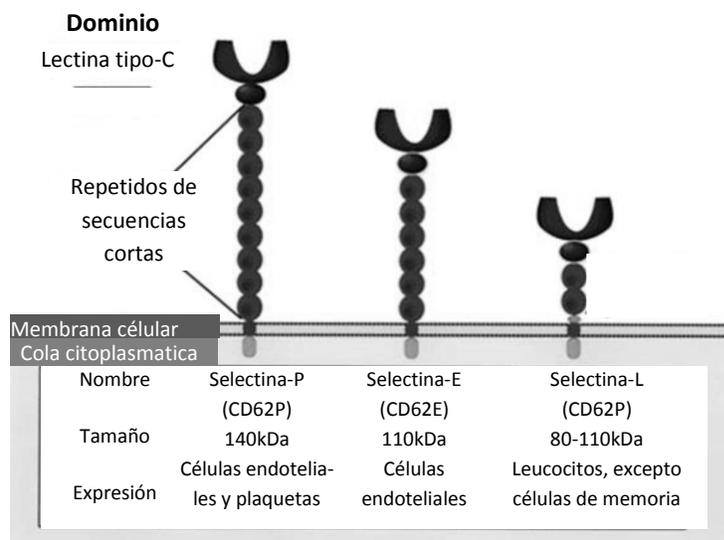


Figura 5. Selectinas. Tienen un dominio de lectina tipo-C, dependiente de Ca^{2+} , su conformación esta dada por secuencias cortas que se repiten para dar una mayor o menor elevación sobre la membrana de la célula.

La selectina L se expresa en todos los leucocitos circulantes, excepto algunas subpoblaciones de linfocitos T de memoria; su ligando por excelencia es la adreína de nódulos linfáticos periféricos (PNAd), la cual se expresa en vénulas de endotelio alto, en amígdalas y en el apéndice.

La selectina P se expresa en plaquetas y en células endoteliales y su ligando es PSGL-1 (ligando glicosilado de selectina P), el cual pertenece a la familia de las sialomucinas (mucinas que contienen ácido

siálico en su estructura de carbohidratos). La expresión de selectina E se induce en células endoteliales por IL-1 y FNT α ; esta selectina participa en la diapedesis de leucocitos hacia los tejidos, mediando el rodamiento de los leucocitos [9 y 12].

El ligando mejor caracterizado para las selectinas es un tetrasacárido de sialil-Lewis^x (sLe^x, sCD15). Dependiendo de las modificaciones que presente este carbohidrato, será su mayor o menor afinidad por los distintos miembros de la familia de las selectinas [12]. Las selectinas L y P, pueden tener estos carbohidratos y por lo tanto ser ligandos para selectina E [8].

1.1.3. Cadherinas

Las cadherinas son moléculas que en su parte extracelular contienen repeticiones de cadherina, cuya conformación es altamente dependiente de la presencia o ausencia de iones de calcio. En presencia de calcio pueden formar dímeros con otras moléculas de cadherinas presentes en células vecinas. [9]

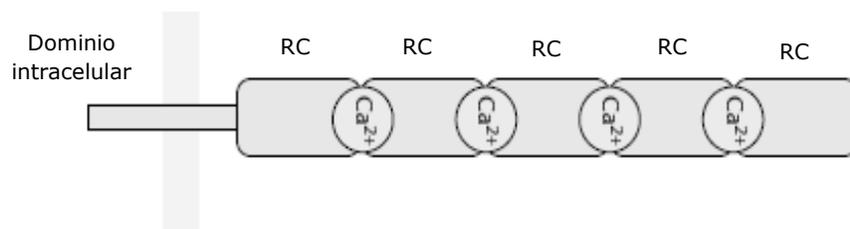


Figura 6. Esquema general de una cadherina. Su conformación es dependiente de Ca^{2+} y tienen un número variado de repetidos de cadherina (RC).

Hay tres tipos de cadherinas: las cadherinas clásicas, las protocadherinas y las cadherinas atípicas. Las cadherinas clásicas tienen cinco repetidos de cadherina en su dominio extracelular y se dividen en

dos tipos (tipo I y tipo II). Las cadherinas tipo I median una fuerte adhesión célula-célula y son cadherinas epiteliales y neuronales principalmente. Las cadherinas clásicas tipo II se encuentran principalmente en el epitelio vascular. Las protocadherinas tienen seis ó siete dominios de cadherina y se expresan mayoritariamente en el sistema nervioso. Por último, las cadherinas atípicas tienen una cantidad mayor de repetidos de cadherina, entre 27 y 34 en su dominio extracelular en comparación con los otros dos tipos.

Las cadherinas participan en la morfogénesis, mediando el reconocimiento entre células, movimientos celulares coordinados y la inducción y el mantenimiento de la estructura, la función celular y la polaridad de los tejidos. También están implicadas en diversas funciones en distintos tejidos como la polarización del tejido epitelial, las uniones mecánicas de células ciliadas de la cóclea y en la formación de circuitos neuronales en el cerebro [14].

1.1.4. Superfamilia de las Inmunoglobulinas

Los miembros de esta familia contienen en su parte extracelular dominios con la estructura característica de dominios de inmunoglobulina. Los dominios de inmunoglobulina constan de 70 a 110 aminoácidos y usualmente tienen dos residuos de cisteína unidos por un puente disulfuro intradominio (Figura7) [9].

Pertenecen a esta familia no solamente moléculas de adhesión, también se incluyen algunas otras moléculas involucradas en el reconocimiento antigénico y en la activación de linfocitos, como es el receptor de células T (TCR), los anticuerpos, los co-receptores CD8 y CD4, etcétera (8).

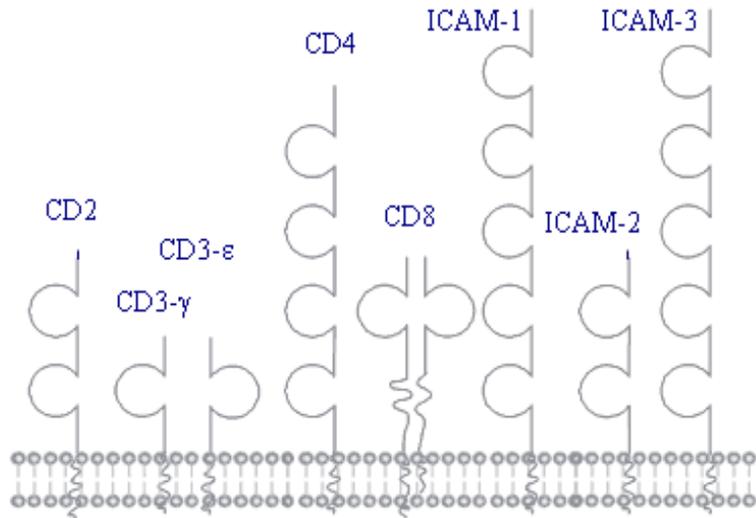


Figura 7. Estructura esquemática de algunas moléculas pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, los dominios de inmunoglobulina están representados por semi-círculos. ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 y CD2 son moléculas de adhesión, CD4 y CD8 son correceptores de los linfocitos T, CD3-ε y CD3-γ forman parte del TCR en linfocitos T.

En el proceso de migración de leucocitos participan moléculas de esta familia expresadas en las membranas tanto de leucocitos como de células endoteliales, como ICAM1, ICAM2, ICAM3, PECAM1, JAM-A, JAM-B, JAM-C. Algunas de estas moléculas interactúan con integrinas, como es el caso de ICAM1, ICAM2 y JAMs; en otros casos pueden establecer interacciones homofílicas, como los casos de PECAM1 y JAMs [15].

Moléculas que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas participan en eventos como la adhesión de leucocitos a células endoteliales durante la migración transendotelial. De igual manera, en los procesos de reconocimiento antigénico y activación linfocitaria, las moléculas de adhesión de esta superfamilia ayudan al contacto entre las células participantes. [8]

1.2. Matriz Extracelular

El espacio que se encuentra entre las células en un tejido, se denomina matriz extracelular. La matriz extracelular está compuesta por una gran variedad de moléculas, que interactúan entre sí y que también establecen contactos con moléculas de membrana de distintas células [16]. Estas interacciones entre las células y la matriz extracelular son esenciales para la migración celular, la organización del tejido, la diferenciación, etc. La interacción entre la matriz extracelular y los receptores en las células, dispara vías de señalización intracelulares. Un ejemplo de estos receptores son las integrinas, muchas de las cuales se unen a proteínas de la matriz generando una señalización hacia el interior de la célula, la cual es importante por ejemplo para la migración celular [17]. También se ha visto que la señalización por receptores de matriz genera señales de supervivencia, ya que al colocar células epiteliales en cultivos en ausencia de matriz extracelular, las células entran en apoptosis o muerte celular programada. Esta apoptosis se puede bloquear al activar con un anticuerpo a la integrina β_1 (receptor de matriz extracelular), simulando la interacción de la integrina con su ligando de la matriz extracelular (Figura 8) [18].

Las proteínas que componen la matriz extracelular no solo se asocian con receptores en la membrana celular, sino que también establecen interacciones entre ellas, formando una especie de red o gel alrededor de las células. De esta manera el volumen ocupado por la matriz extracelular puede variar. Por ejemplo, en el caso de los tendones, la matriz extracelular forma la mayor parte del tejido (matriz estromal), estando en una relación 10:1 respecto a las células y de manera opuesta en músculos la relación es de 1:10, siendo menor el volumen de la matriz extracelular [16].

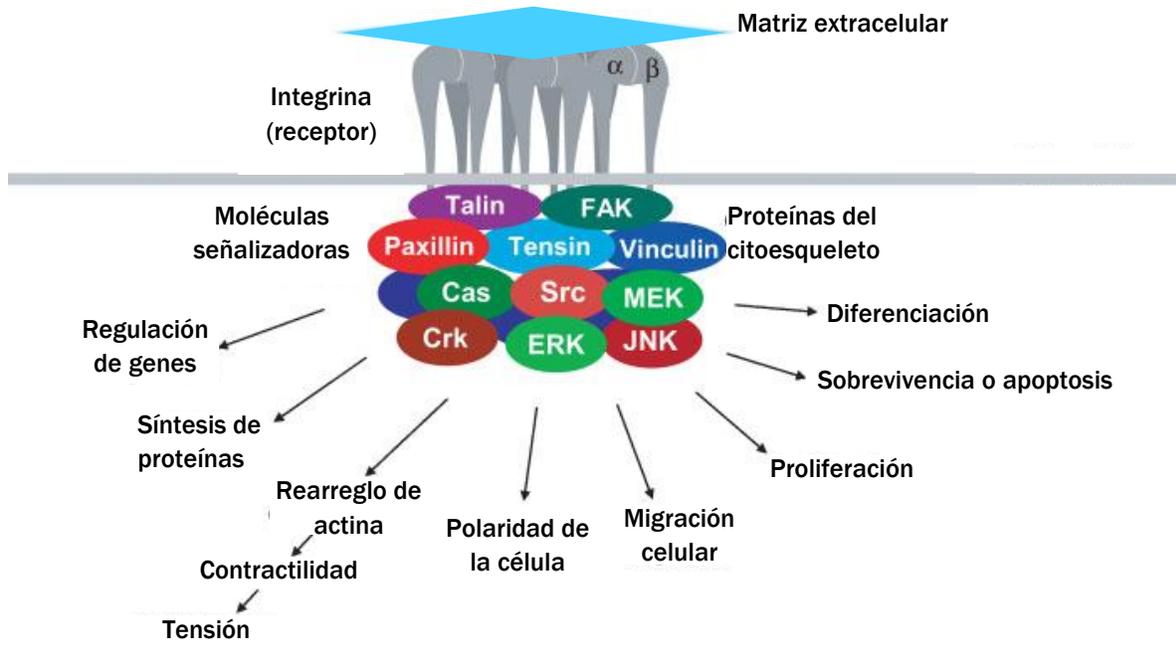


Figura 8. Esquema general de la interacción entre la célula y la matriz extracelular. Dependiendo del tipo de receptor la vía de señalización va a ser diferente. (17)

Las proteínas que forman parte de la matriz extracelular se clasifican en diversos grupos por su estructura y funciones. Entre las principales proteínas de matriz están las colágenas, metaloproteinasas de matriz, fibronectinas, lamininas, elastina y proteoglicanos. Las características de cada uno de estos grupos se describirán adelante.

1.2.1. Colágenas

La familia de las colágenas está formada por 28 miembros. Su estructura se basa en tener al menos una triple hélice, en la cual cada giro está formado por tres aminoácidos [16 y 19]. Son las proteínas que se encuentran en mayor proporción en la matriz extracelular, su función es dar soporte a la estructura de tejidos conectivos principalmente, aunque también se encuentran en el espacio intersticial en órganos parenquimales.

Al ser sintetizadas, las colágenas se encuentran en un estado de procolágena, en el cual tanto el extremo amino como el carboxilo terminal poseen secuencias de aminoácidos que son escindidas por proteasas específicas (procolagenasas), una vez que la proteína se encuentra fuera de la célula. Los extremos que quedan, no forman parte de la triple hélice y son utilizados para asociarse con otras moléculas de colágena del mismo o de diferente tipo, así como también con otras moléculas que no pertenezcan a la familia de las colágenas, en la matriz extracelular [20].

1.2.2. Fibronectinas (FN)

Todas las fibronectinas están codificadas en un mismo gen; la diferencia entre los distintos tipos de fibronectina se genera por un empalme alternativo del ARNm. Las fibronectinas tienen regiones de unión entre sí mismas y también para unirse a otras moléculas como las integrinas, colágenas, heparan sulfato y proteoglicanos [16].

En experimentos realizados con fibroblastos de conejo, se observó que cuando la fibronectina se une a las integrinas hay un aumento en la expresión de otras moléculas de matriz extracelular, como colagenasas y estromelinas, por parte de los fibroblastos [21 y 22].

1.2.3. Lamininas

Las lamininas forman la mayor parte de la membrana basal. Su estructura se basa en heterotrímeros que se componen por cadenas α , β y γ , de las cuales hasta el momento se conocen cinco cadenas α , tres β y tres γ , pudiéndose combinar de distintas maneras entre si y dar lugar a una gran variedad de lamininas que al unirse forman una especie de cruz (en forma de T).

Las lamininas son capaces de unirse a otras proteínas de la matriz extracelular y a proteínas de membrana de células como son integrinas, distroglicanos, sindecanos* y la glicoproteína del grupo sanguíneo luterano⁺. Las lamininas son esenciales en etapas tempranas del desarrollo embrionario así como durante la organogénesis, también en tejido muscular, nervioso, en piel, riñón, pulmón y vascular [23].

1.2.4. Metaloproteinasas de matriz (MMPs)

La familia de las metaloproteinasas de matriz está formada por enzimas proteolíticas dependientes de Zn^{2+} . Hasta ahora se conocen 25 distintas metaloproteinasas, las cuales poseen una estructura similar, pero se encuentran codificadas por distintos genes para cada una de ellas [25]. Se sintetizan dentro de la célula como zimógenos, los cuales una vez fuera de la célula son hidrolizados para adquirir su forma activa; este procesamiento puede ser mediado por proteinasas específicas, así como también por otras metaloproteinasas presentes en la matriz [24].

Dependiendo del tipo de metaloproteasa sus sustratos pueden ser colágena, gelatina, elastina, proteoglicanos, fibronectina, fibrinógeno u otras metaloproteinasas [26]. De esta manera, las MMPs tienen un papel importante en procesos fisiológicos como el desarrollo de órganos y la regulación de la respuesta inflamatoria. En algunos tipos de cáncer se ha encontrado un aumento de la expresión de metaloproteinasas, sobre todo MMP-2 y MMP-9 [24].

*Sindecanos: son proteínas con un dominio transmembranal, que pueden actuar como co-receptores de receptores acoplados a proteínas G.

⁺Grupo sanguíneo luterano: este grupo sanguíneo se caracteriza por dos glicoproteínas de membrana (85 y 78 kDa) que contienen en su región extracelular cinco dominios parecidos a inmunoglobulina.

1.2.5. Otras moléculas

La elastina es una molécula de la matriz extracelular que se sintetiza como un precursor (tropoelastina), el cual tiende a unirse a fibrilinas (tipo 1 y 2), que también forman parte de la matriz, para formar microfibrillas en tejido conectivo.

También hay proteoglicanos que forman parte de la matriz extracelular, como la fibromodulina, que inhibe el ensamblado de colágena; neurocan, que guía el desarrollo nervioso durante la embriogénesis; y agregano, que forma el 10% de cartílagos, entre otros [16].

1.3. Aminopeptidasa N/ CD13

La aminopeptidasa N ó CD13 es una ectoenzima altamente glicosilada de aproximadamente 160 kDa [1]. Se encuentra anclada en la membrana de las células mediante una porción transmembranal y posee una pequeña porción citoplasmática de alrededor de 8 a 10 aminoácidos (Figura 9) [2]. Esta aminopeptidasa se expresa en varios tipos celulares, como el epitelio intestinal y renal, en el sistema nervioso en membranas sinápticas, en monocitos, macrófagos, células dendríticas y en células similares a fibroblastos [1]. Durante la hematopoyesis se expresa en células madre y en la mayoría de los estadios de desarrollo de células mieloides [3].

Esta enzima tiene diversas funciones, las cuales dependen de su capacidad para actuar como peptidasa, como molécula de señalización y como mediador de endocitosis.

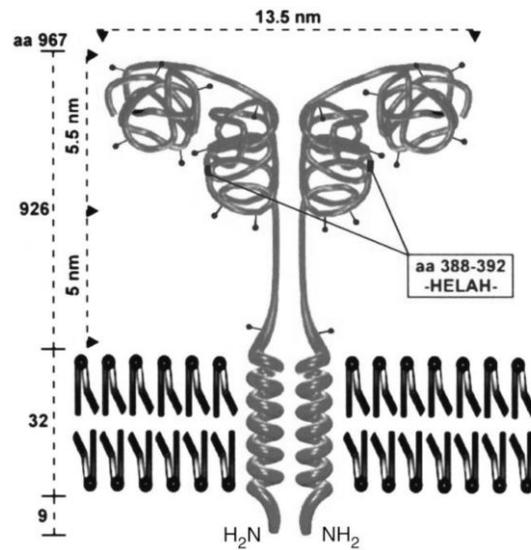


Figura 9. Estructura de CD13, se encuentra como un dímero de dos subunidades unidas no covalentemente. En el motivo HELAH, se une el metal Zn^{2+} del cual depende la actividad enzimática.

-Actividad enzimática (escisión de péptidos)

CD13 remueve preferencialmente aminoácidos con cadena neutra (Ala>Phe>Tyr>Leu>Thr>Trp>Lys>Ser>Asp>His>Val) que estén en la parte N-terminal de un péptido, a excepción de aquellos que tengan una prolina en la penúltima posición [2]. A través de este mecanismo es capaz de activar o inactivar otras proteínas o péptidos como algunos que se encuentran en la matriz extracelular (entactina y colágena tipo IV) [1]. También se ha asociado su actividad enzimática con la invasión de células tumorales, ya que se ha observado que media la migración de diferentes tipos de células tumorales a través de matrigel [10] y que se encuentra sobreexpresada en tumores de ovario, colon, riñón, hueso, tiroides, piel, estómago y próstata [1].

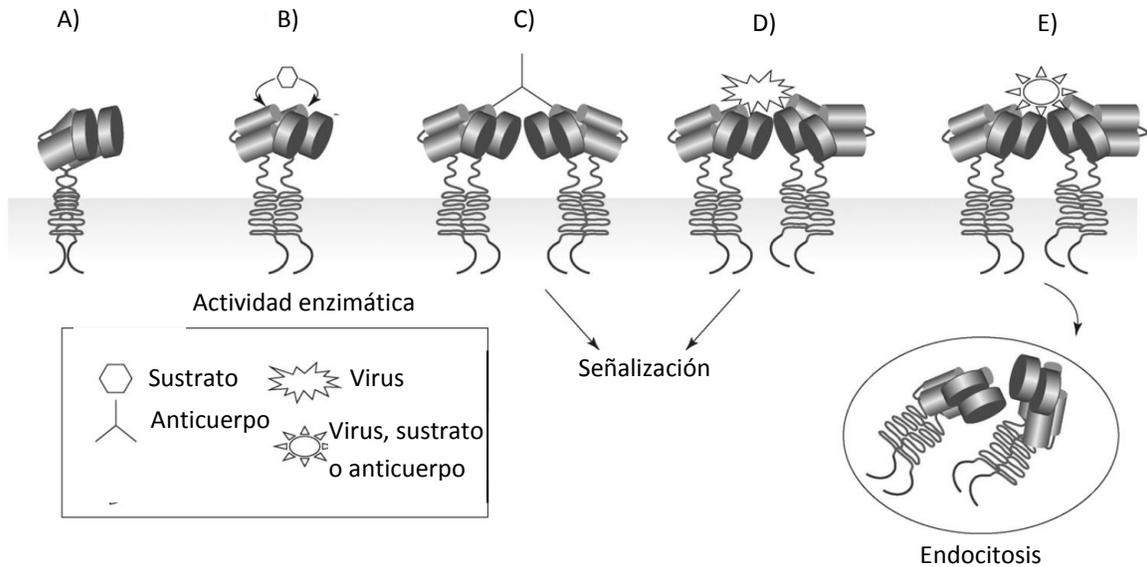


Figura 10. Mecanismos de acción de CD13 después de entrar en contacto con su ligando. A) En estado de reposo. B) La unión del sustrato induce un cambio conformacional, el cual puede llevar a los distintos mecanismos. C) y D) El entrecruzamiento de CD13 por medio de anticuerpos u otro ligando como puede ser el caso de un virus, resulta en una señalización al interior de la célula. E) Después de la unión del ligando (virus, anticuerpo u otro sustrato) las moléculas oligomerizadas de CD13 pueden ser endocitadas [1].

La actividad enzimática de CD13 también se ha visto implicada en procesos de diferenciación celular (por ejemplo aumentando su expresión en la maduración de monocitos [2]), presentación de antígenos, quimiotaxis y motilidad [1].

Otra función en donde participa CD13 es en procesos de angiogénesis, probablemente a través de la modulación de la señalización de factores de crecimiento y/o angiogénicos, o también a través de la degradación de proteínas de matriz. Se han demostrado que puede inhibirse la angiogénesis *in vivo*, inhibiendo la actividad enzimática de CD13 con bestatina y utilizando anticuerpos que no necesariamente inhiben su actividad enzimática. [1]

-Endocitosis

Se ha demostrado que CD13 actúa como un receptor viral para el coronavirus humano (HCoV-229E) [1] y el virus de gastroenteritis porcina (TGEV) [2]. El grado de glicosilación o los carbohidratos que se unen a CD13 entre distintas especies, es una diferencia que determina que CD13 pueda ser utilizado como receptor por el virus.

También se ha implicado a CD13 en la infección por citomegalovirus humano (HCMV), pues al bloquear a CD13 con anticuerpos anti-CD13, se bloquea la infección y se han encontrado autoanticuerpos contra CD13 en pacientes con la enfermedad activa, ya que se encuentra asociado a las partículas virales [30,31].

-Señalización

En varios estudios se ha demostrado que CD13 es capaz de inducir la activación de vías de señalización. A pesar de que esta molécula tiene una cola citoplasmática muy corta en donde no hay motivos reconocidos de señalización, se ha propuesto que CD13 se asocia con una proteína auxiliar para poder llevar a cabo aquellas funciones en donde se requiere señalización intracelular [1].

CD13 es capaz de participar activamente en fagocitosis mediada por $Fc\gamma RI$, ya que se ha observado que se redistribuye hacia la copa fagocítica y se internaliza en los fagosomas. Además, al entrecruzar CD13 y $Fc\gamma RI$ al mismo tiempo se observa una fagocitosis más alta que al entrecruzar el $Fc\gamma RI$ únicamente, implicando una asociación funcional entre CD13 y $Fc\gamma RI$ [5].

Por otro lado, CD13 se ha visto implicado en procesos de adhesión, pues se ha observado que el contacto célula-célula induce la expresión de CD13 en linfocitos [2]. También al entrecruzar CD13 con un anticuerpo anti-CD13 en células U937, se induce una fuerte agregación homotípica, la cual es independiente de su actividad enzimática. Este proceso depende de la parte a la cual se une el anticuerpo, pues no todos los anticuerpos anti-CD13 inducen esta agregación. En esta agregación homotípica se observa una redistribución de CD13 a las zonas de contacto entre las células, y al inmunoprecipitar a CD13, se co-inmunoprecipita a Grb2 y a Sos; la primera es una proteína involucrada en la vía de señalización de ERK1/2 MAPK y la segunda es un factor intercambiador de nucleótidos de guanina. Así se propone una parte de la posible vía de señalización de CD13 (Figura 11) [4].

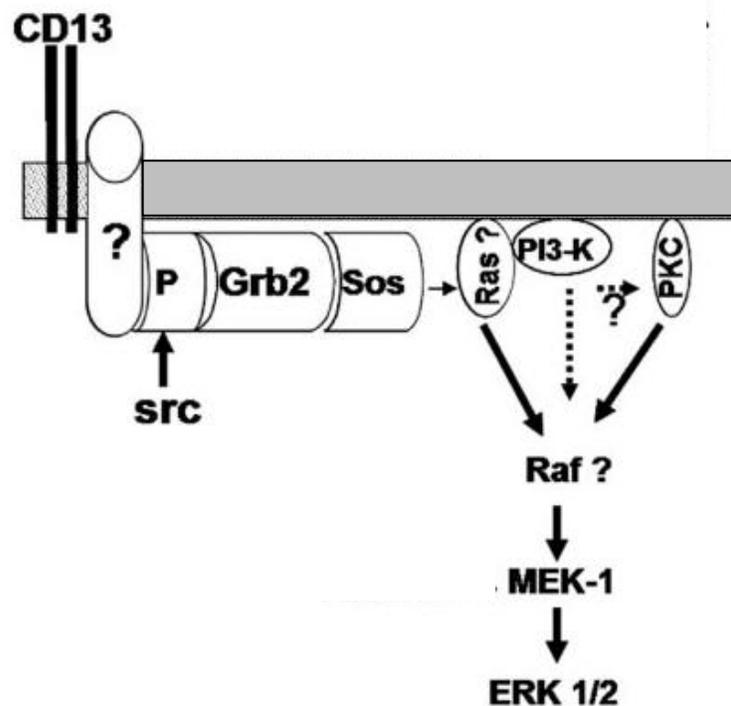


Figura 11. Posible vía de señalización inducida por el entrecruzamiento de CD13

En cuanto a adhesión, CD13 no solo participa en agregación homotípica sino también en procesos de agregación heterotípica; en estudios realizados con células endoteliales (HUVEC) y monocitos aislados de sangre periférica, el entrecruzamiento de CD13 indujo la adhesión entre células mieloides y endoteliales, involucrando un proceso de señalización que provocó el rearrreglo del citoesqueleto en monocitos y la formación de filopodia [6].

2. Antecedentes

En estudios previos en nuestro laboratorio, se observó que al entrecruzar a CD13 con ciertos anticuerpos monoclonales anti-CD13 (MY7, WM-15 y 452) se indujo la agregación homotípica de células U-937, en un proceso dependiente de la cantidad de anticuerpo, encontrándose el mayor porcentaje de agregación en el rango de 0.09 a 3 $\mu\text{g/mL}$. Se analizó si esta agregación dependía de la actividad enzimática de CD13 colocando bestatina (inhibidor de la actividad enzimática de CD13), la agregación obtenida no sufrió variaciones debidas al inhibidor, mostrando que la actividad enzimática no participa durante el evento.

La agregación homotípica se inhibe en un 99% al colocar un inhibidor de la glicólisis o a temperaturas de 4°C, pero no cuando se inhibe el transporte de electrones en la cadena respiratoria, indicando que este fenómeno es un proceso activo y dependiente de energía a través de la vía glucolítica. También se observaron importantes efectos de distintos inhibidores sobre la agregación: inhibidores de las cinasas Src inhiben la agregación casi al 100%, inhibidores de protein cinasas activadas por mitógenos (MAPK) producen una inhibición de 91%, inhibidores de fosfoinositol 3-cinasa (PI3-K) causan el 79% de inhibición, inhibidores de p38 causan una inhibición del 68%, e inhibidores de la proteína cinasa C (PKC) inhibieron un 48%. Esto indica la participación de estas enzimas durante la señalización que resulta de entrecruzar a CD13.

Grb2 es una proteína adaptadora involucrada en la vía de señalización de cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2) de las MAPK, que se une a Sos (factor intercambiador de nucleótidos de

guanina) a través de la activación de Ras. En células U-937 agregadas y sin agregar, Grb2 y Sos co-immunoprecipitaron junto a CD13.

Por otra parte se analizó por citometría de flujo si la agregación homotípica estaba asociada a cambios en la expresión de tres integrinas (β_1 , β_2 y α_L) e ICAM-1, y no se encontró ningún cambio en la expresión de estas moléculas a las 24h de agregación.

3. Planteamiento del problema:

La participación de CD13 en distintos procesos como angiogénesis, agregación homotípica, metástasis, fagocitosis, etc., lleva al estudio de esta molécula para comprender de una mejor manera los mecanismos implicados y evaluar su posible uso como blanco terapéutico en algunos tipos de cáncer. Por lo que se puede realizar el estudio de esa molécula en modelos controlados, con el uso de anticuerpos y distintas técnicas para conocer las consecuencias o vías por las cuales lleva a cabo sus funciones. En este trabajo, nos enfocamos a analizar si durante la agregación homotípica inducida por el entrecruzamiento de CD13 en la línea celular promonocítica U-937, se induce la expresión de moléculas de adhesión y de matriz extracelular que pudiesen participar en el fenómeno.

4. Hipótesis:

Al entrecruzar a la Aminopeptidasa N (CD13) con un anticuerpo monoclonal anti-CD13 en la línea celular U-937, se induce la transcripción de genes que codifican para moléculas de adhesión o de matriz extracelular que pudieran encontrarse involucradas en el proceso de agregación homotípica.

5. Objetivo general:

1. Analizar por medio de PCR en tiempo real la expresión de distintos genes que codifican para moléculas de adhesión y de matriz extracelular inducida por el entrecruzamiento de CD13 en la línea celular monocítica U937.

5.1 Objetivos particulares:

1. Obtener ARN libre de ADN de células U-937 agregadas y sin agregar (células control).
2. Comparar la transcripción de 84 genes presentes en un arreglo para PCR en tiempo real, de células U-937 agregadas contra células control, después de 12 horas de haber entrecruzado a CD13.
3. Analizar por PCR en tiempo real con el método de $\Delta\Delta C_t$ la transcripción de aquellos genes en los que se encontraran diferencias inducidas por la agregación homotípica a distintos tiempos después de entrecruzar a CD13.
4. Cuantificar el efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas sobre la agregación homotípica de células U-937.

6. Materiales y Métodos

6.1. Cultivo celular

La línea celular U-937 (obtenida originalmente de la American TypeCell Culture Collection, ATCC) fue cultivada en medio RPMI-1640 (GIBCO) complementado con 5% de Suero Fetal Bovino (SFB) inactivado por calor (56 °C, 30 min), 1mM de aminoácidos no esenciales, 1mM de solución de piruvato de sodio, 0,1mM de L-glutamina, 100U/mL de penicilina y 100µg/mL de estreptomicina. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora a 37°C con 6% de CO₂.

6.2. Anticuerpo

El anticuerpo monoclonal murino anti-CD13 humano (clona 452) con isotipo IgG₁, fue purificado a partir del sobrenadante del hibridoma donado al laboratorio por el Dr. Meenhard Herlyn, del Wistar Institute of Anatomy and Biology, Philadelphia.

6.3. Metodología para el análisis de la expresión de 84 genes codificantes para moléculas implicadas en procesos de adhesión por medio de un arreglo para PCR en tiempo real

6.3.1 Ensayos de agregación homotípica

Las células se colectaron, se lavaron y se contaron en una cámara de Neubauer, con el colorante vital azul tripano. Se centrifugaron a 1000rpm por 3min (SORVALL Legend MACH 1,6R) y se resuspendieron a una concentración de 2×10^6 cel/mL en medio RPMI complementado.

Para el ensayo se requiere tener alrededor de 4×10^6 células al final del experimento en un volumen de 5.5 mL con una concentración de

1µg/mL del anticuerpo anti-CD13 (452) para entrecruzar CD13. Para esto, en una placa para cultivo de 6 pozos se colocaron por pozo:

Tabla1. Cantidad de células, medio y anticuerpo para ensayos de agregación a 12h.

	Control	Agregación
Suspensión celular (2×10^6 cel/mL)	2.0 mL	2.0 mL
RPMI-1640 complementado	3500 µL	3492.4 µL
Anti-CD13 (452) [7.3mg/mL]	--	7.6µL

Las células se dejaron en reposo a 37°C con 6% de CO₂ por al menos 4h antes de agregar el anticuerpo 452, después de este tiempo se colocó el volumen indicado de anticuerpo y a partir de ese momento se incubó a 37°C con 6% de CO₂ por 12h, al término de este tiempo se observó al microscopio para verificar la agregación homotípica y el estado de las células.

6.3.2 Extracción de ARN

Para cada caso (células control y agregadas) se resuspendieron las células en los pozos, se transfirieron los 5.5mL del cultivo a un tubo Falcon de 15mL y se centrifugaron a 1000 rpm por 3 min (SORVALL Legend MACH 1,6R).

Se desechó el sobrenadante y al botón se le agregó 1mL de TRIzol Reagent (Invitrogen), se lisaron las células pipeteando varias veces hasta que el botón se lisara por completo, se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se agregó a cada muestra 200µL de cloroformo (99% para biología molecular, Sigma-Aldrich), se agitó mecánicamente por 15 seg aproximadamente y se incubaron 3 min a temperatura ambiente. Después se centrifugaron a 12000 g por 15 min a una temperatura de 4°C (Centrifuge 5810C, Eppendorf).

Al término de la centrifugación queda una fase orgánica (fenol-cloroformo), una interfase y una fase acuosa. Aproximadamente dos terceras partes de la fase acuosa se recuperaron en nuevos tubos eppendorf de 1.5 mL y se les agregaron 500 μ L de isopropanol (99,5% grado HPLC, Sigma-Aldrich) para precipitar el ARN. Se incubaron las muestras por 10 min a temperatura ambiente, después se centrifugaron a 12,000 g por 10 min a una temperatura de 4°C.

Después de la centrifugación, se desechó el sobrenadante y se procedió al lavado del botón. Para esto se agregó 1 mL de etanol al 75%, se agitó en un vortex (Vortex Genie 2) por 15 seg y se centrifugaron las muestras a 7500 g por 5 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se hizo un segundo lavado con etanol al 75%, de igual manera se agitó y se centrifugó. Se desechó el sobrenadante y el botón se dejó secar a temperatura ambiente por unos 15 min aproximadamente o hasta que ya no hubiese gotas de etanol presentes en el tubo o alrededor del botón. Una vez seco el botón, se disolvió el RNA en 50 μ L de agua inyectable.

Se tomaron 2 μ L de cada muestra para ser cuantificados en un Nanodrop 1000 Spectrophotometer (ThermoScientific), tomando como blanco 2 μ L de agua inyectable. La absorbancia fue leída en tres longitudes de onda, a 260nm (ácidos nucleicos), a 280nm (proteínas) y a 230nm (sales). El cálculo para la concentración de ARN se realiza considerando que una $A_{260}=1$ corresponde a una concentración de ARN de 40 ng/ μ L, quedando la operación:

$$(\text{Abs } 260\text{nm})(40\text{ng}/\mu\text{L}) = \text{RNA}[\text{ng}/\mu\text{L}]$$

La presencia de proteínas y sales puede interferir en las reacciones posteriores, por lo que para que no haya problemas la relación entre la cantidad de ARN y proteínas (A_{260}/A_{280}) debe ser mayor a 1.8 y con respecto a sales (A_{260}/A_{230}) mayor a 1.7.

La calidad del RNA se observó analizando por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% entre 800ng y 1µg de ARN con 3 µL de buffer de carga para ARN.

La electroforesis se realizó a 95V por 30 min aproximadamente, después de esto se tiñó el gel dejando 15 min en una solución diluida de bromuro de etidio (Fluka, BioChemika) y se observó en luz UV en un transiluminador (Gel Doc 2000, Bio-Rad) con el programa QuantityOne. La presencia de dos bandas bien definidas equivalentes al ARN ribosomal (18s y 28s) indican una buena calidad de la muestra, si hubiese un barrido o ninguna banda indicaría que el ARN fue degradado o que se perdió en algún paso de la extracción.

6.3.3 Purificación de ARN

Del ARN extraído de cada muestra, se tomaron 30µg para ser tratados con RNeasy Mini Kit (Qiagen) para una mejor limpieza del ARN. Para esto el volumen de las muestras se ajustó a 100µL con agua inyectable, se agregaron 350µL del Amortiguador RLT y 250µL de etanol absoluto, se mezcló pipeteando varias veces.

La mezcla se transfirió a la columna del kit que se encuentra sobre un tubo colector de 2mL y se centrifugó por 15 s a 10,000 rpm (Centrifuge 5415C, Eppendorf). Se desechó el filtrado y se agregaron 500µL de Buffer RPE a la columna para lavar la membrana. Se centrifugó por 15 s a 10,000 rpm y se desechó el nuevo filtrado. Se hizo un segundo lavado de la membrana, agregando de igual manera 500µL de Amortiguador RPE a la columna, se centrifugó por 2 min a 10,000 rpm y se desechó el filtrado. Después se volvió a centrifugar por un minuto a máxima velocidad (14,000 rpm) para eliminar lo que pudiese haber quedado de Amortiguador RPE. Se agregaron 30µL de agua

inyectable para eluir el ARN de la columna, se colocó ésta en un tubo Eppendorf de 1,5mL y se centrifugó a 10,000 rpm por un minuto.

Se tomaron 2 μ L de cada muestra para ser cuantificados en el Nanodrop 1000 Spectrophotometer (ThermoScientific), tomando como blanco agua inyectable. La absorbancia fue leída a tres longitudes de onda, a 260nm (ácidos nucleicos), a 280nm (proteínas) y a 230nm (sales). La concentración de ARN se calculó de la misma manera anteriormente descrita, al igual que la relación respecto a proteínas y sales.

6.3.4 Tratamiento con DNasa

Para asegurar que no hubiese contaminación de ADN en las muestras, se realizó un tratamiento del ARN con una DNasa (Turbo DNA-free, Ambion).

Para esto se tomaron 10 μ g de ARN de cada muestra, a la cual se les agregó 0.1 volumen (de la muestra) del Amortiguador 10x y 1 μ L de DNasa. Se incubaron por 30min a 37°C. Para inactivar la enzima se agregó 0.1 volumen del Reactivo para Inactivación o 2 μ L como mínimo. Se incubó por 5 min a temperatura ambiente, agitando ocasionalmente la muestra en un vortex, después se centrifugó a 10,000 rpm por 1.5 min y se separó el sobrenadante en un tubo Eppendorf nuevo de 0.6 mL.

Para cuantificar, de igual manera que en los casos anteriores, se tomaron 2 μ L de ARN para medir su absorbancia en el Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) a las longitudes de onda de 260 nm, 280 nm y 230 nm, tomando como blanco agua inyectable.

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % de la misma manera anteriormente descrita, para descartar que el ARN se hubiese degradado.

6.3.5 Síntesis de cDNA

Para realizar la síntesis de cDNA se ocupó el producto RT²FirstStrand Kit (SABioscience): Para esto se tomó 1 µg de ARN de cada muestra y se colocó en un tubo para PCR de 0.2 mL de capacidad. Se agregaron 2 µL del Amortiguador para eliminación de DNA genómico 5x y se agregó agua inyectable suficiente para tener un volumen final de 10 µL. Se mezcló pipeteando varias veces y se incubó a 42 °C por 5 min, al término de la incubación se colocaron los tubos en hielo por un minuto.

Se preparó aparte en un tubo de 0.6 mL una mezcla para RT, tomando en cuenta por muestra 1 µL de Primer & External control mix, 4 µL de Amortiguador RT 5x, 2 µL de RT Enzyme mix y 3 µL de agua inyectable. De esta mezcla se tomaron 10 µL para cada muestra y se mezclaron pipeteando con cuidado. Para la reacción, se incubaron las muestras en el termociclador (Corbett Research, modelo CG1-96) a 42°C por 15 min y se detuvo la reacción, calentando a 95°C por 5 min. Se agregaron 91 µL de agua inyectable a cada muestra, y se mantuvieron en hielo hasta realizar la reacción de PCR.

6.3.6 PCR en tiempo real

Se realizó la amplificación de 84 genes que codifican para moléculas involucradas en la adhesión y de matriz extracelular, utilizando un arreglo (SABioscience) para PCR en tiempo real. Los genes que se encuentran en el arreglo son:

- ✓ Moléculas transmembranales: CD44, CDH1, HAS1, ICAM1, ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA4, ITGA5, ITGA6, ITGA7, ITGA8, ITGAL, ITGAM, ITGAV, ITGB1, ITGB2, ITGB3, ITGB4, ITGB5, NCAM1, PECAM1, SELE, SELL, SELP, SGCE, SPG7, VCAM1.

- ✓ Moléculas de la matriz extracelular: COL7A1, LAMA1, LAMA2, LAMA3, LAMB1, LAMB3, LAMC1, SPARC, COL11A1, COL12A1, COL14A1, COL15A1, COL16A1, COL1A1, COL4A2, COL5A1, COL6A1, COL6A2, COL7A1, COL8A1, FN1, KAL1, ADAMTS1, ADAMTS13, ADAMTS8, MMP1, MMP10, MMP11, MMP12, MMP13, MMP14, MMP15, MMP16, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, TIMP1, TIMP2, TIMP3, ECM1, TGFBI, VCAN, CTGF, THBS1, THBS2, CLEC3B, TNC, VTN, SPP1, THBS3.

- ✓ Otras moléculas: CNTN1, CTNNA1, CTNNB1, CTNND2, CTNND1.

En un tubo Falcon de 15 mL, se preparó una mezcla (Tabla2) para la reacción, de la cual se agregaron 25 μ L a cada pozo de la placa que contenía el arreglo para PCR de moléculas de adhesión y de matriz extracelular (SABioscience), se taparon los pozos cuidando de no manchar las tapas y de que estos quedaran bien cerrados.

Tabla2. Reactivos necesarios para la reacción de PCR en tiempo real para el arreglo.

Reactivo	Volumen
2x RT ² qPCR Master Mix (SABioscience)	1350 μ L
cDNA diluido	102 μ L
Agua inyectable	1248 μ L
Volumen final	2700 μ L

Se centrifugó la placa un minuto a 1000 rpm a temperatura ambiente (Centrifuge 5810R, Eppendorf) para remover las burbujas que hubiesen quedado. La corrida de PCR en tiempo real se llevó a cabo con el equipo 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems), con el siguiente programa de temperaturas:

Tabla3. Programa de temperaturas para el análisis de 84 genes por PCR en tiempo real

Temperatura	Tiempo	# de ciclos
95°C	10min	1
95°C	15s	50
60°C	1min	

Al término de esta, se programó una curva de disociación como control de la amplificación del producto. Los resultados se analizaron por el método de $\Delta\Delta Ct$, comparando entre las muestras control y estimuladas. (Anexo #1)

6.4. Metodología para el análisis de los genes CNTN1, COL6A2 y MMP10 por PCR en tiempo real

6.4.1 Diseño de cebadores o iniciadores

Se buscó la secuencia de aquellos genes en los cuales con el arreglo comercial se detectaron cambios en su expresión inducidos por la agregación homotípica. Las búsquedas se realizaron en la base de datos en internet de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>). Se escribió el nombre del gen seguido de la especie (*Homo sapiens*) y de las opciones resultantes se buscó en la base de "Nucleotide" la secuencia de ARNm.

La secuencia se corrió en el programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) para diseñar cebadores, con las siguientes características:

- Longitud de los cebadores: 15 a 25pb
- %GC: 35 a 60%
- Tm de los cebadores: 58°C a 60°C
- Rango de Tm entre los cebadores: no más de 2°C
- Longitud de amplicón: 50 a 150pb
- %GC amplicón: 40 a 60%

Aquellas secuencias que cumplieran mejor con las características deseadas, se verificaron en el programa Primer-Blast de NCBI para comparar contra otras secuencias, los posibles productos secundarios (amplificados no deseados). De esta manera se seleccionaron aquellos cebadores que no tuvieran productos secundarios, ni generaran dímeros estables y que cumplieran con las demás características deseadas.

Las secuencias de los cebadores seleccionados junto con sus características, fueron las siguientes:

Gen problema: *CNTN1 (contactina-1)*

Secuencia		Tm	%GC
5'-CCCAAGTCTTCTCGGCTTACTG-3'		59°C	55
3'-CTGTCACAACACATTCAGAATTCCA-5'		60°C	40
Amplificado			
Tamaño	75bp		
Tm	80		
%GC	49		
Ta	59		

Gen problema: *MMP10 (metaloproteinasa de matriz 10)*

Secuencia		Tm	%GC
5'- TGAAGAAGATGAGCCTTG CAGAT -3'		59°C	43
3'- AGCAAGTGAAGAATTCCAGAAACA -5'		58°C	38
Amplificado			
Tamaño	68bp		
Tm	76		
%GC	40		
Ta	56		

Gen problema: *COL6A2* (colágena IV α 2)

Secuencia		Tm	%GC
5'- ACGAGAGTGAAAACCTCTACTCCAT -3'		58°C	44
3'- AGGTCGGAGAACAGCGTCAT -5'		58°C	55
Amplificado			
Tamaño	76bp		
Tm	83		
%GC	57		
Ta	60		

Gen endógeno: *HPRT1* (hipoxantina fosforribosil transferasa 1)

Secuencia		Tm	%GC
5'- GCTCGAGATGTGATGAAGGAGAT -3'		58°C	48
3'- GTAATCCAGCAGGTCAGCAAAGA -5'		59°C	45
Amplificado			
Tamaño	96bp		
Tm	80		
%GC	51		
Ta	59		

6.4.2 Estandarización y rango dinámico

Para cada par de cebadores se estableció un rango dinámico, en el cual se pudiera realizar de manera confiable la cuantificación de los mensajeros.

Se utilizaron las células HEK-293 por tener una mayor expresión de contactina-1, colágena IV α 2 e hipoxantina fosforribosiltransferasa1. Se sintetizó cDNA a partir de RNA extraído de esta línea celular (HEK-293) con TRIzol Reagent y tratado con Turbo DNase-free.

Se hicieron diluciones seriadas de cDNA 1:10 hasta llegar a 1:100,000. En una placa de 96 pozos para PCR se colocó la reacción por triplicado para cada dilución con un par de iniciadores o cebadores. De tal manera que para cada reacción se utilizó lo siguiente:

Tabla 4. Reactivos necesarios para una reacción de PCR en tiempo real para CNTN1, COL6A2, HPRT1 y MMP10.

Reactivo	Volumen
2x SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)	10 μ L
cDNA	1 μ L
Cebadores mix (10 μ M)	0,5 μ L
Uracil N-glicosilasa (Applied Biosystems)	0,2 μ L
Agua inyectable	8,3 μ L
Volumen final	20 μ L

El volumen se escaló dependiendo del número de reacciones, calculando un volumen extra para contrarrestar las pérdidas durante el pipeteo.

El experimento se hizo en tres días distintos con tres distintas muestras de cDNA, con el siguiente programa de temperaturas en un 7500 FAST PCR tiempo real (Applied Biosystems):

Para CNTN1, COL6A2 y HPRT1:

Tabla5. Programa de temperaturas para CNTN1, COL6A2 y HPRT1.

Temperatura	Tiempo	# de ciclos
50°C	2 min	1
95°C	10 min	1
95°C	15s	50
60°C	1min	

Para MMP10:

Tabla6. Programa de temperaturas para MMP10.

Temperatura	Tiempo	# de ciclos
50°C	2 min	1
95°C	10 min	1
95°C	15s	50
58°C	1min	

Al término de la corrida se hizo una curva de disociación. Con los resultados obtenidos se calculó la eficiencia de la reacción de tres experimentos distintos.

6.4.3 Rango dinámico con pre-amplificación

Para cuantificar la expresión de CNTN1 y COL6A2, se ideó un sistema de pre-amplificación, por lo que también se incluyó al gen endógeno (HPRT1).

Se hicieron diluciones seriadas 1:10 del cDNA de las células HEK-293, hasta llegar a una dilución 1:100,000. De estas diluciones se hizo una pre-amplificación para cada una colocando en cada reacción 5 μ L de SYBR Green Master Mix, 1 μ L de cDNA, 0.25 μ L de cebadores (2 μ M), 0.1 μ L de Uracil N-glicosilasa y 3.75 μ L de agua inyectable, se hizo una corrida de PCR en el termociclador (Corbett Research, modelo CG1-96) con el siguiente programa de temperaturas:

Tabla7. Programa de temperaturas para la pre-amplificación

Temperatura	Tiempo	# de ciclos
50°C	2 min	1
95°C	10min	1
95°C	15s	10
60°C	1min	

Al finalizar el último ciclo, las muestras se dejaron en hielo hasta que se utilizaran. Después de la pre-amplificación se hizo la corrida de PCR, en donde para cada reacción se colocó:

Tabla 8. Reactivos para PCR en tiempo real después de la pre-amplificación.

Reactivo	Volumen
2x SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)	10 μ L
Cebadores mix (10 μ M)	0.5 μ L
Uracil N-glicosilasa (Applied Biosystems)	0.2 μ L
Agua inyectable	8.3 μ L
Volumen final	20 μ L

Se escalaron los volúmenes dependiendo del número de reacciones, esta mezcla de reactivos se colocó en tubos de 0.2 mL y se incubaron en el termociclador (Corbett Research, modelo CG1-96) por 5 min a 50°C y posteriormente a 95°C por 10 min.

Para la reacción de PCR se colocó 1 μ L de cDNA pre-amplificado y 19 μ L de la mezcla anterior. El programa de temperaturas que se utilizó en el equipo 7500 FAST PCR tiempo real (Applied Biosystems) fue:

Tabla 9. Programa de temperaturas de PCR en tiempo después de la pre-amplificación.

Temperatura	Tiempo	# de ciclos
95°C	5 min	1
95°C	15s	50
60°C	1min	

Al finalizar la corrida se hizo una curva de disociación. Con los resultados obtenidos de tres experimentos distintos se calculó la eficiencia de la reacción para cada gen.

6.4.4 Ensayos de agregación homotípica

Se hicieron incubaciones a distintos tiempos: 1, 4, 12 y 24 h con el anticuerpo 452, a la misma concentración utilizada anteriormente (1 μ g/mL). Estos ensayos se realizaron en placas de 6 pozos, colocando las células y el medio indicado en la tabla 10 y dejando reposar por 12h aproximadamente antes de colocar el anticuerpo y el medio faltante para completar un volumen final de 5.5 mL.

Tabla10. Cantidad de células, medio y anticuerpo para ensayos de agregación a 1h, 4h, 12h y 24h

		Control	Agregación
Suspensión celular (2x10 ⁶ cel/mL)	1h	1.5mL	1.5mL
	4h	1.5mL	1.5mL
	12h	1.25mL	1.25mL
	24h	1.125mL	1.125mL
RPMI-1640 complementado (previo al reposo)	1h	2mL	2mL
	4h	2mL	2mL
	12h	2.25mL	2.25mL
	24h	2.375mL	2.375mL
RPMI-1640 complementado (después del reposo)	1h	2mL	1994.5 μ L
	4h	2mL	1994,5 μ L
	12h	2mL	1994,5 μ L
	24h	2mL	1994,5 μ L
Anti-CD13 (452)		--	7,6 μ L

6.4.5 Extracción de ARN

Al término de cada tiempo de incubación se resuspendieron las células en los pozos y se transfirió el cultivo a un tubo Falcon de 15mL, se centrifugó a 1000rpm por 3 min (SORVALL Legend MACH 1,6R). Se desechó el sobrenadante y al botón se le agregó 1 mL de TRIzol

Reagent (Invitrogen). Se lisaron las células pipeteando varias veces hasta que el botón se homogeneizara por completo. A partir de aquí se siguió la técnica descrita anteriormente hasta antes de la purificación del RNA, el cual se omitió para estas muestras y se continuó con el tratamiento con DNasa para 10 μ g de RNA de la misma manera como se describió antes.

6.4.6 Síntesis de cDNA

A partir de 1 mg de RNA se realizó la síntesis de cDNA con la retrotranscriptasa M-MLV (Promega). En un tubo (tubo 1) de 0.2 mL con tapa, se colocó el volumen necesario para tener 1 μ g de RNA, 1 μ L de Oligo dT₁₂₋₁₈ (Invitrogen) y agua-DEPC a un volumen final de 14 μ L. Se calentó a 70°C por 5 min en el termociclador (Corbett Research, modelo CG1-96) y se colocó en hielo al término de este tiempo por al menos un minuto.

En otro tubo se preparó una mezcla de 4 μ L de Buffer 5X, 1 μ L de dNTPs 10 mM (Invitrogen) y 1 μ L de retrotranscriptasa M-MLV. El volumen se escaló dependiendo el número de reacciones. De esta mezcla se transfirieron 6 μ L a cada tubo que contenía el RNA para la reacción (tubo 1).

Las muestras para la reacción se incubaron a 37°C por 60 min y después a 75°C por 15 min en el termociclador (Corbett Research, modelo CG1-96). El cDNA de cada muestra se congeló a -20°C hasta su uso en las reacciones posteriores.

6.4.7 PCR en tiempo real

Para el análisis de la transcripción de contactina-1 y colágena VI α 2, se siguió el procedimiento descrito anteriormente para pre-

amplificar las muestras y luego hacer la corrida de PCR. Cada muestra se hizo por triplicado y también se incluyó al gen endógeno.

Para analizar la transcripción de metaloproteinasa-10, se hizo la corrida de PCR sin pre-amplificación tanto del gen problema como del gen endógeno, con el siguiente programa de temperaturas:

Para HPRT1:

Temperatura	Tiempo	# de ciclos
50°C	2 min	1
95°C	10 min	1
95°C	15s	50
60°C	1min	

Para MMP10:

Temperatura	Tiempo	# de ciclos
50°C	2 min	1
95°C	10 min	1
95°C	15s	50
58°C	1min	

Al finalizar las distintas corridas de PCR, se realizó una curva de disociación. El análisis de los resultados se hizo por el método de $\Delta\Delta Ct$ (Anexo#1).

6.5. Inhibición de síntesis de proteínas con cicloheximida

Se realizó un ensayo de agregación en presencia de un inhibidor de la síntesis de proteínas como la cicloheximida.

Para esto en placas de 6 pozos se colocaron las células y el medio indicado en la tabla 11 y se dejaron en cultivo por aproximadamente

12 h antes de comenzar el ensayo de inhibición de la síntesis de proteínas durante la inducción de agregación homotípica. Después se colocó el inhibidor durante 30 min antes de agregar el anticuerpo anti-CD13.

Tabla11. Cantidad de células, medio, anticuerpo y cicloheximida para ensayos de agregación a 4h, 12h y 24h.

		Control	Agregación	Control	Agregación
Suspensión celular (2x10 ⁶ cel/mL)	4h	1,5mL	1,5mL	1,5mL	1,5mL
	12h	1,25mL	1,25mL	1,25mL	1,25mL
	24h	1,125mL	1,125mL	1,125mL	1,125mL
RPMI-1640 complementado	4h	2mL	2mL	2mL	2mL
	12h	2,25mL	2,25mL	2,25mL	2,25mL
	24h	2,375mL	2,375mL	2,375mL	2,375mL
12h de reposo a 37°C					
Cicloheximida [1mg/mL]	4h	--	--	5 ⁺ ;25 ^{&} ;50 [#] µL	5 ⁺ ;25 ^{&} ;50 [#] µL
	12h	--	--	5 ⁺ ;25 ^{&} ;50 [#] µL	5 ⁺ ;25 ^{&} ;50 [#] µL
	24h	--	--	5 ⁺ ;25 ^{&} ;50 [#] µL	5 ⁺ ;25 ^{&} ;50 [#] µL
RPMI-1640 complementado	4h	Medio suficiente para completar un volumen final de 5mL			
	12h				
	24h				
30min de reposo a 37°C					
Anti-CD13 (452)	--	6,6µL	--	6,6µL	

⁺, cicloheximida [1µg/mL]

[&], cicloheximida [5µg/mL]

[#], cicloheximida [10µg/mL]

Una vez que se agregó el anticuerpo y el medio RPMI suficiente para un volumen final de 5 mL, se incubó a 37°C por 4, 12 y 24 h. En cada tiempo se observaron las células al microscopio y se tomaron fotos de las células agregadas y no agregadas para cuantificar el porcentaje

de células agregadas en cada condición con el programa Quantity One para contar colonias, tomando en cuenta el número de células agregadas que el programa cuenta como colonias azules entre el número de células totales detectadas:

$$\%A = \frac{\# \text{ células agregadas}}{\# \text{ total de células}} \times 100$$

7. Resultados

7.1. Agregación homotípica de células U-937

En la línea celular U-937 al entrecruzarse a CD13 con un anticuerpo monoclonal (452) se induce una agregación homotípica de las células a partir de 30 min después de entrecruzar a CD13, la cual se mantiene por lo menos hasta las 24h. En los ensayos reportados previamente los ensayos de agregación homotípica se realizaron con 100 000 células U-937 en placas de 96 pozos [4] (Figura 12).

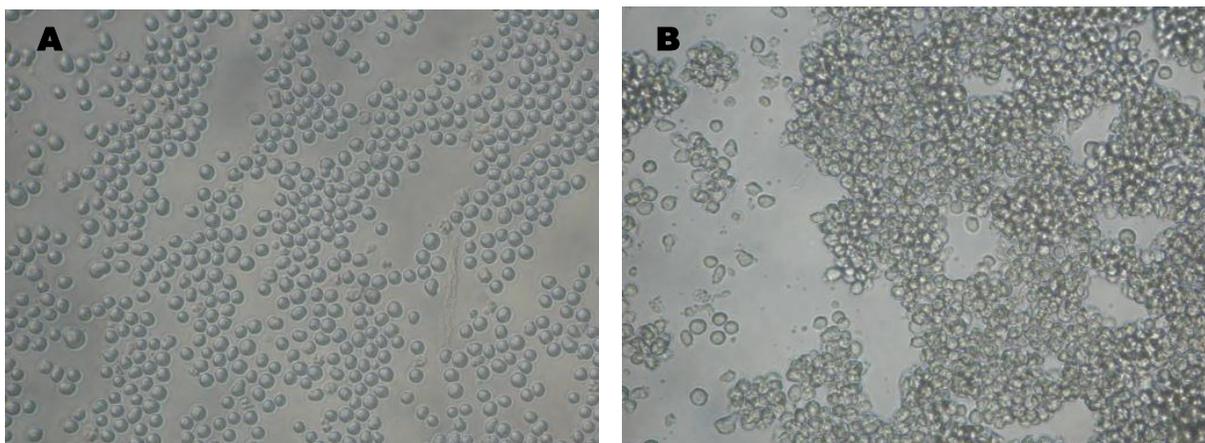


Figura12. Agregación homotípica de células U-937 a las 4h después de entrecruzar a CD13 con el anticuerpo 452. A) Células U-937 sin entrecruzar a CD13. B) Células U-937 después de 4h de entrecruzar a CD13.

Para la extracción de ARN de células agregadas y sin agregar, se requiere tener aproximadamente 15 μ g de ARN para los tratamientos posteriores y la cuantificación de los mensajeros, por lo que se requería inducir la agregación de una mayor cantidad de células U-937 para lo que se probó inducir la agregación de 5 millones de células U-937 en placas de 6 pozos, lo que representa escalar la cantidad de células y el diámetro del pozo 50 veces. La agregación homotípica es similar a la observada con 100 000 células en placas de 96 pozos a diferentes

tiempos (4h, 12h y24h), solo con una mayor densidad de células por campo en el ensayo realizado en placas de 6 pozos, el tamaño de los agregados aumenta respecto al tiempo (Figura13).

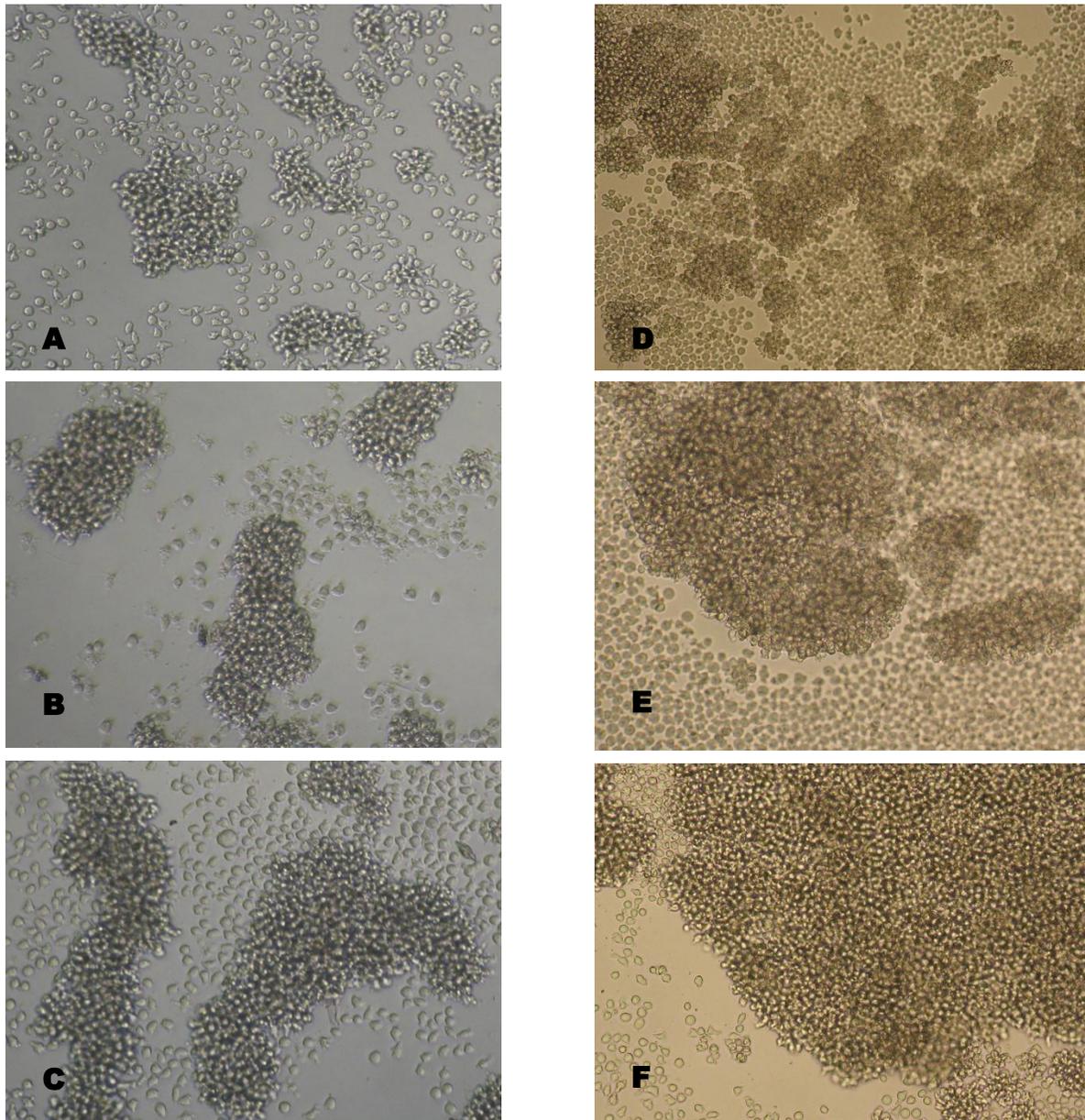


Figura13. Agregación homotípica de células U-937 vista en microscopio óptico con un aumento de 10X. Ensayos realizados con 100 00 células en placas de 96 pozos (A-C) o con 5 millones de células en placas de 6 pozos (D-F) a las 4h (A, D), 12h (B, E) y a las 24h (C, F).

7.2. Obtención de ARN

A partir de células de la línea U-937 con y sin anticuerpo anti-CD13, se estandarizó la extracción de ARN con Trizol (Invitrogen), realizando después un tratamiento con DNasa (Turbo DNA-Free, Ambion), para su uso en la cuantificación de expresión génica a través de PCR en tiempo real. El ARN debe estar libre de ADN (para evitar falsos positivos), para lo que se hicieron pruebas realizando una reacción de PCR sin retrotranscribir el ARN. También se cuantificó por absorbancia la cantidad de proteínas (A_{280}) y sales (A_{230}) presentes en cada muestra para obtener la relación del contenido de proteínas y sales respecto a la cantidad de ARN.

Es importante cuantificar la presencia de proteínas y sales en las muestras de ARN al momento de la extracción, debido a que una alta concentración de estas puede inhibir las reacciones posteriores. Para esto se cuantificó la cantidad de sales, proteínas y ARN en las muestras, midiendo la absorbancia a longitudes de onda de 230nm (sales), 260nm (ARN) y 280nm (proteínas) y se calculó la relación A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} . Valores mayores a 1,8 y 1,7 respectivamente son indicativos de que las concentraciones de proteínas y sales en la muestra son lo suficientemente bajas como para no interferir en reacciones posteriores. En la Tabla 12 se muestran las absorbancias obtenidas de una muestra de RNA; las absorbancias obtenidas y la relación de proteínas y sales respecto a la cantidad de ARN para las demás muestras utilizadas fueron similares: En todos los casos, después del tratamiento con DNasa, la absorbancia a 260 nm se redujo a aproximadamente a la mitad. Aquellas muestras de ARN que no cumplieran con la cantidad de proteínas o de sales se eliminaron para evitar que hubiese problemas posteriores debido a estas.

Tabla12. Relación de proteínas y sales presentes después de la extracción de ARN con y sin tratamiento de DNasa.

Muestra	A₂₆₀	A₂₈₀	A₂₃₀	A₂₆₀/A₂₈₀	A₂₆₀/A₂₃₀	[ng/μL]
Ctrl/12h (Trizol)*	35,76	18,11	15,98	1,94	2,19	1402,45
Ctrl/12h (DNasa)⁺	16,08	7,91	7,66	2,10	2,03	643,32
452/12h (Trizol)*	32,27	16,64	15,19	1,94	2,12	1270,70
452/12h (DNasa)⁺	19,73	9,69	9,26	2,13	2,04	789,20

*Extracción de ARN con Trizol (Invitrogen).

⁺Extracción de ARN con Trizol (Invitrogen), tratamiento con RNeasy (Qiagen) y Turbo DNA-Free (Ambion).

Durante el aislamiento del ARN, se hicieron pruebas de la integridad corriendo por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%. Al término de la corrida se tiñó con bromuro de etidio para visualizar las dos bandas de ARN ribosomal (28 y 18s); en las muestras se observan claramente las bandas correspondientes al ARN ribosomal para indicando que el ARN extraído se encuentra íntegro y asegurarnos de que no se encuentre degradado (Figura 14).

Las bandas de ARN ribosomal son las que forman la mayor parte del ARN extraído por lo que es posible observarlas en el gel de agarosa y determinar si el ARN sufrió alguna degradación durante el proceso o si conserva su integridad y puede ser utilizado en las procedimientos posteriores. En todas las muestras utilizadas posteriormente se corrieron estos geles y en todos se obtuvieron las dos bandas de manera clara y sin la presencia de algún barrido.

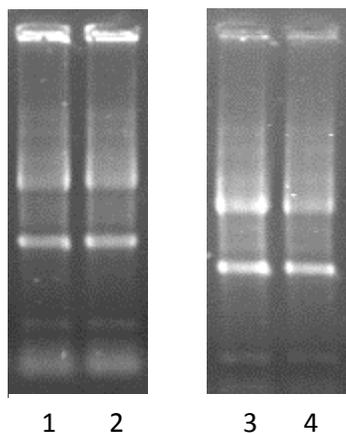


Figura14. Gel de agarosa al 1,5%. Electroforesis a partir de $\sim 1\mu\text{g}$ de las muestras de ARN por 30min a 95V, teñidas con bromuro de etidio. Las muestras son:
 -Carril1: Ctrl/12h (extracción con Trizol).
 -Carril2: 452/12 (extracción con Trizol).
 -Carril3: Ctrl/12h (tratamiento con DNasa).
 -Carril4: 452/12h (tratamiento con DNasa).

El tratamiento de la muestra de ARN con una DNasa elimina el ADN presente en las muestras de ARN extraído, evitando así la detección de falsos positivos durante la reacción de PCR en tiempo real o cualquier alteración en los resultados que se obtengan de expresión. Sin embargo, este tratamiento con DNasa podría no ser suficiente para eliminar todo el DNA de las muestras, por lo que para asegurarnos que no hubiese contaminación de ADN que pudiera alterar los resultados, se realizaron experimentos adicionales para corroborar la ausencia de la contaminación.

En la tabla 13, se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos en la reacción de PCR en tiempo real de un gen endógeno (su expresión en la célula es de manera constitutiva) como beta-actina, en los que se compara la amplificación obtenida de una muestra haciendo la síntesis de cDNA contra la amplificación del mismo RNA pero sin retrotranscribir para poder definir si en la muestra hay presencia de ADN que pueda interferir en la reacción.

Tabla13. Control de contaminación de ADN.

Muestra	Gen	Ct	Td
Ctrl/12hcDNA	Actina	21,54794	85,09386
Ctrl/12h RNA	Actina	45,67451	89,90167
452/12hcDNA	Actina	21,36242	85,27877
452/12h RNA	Actina	41,54925	75,66313
Agua	Actina	46,4398	88,42235
Agua	Actina	IND	---

IND, indeterminado; Ct, ciclo umbral; Td, temperatura de disociación

Los resultados obtenidos indican que no se encuentra una contaminación por ADN en la muestra de ARN que pueda afectar los resultados de la reacción, ya que el ciclo umbral (Ct) en el que cruzan es muy alto (Ct>40) para las muestras de ARN comparado contra las muestras de cDNA (Ct = 21,5), indicando que hay una menor cantidad de secuencia blanco que pueda ser amplificada. Las temperaturas de disociación (Td) son específicas dependiendo del tamaño del amplificado y la secuencia, en el caso de la muestra de ARN la Td que se obtiene (75°C y 89°C) es distinta a la que se espera de 85°C, esto puede deberse a la formación de dímeros entre los cebadores.

7.3. Expresión de 84 genes codificantes para moléculas implicadas en procesos de adhesión.

Se determinó la expresión génica de 84 genes que codifican para moléculas de adhesión y de matriz extracelular, en respuesta a la agregación homotípica inducida por el entrecruzamiento de CD13 con un anticuerpo monoclonal anti-CD13 (452) en células U-937. La determinación de la expresión se realizó con un arreglo para PCR en

tiempo real que consiste en sondas para amplificar por PCR los ARN mensajeros para 84 genes implicados en procesos de adhesión y 5 genes endógenos de los cuales se obtuvo un promedio (Tabla 14), ya que el nivel de expresión de éstos no cambia al entrecruzar a CD13, por lo que nos sirven para normalizar la cantidad de ARN mensajero de cada muestra y así poder realizar el análisis comparativo entre células U-937 sin estimular (sin anticuerpo anti-CD13) y células estimuladas con el anticuerpo 452, por medio del método de $\Delta\Delta Ct$ (Anexo1). El análisis se realizó después de 12h de entrecruzar a CD13, ya que la agregación se observa a partir de los 30 min hasta las 48h.

Los genes analizados abarcan distintos tipos de moléculas de adhesión y de matriz extracelular. En el caso de las integrinas (Tabla 15), que participan durante procesos de migración de leucocitos, no se observan cambios en la transcripción génica en ninguno de los tres experimentos realizados entrecruzando a CD13 por 12h, pues los valores de cambio obtenidos a través del método de $\Delta\Delta Ct$ son cercanos a uno (un valor menor a uno significa que hubo una disminución en la expresión, un valor mayor a uno significa un aumento en la expresión del gen). La expresión génica de las integrinas en general es constante y va de una alta expresión ($Ct < 25$) a una expresión de nivel moderado ($Ct \approx 30$), excepto en el caso de la integrina $\alpha 8$ la cual su nivel de expresión es muy bajo o nulo ($Ct > 40$ o indeterminado).

Tabla 14. Expresión de los genes endógenos.

Gen	Ct					
	<i>E1</i>		<i>E2</i>		<i>E3</i>	
	Ctrl/12h	452/12h	Ctrl/12h	452/12h	Ctrl/12h	452/12h
Beta-2-microglobulin	18.04	18.09	18.2	17.97	21.83	19.22
Hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1	22.75	22.38	22.5	23.05	23.96	22.34
Ribosomal protein L13a	19.76	19.53	20.01	19.77	22.31	20.65
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	17.19	16.77	17.26	17.25	20.78	18.36
Actin, beta	16.1	15.73	15.56	16.02	20.52	17.17
PROMEDIO (genes endógenos)	18.768	18.5	18.706	18.812	21.88	19.548

Tabla15. Cambios en la expresión de integrinas en tres distintos experimentos (E1, E2 y E3), a través del método de $\Delta\Delta Ct$.

Gen	Ct						# veces de cambio Ctrl vs 452		
	E1		E2		E3		E1	E2	E3
	Ctrl/12h	452/12h	Ctrl/12h	452/12h	Ctrl/12h	452/12h			
ITGA1	33.24	33.09	29.92	29.99	46.08	34.33	0.921	1.025	S/D
ITGA2	31.58	31.3	31.57	31.74	34.87	33.05	1.008	0.956	0.701
ITGA3	28.01	28.03	27.64	27.09	32.88	31.26	0.819	1.575	0.610
ITGA4	21.5	21.25	21.07	21.09	24.11	21.46	0.987	1.061	1.246
ITGA5	23.06	22.98	22.47	22.02	28.58	25.97	0.877	1.470	1.212
ITGA6	22.2	21.79	21.58	21.3	22.43	21.58	1.103	1.306	0.357
ITGA7	28.5	28.82	28.67	28.09	42.31	34.18	0.665	1.608	S/D
ITGA8	IND	43.81	48.78	40.66	IND	42.29	S/D	S/D	S/D
ITGAL	24.82	24.44	24.54	23.85	29.59	27.07	1.080	1.736	1.139
ITGAM	28.22	28.02	27.47	27	30.38	28.35	0.953	1.490	0.811
ITGAV	25.72	25.47	25.49	25.48	27.64	26.01	0.987	1.083	0.614
ITGB1	21.35	21.16	21.46	21.32	27.03	22.83	0.947	1.185	3.650
ITGB2	20.56	20.21	20.68	20.45	23.93	21.68	1.058	1.262	0.944
ITGB3	33.43	33.35	34.03	32.28	36.68	38.07	0.877	3.620	0.075
ITGB4	31.1	30.69	30.03	29.78	40.92	33.47	1.103	1.279	S/D
ITGB5	29.96	29.67	27.39	27.12	41.76	32.29	1.015	1.297	S/D

IND, indeterminado
S/D, sin detección

Tabla16. Cambios en la expresión de distintas moléculas de adhesión en tres distintos experimentos (E1, E2 y E3), a través del método de $\Delta\Delta Ct$.

Gen	Ct						# veces de cambio Ctrl vs 452		
	E1		E2		E3		E1	E2	E3
	Ctrl/12h	452/12h	Ctrl/12h	452/12h	Ctrl/12h	452/12h			
NCAM1	33.56	33.96	32.34	32.88	41.66	33.09	0.629	0.740	75.479
PECAM1	28.74	28.34	28.47	28.48	30.61	28.73	1.099	1.069	0.731
SELE	48.43	42.06	49.72	42.31	47.38	40.8	68.689	183.039	19.001
SELL	28.65	28.5	27.53	27.38	31.24	28.6	0.9214	1.194	1.238
SELP	42.95	34.77	33.57	34.59	44.92	33.61	240.851	0.530	504.251
VCAM1	IND	IND	45.5	46.21	49.04	46.05	S/D	0.657	1.577
ICAM1	24.45	24.24	24.05	23.78	30.1	27.1	0.960	1.297	1.588
CD44	22.11	21.63	21.78	21.9	28.46	24.87	1.158	0.990	2.391
CDH1	IND	IND	47.7	47.62	48.42	46.94	S/D	1.137	0.554
CNTN1	39.15	36.68	39.42	37.75	42.42	43.12	4.601	3.424	0.122
CTNNA1	24.4	24.31	25.1	24.32	27	25.17	0.883	1.848	0.706
CTNNB1	23.02	23.12	23.07	22.62	27.71	24.4	0.774	1.470	1.969
CTNND1	26.08	26.22	26.08	25.65	32.22	29.27	0.753	1.449	1.534
CTNND2	IND	IND	IND	46.6	IND	IND	S/D	S/D	S/D
HAS1	32.29	31.69	33.2	33.75	43.85	43.46	1.258	0.735	0.260

IND, indeterminado
S/D, sin detección

En cuanto a otros tipos de moléculas de adhesión (Tabla 16) como selectinas (selectina E, selectina P y la selectina L), solo la selectina L se expresa de manera constitutiva en la línea celular. No se detectó ningún cambio en los niveles de expresión de esta molécula tras el tratamiento por 12 h con el anticuerpo anti-CD13. Para las otras dos selectinas (P y E) la expresión es demasiado baja o nula ($Ct > 40$). Aun así, en los tres experimentos realizados, hay un aumento en la expresión aparente de la selectina E al entrecruzar CD13 (resaltado en gris oscuro en la Tabla 16), lo cual pudiese significar que este gen comienza a expresarse debido al entrecruzamiento de CD13.

Las moléculas de membrana ICAM1, PECAM1, CD44, CTNNA1, CTNNB1 y CTNND1 tienen una expresión basal moderadamente alta ($Ct \sim 25$), NCAM1 y HAS1 tienen una expresión relativamente baja ($35 > Ct > 30$). No se detectaron cambios en la cantidad de ARNm para ninguna de las moléculas mencionadas al estimular a CD13 por 12 h con el anticuerpo (Tabla 16).

En la Tabla 16 se muestra otra molécula cuya transcripción aumentó después de 12 h de entrecruzar a CD13 (resaltada en gris oscuro), se trata de la contactina-1 (CNTN1) la cual tiene un aumento de aproximadamente 4 veces respecto a las células sin el estímulo (ctrl/12h). La expresión de este gen es muy baja ($35 < Ct < 40$), sin embargo el cambio se observa de manera consistente en dos de los experimentos realizados (4,6 y 3,4 veces) y en las curvas de disociación se aprecia que solo hay un producto, siempre con la misma temperatura de disociación alrededor de los 84°C (Anexo II). Esta molécula se encuentra anclada a la membrana junto a una proteína G, está involucrada en procesos de adhesión neuronal y se le ha relacionado con el desarrollo del sistema nervioso [37].

Dentro de las moléculas de matriz extracelular, se analizó parte de la familia de las colágenas que se incluían en el arreglo. En la Tabla 17 se observa que hay genes con una alta expresión como el gen de COL4A6 (Ct ~21-22), genes con una expresión media como COL14A1, COL15A1 y COL16A1 (Ct ~27 a 30) y los que tienen una expresión baja o muy baja (Ct ~30 a 40) COL1A1, COL5A1, COL7A1 y COL8A1. En los experimentos realizados, para ninguno de estos genes se aprecia un cambio constante en la expresión génica, tomando en cuenta el nivel tan bajo de expresión y sus temperaturas de disociación. En el gen COL6A2 se observa un aumento en su expresión (2,2 y 3,6 veces) en dos de los experimentos realizados. Este gen es de muy baja expresión pues se obtiene un Ct de entre 38 y 40 (resaltado en gris en la Tabla 17), con una temperatura de disociación de aproximadamente 84°C en todos los experimentos realizados.

En la Tabla 18, se encuentran los resultados obtenidos para otras moléculas que se encuentran en la matriz extracelular, como lamininas, fibronectina, trombospondinas, entre otras. Para ninguna de estas moléculas se observó un cambio en la expresión al estimular a CD13 por 12hr.

Al analizar la expresión génica de metaloproteasas de la matriz extracelular (Tabla 19) se encontró que la MMP10 tiende a aumentar su expresión en las células U-937 después de entrecruzar por 12 hr con el anticuerpo anti-CD13. Este gen es de baja expresión (Ct ~ 33 a 38), por lo que su cuantificación es difícil, sin embargo en los tres experimentos realizados se notan aumentos de 13,5, 21,5 y 3,2, por lo que se puede observar una clara tendencia a aumentar su expresión después del tratamiento.

Tabla 17. Cambios en la expresión de colágenas (proteínas de la matriz extracelular) en tres distintos experimentos (E1, E2 y E3), a través del método de $\Delta\Delta Ct$.

Gen	Ct						# veces de cambio Ctrl vs 452		
	E1		E2		E3		E1	E2	E3
	Ctrl/12h	452/12h	Ctrl/12h	452/12h	Ctrl/12h	452/12h			
COL11A1	42.06	41.42	41.19	37.32	40.41	41.62	1.294	15.736	0.085
COL12A1	IND	34.1	IND	IND	48.82	49.96	S/D	S/D	0.090
COL14A1	28.7	29.04	27.7	27.58	31.79	28.7	0.656	1.169	1.691
COL15A1	27.81	27.3	27.38	27.28	31.16	27.4	1.182	1.153	2.690
COL16A1	29.91	28.68	29.89	29.05	32.28	29.27	1.948	1.926	1.599
COL1A1	33.06	35.59	34.17	33.08	47.35	33.4	0.143	2.291	3143.160
COL4A2	22.11	21.56	21.22	21.31	25.61	22.58	1.215	1.011	1.622
COL5A1	35.58	46.98	46.09	46.26	35.7	43.38	0.0003	0.956	0.001
COL6A1	48.85	35.18	30.58	30.98	44.69	46.76	10824.404	0.815	0.047
COL6A2	40.24	38.86	38.51	36.76	40.37	39.54	2.161	3.620	0.353
COL7A1	31.08	30.79	30.31	29.24	38.01	34.68	1.015	2.259	1.997
COL8A1	33.98	40.32	33.87	33.77	38.66	38.65	0.010	1.153	0.199

IND, indeterminado

S/D, sin detección

Tabla 18. Cambios en la expresión de lamininas y otras proteínas de la matriz extracelular en tres distintos experimentos (E1, E2 y E3), a través del método de $\Delta\Delta Ct$.

Gen	Ct						# veces de cambio Ctrl vs 452		
	E1		E2		E3		E1	E2	E3
	Ctrl/12h	452/12h	Ctrl/12h	452/12h	Ctrl/12h	452/12h			
LAMA1	IND	IND	42.32	45.78	49.8	49.88	S/D	0.097	0.187
LAMA2	31.44	31.01	30.82	30.56	34.57	32.07	1.118	1.288	1.123
LAMA3	40.11	35.04	36.23	33.54	35.56	34.32	27.896	6.945	0.469
LAMB1	29.86	29.54	29.61	28.74	33.49	32.15	1.036	1.967	0.502
LAMB3	30.73	30.07	30.62	30.19	35.79	33.31	1.312	1.449	1.108
LAMC1	23.73	23.28	24.26	24.12	26.96	25.58	1.134	1.185	0.516
VCAN	IND	42.63	32.25	33.03	47.92	33.74	S/D	0.626	3686.407
CTGF	43.13	44.6	44.27	38.89	43.53	44.93	0.299	44.817	0.075
ECM1	26.15	25.75	26.31	26.08	30.23	27.38	1.095	1.262	1.431
FN1	30.67	30.16	29.69	29.4	34.65	31.41	1.182	1.315	1.876
SGCE	32.06	31.68	31.74	31.61	38.48	33.24	1.081	1.177	7.505
SPARC	33.2	34.06	34.02	33.14	38.98	34.82	0.457	1.980	3.550
SPG7	26.57	26.89	26.25	25.52	31.22	30.24	0.665	1.785	0.391
SPP1	23.39	22.8	25.87	24.57	29.23	26.52	1.250	2.650	1.299
TGFBI	IND	33.91	33.33	43.1	48.42	45.44	S/D	0.001	1.566
THBS1	30.27	30.27	28.43	28.3	33.16	29.8	0.830	1.177	2.039
THBS2	28.01	27.9	27.89	27.31	30.13	27.71	0.896	1.608	1.062
THBS3	30.12	30.31	29.69	29.15	34.96	33.32	0.727	1.564	0.618

IND, indeterminado

S/D, sin detección

Tabla19. Cambios en la expresión de metaloproteasas e inhibidores de metaloproteasas de la matriz extracelular en tres distintos experimentos (E1, E2 y E3), a través del método de $\Delta\Delta Ct$.

Gen	Ct						# veces de cambio Ctrl vs 452		
	E1		E2		E3		E1	E2	E3
	Ctrl/12h	452/12h	Ctrl/12h	452/12h	Ctrl/12h	452/12h			
MMP1	23.91	22.93	25.24	24.42	30.03	25.89	1.638	1.900	3.501
MMP10	37.6	33.57	36.08	31.76	38.09	34.06	13.566	21.496	3.244
MMP11	34.98	33.26	34.73	34.46	43.32	35.23	2.735	1.297	54.116
MMP12	46.25	41.81	35.62	45.15	42.41	39.22	18.025	0.001	1.812
MMP13	31.53	30.5	33.66	31.71	IND	33.01	1.695	4.158	S/D
MMP14	31.84	30.77	32.68	32.78	46.08	42.38	1.743	1.004	2.581
MMP15	35.42	36.3	34.72	34.6	39.59	38.08	0.451	1.169	0.565
MMP16	IND	IND	48.36	44.48	45.7	49.38	S/D	15.845	0.015
MMP2	23.78	23.66	23.36	23.1	29.58	26.28	0.902	1.288	1.956
MMP3	43.42	48.71	46.38	36.44	49.67	IND	0.021	1057.176	S/D
MMP7	31.65	31.6	32.15	31.33	32.83	31.58	0.859	1.900	0.472
MMP8	26.35	25.81	27.28	26.97	31.55	28.26	1.207	1.334	1.942
MMP9	26.4	25.75	26.89	26.43	32.54	29	1.303	1.480	2.310
TIMP1	20.36	20.06	20.55	20.28	21.91	20.82	1.022	1.297	0.422
TIMP2	24.69	24.27	24.75	24.39	31.37	27.87	1.111	1.381	2.246
TIMP3	31.48	33.54	33.15	32.52	45.39	34.81	0.199	1.665	304.015
ADAMTS1	35.42	35.65	38.78	36.47	42.26	38.51	0.708	5.336	2.672
ADAMTS13	33	33.29	32.51	31.39	36.42	34.63	0.679	2.339	0.686
ADAMTS8	32.68	32.32	35.17	35.58	42.67	34.63	1.065	0.810	52.273

IND, indeterminado

S/D, sin detección

En resumen, usando el arreglo de moléculas de adhesión y de matriz extracelular se encontraron varios genes (COL6A2, CNTN1, SELE y MMP10) que mostraron una tendencia al aumento de su expresión tras el entrecruzamiento de CD13. Sin embargo, debido a los bajos niveles de expresión de estos genes, no es claro el aumento, por lo que se decidió hacer un análisis posterior de estos genes a distintos tiempos después del entrecruzamiento de CD13.

7.4. Expresión génica de MMP10, CNTN1 y COL6A2 en células U-937 estimuladas con anti-CD13.

7.4.1 Estandarización del método de pre-amplificación.

Los genes de CNTN1 y COL6A2 tienen una expresión demasiado baja en células U-937, por lo que se decidió realizar una metodología con una etapa de pre-amplificación de 10 ciclos, para tener una mayor confiabilidad en la cuantificación.

Así se calculó la eficiencia de la reacción de PCR en tiempo real. Se realizaron diluciones seriadas 1:10 del cDNA de células HEK-293 para tener una curva de 6 puntos en la cual se espera una diferencia de aproximadamente 3,3 ciclos entre la Ct de cada dilución para que la eficiencia sea lo más cercana al 100%, pudiendo tener un margen de variación de $\pm 10\%$.

Se compararon las eficiencias obtenidas para los genes de HPRT, CNTN1 y COL6A2 tanto sin pre-amplificación como con la pre-amplificación de 10 ciclos. Los resultados obtenidos muestran eficiencias cercanas al 100% para los tres genes con un coeficiente de variación menor al 10% (Figura 15) con los dos métodos, por lo que no hay una diferencia en realizar la PCR con y sin pre-amplificación de 10 ciclos.

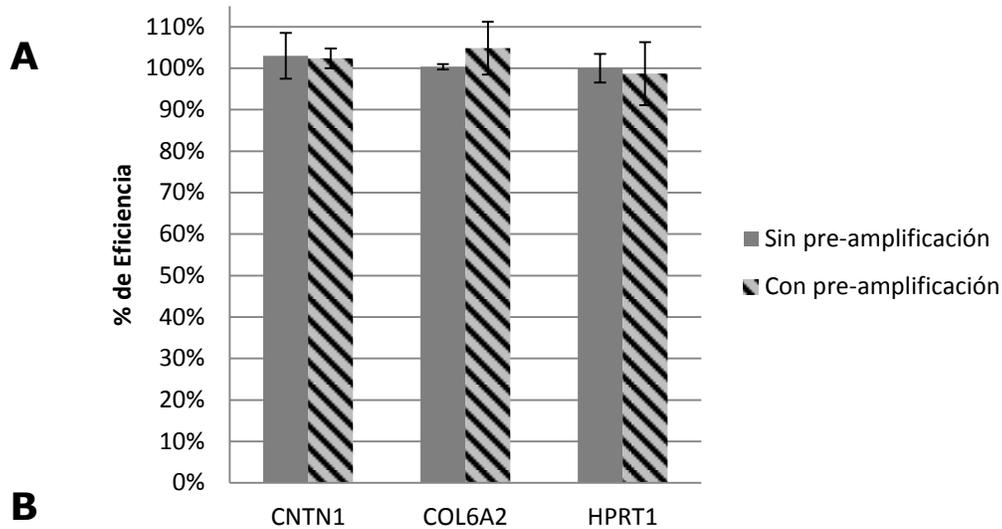
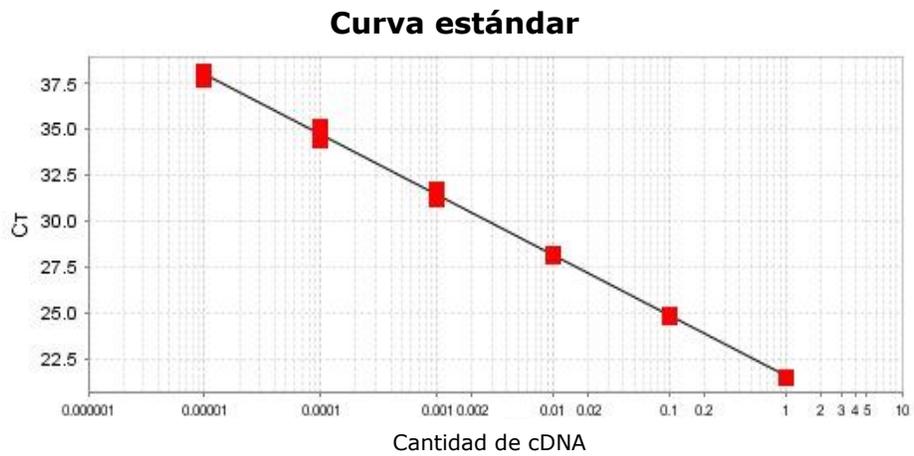


Figura15. Eficiencia del método de pre-amplificación (PA). [A] Gráfica del porcentaje de eficiencia con desviación estándar entre el método sin pre-amplificar y con pre-amplificación. [B] Valores del porcentaje de eficiencia con el coeficiente de variación obtenido para cada reacción.

Para los tres genes analizados se obtuvieron resultados similares en cuanto al corrimiento del número de Ct cuando se realizaba la reacción con el método de pre-amplificación. En las curvas estándares realizadas la diferencia entre pre-amplificar y no es de 5 a 6 ciclos cuando se tiene la misma cantidad de templado inicial (Figura 16). Estos resultados nos indican que la pre-amplificación ayuda a que haya una mejor detección del templado aún en cantidades muy pequeñas, sin alterar la cinética de la PCR.

➤ Sin pre-amplificación:



➤ Con pre-amplificación:

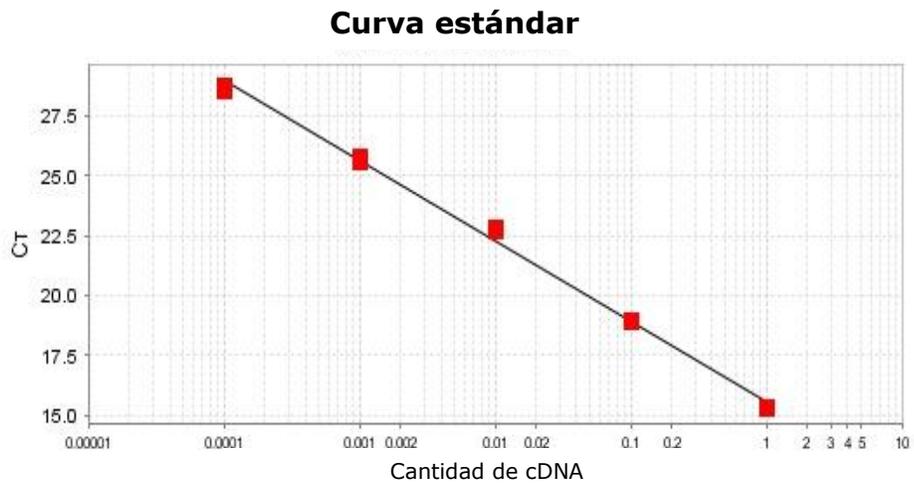


Figura16. Ejemplo de una curva estándar con pre-amplificación y sin pre-amplificación para el gen de COL6A2. Se hicieron diluciones 1:10 de la muestra de cDNA de células HEK-293, asignando el valor de 1 a la muestra sin diluir; hay un corrimiento de aproximadamente entre 5 a 6 ciclos cuando se pre-amplificó.

7.4.2 Cinética de la expresión de COL6A2, CNTN1 y MMP10 cuando se entrecruza a CD13.

Se analizó la expresión de los genes COL6A2 y CNTN1 con la técnica de pre-amplificación, se compararon contra el gen endógeno (HPRT1) el cual fue manejado bajo la misma técnica de pre-amplificación. En cuatro distintos experimentos realizados, la expresión de los genes tanto de COL6A2 como de CNTN1 es demasiado baja para poderla cuantificar, ya que a pesar de la pre-amplificación no fue posible detectar la expresión de los genes de manera confiable.

En cuanto a la expresión de MMP10, de manera consistente en los 4 experimentos realizados hay un aumento en la expresión génica de aproximadamente 2,5 a 3 veces después de entrecruzar a CD13 por 12h, para los demás tiempos no hay un cambio notable ni consistente en la expresión de este gen (Figura 17).

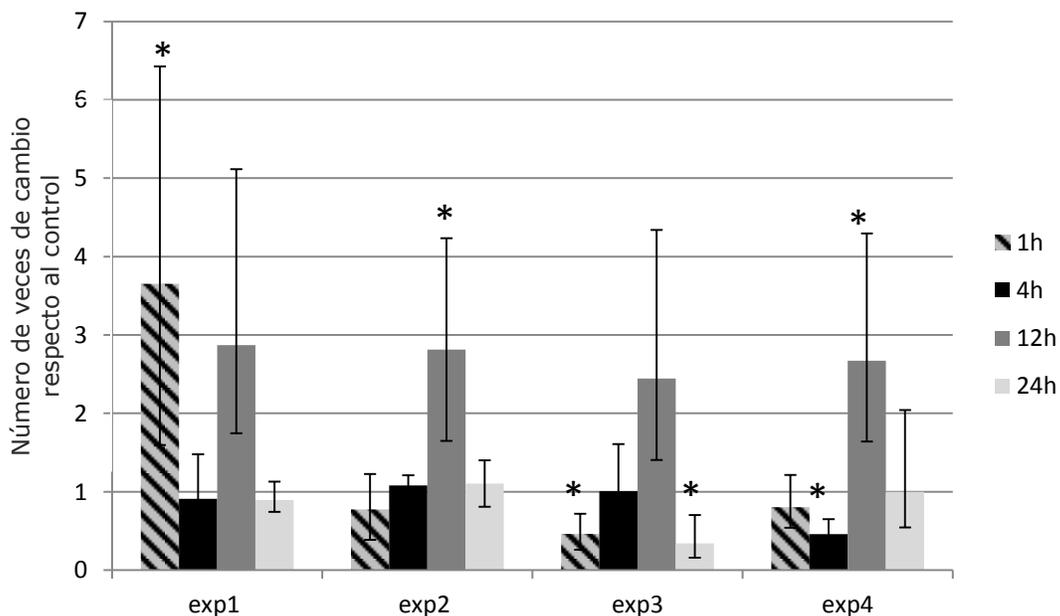


Figura 17. Cambio en la expresión génica de MMP10 por el método de $\Delta\Delta Ct$ al entrecruzar a CD13 por 1h, 4h, 12h y 24h en células U-937. *, Diferencia estadística ($P < 0,05$), el análisis se realizó con el programa REST 2009.

7.5. Inhibición de la síntesis de proteínas con cicloheximida.

Es importante determinar si la síntesis de proteínas influye durante la agregación homotípica, para lo que se utilizó un inhibidor de la síntesis de proteínas (cicloheximida) a distintas concentraciones (1mg/mL, 5mg/mL y 10mg/mL) durante el entrecruzamiento de CD13 con el anticuerpo.

En la Figura 18 se muestran los porcentajes de agregación, cuantificando por el método descrito en la metodología con el programa Quantity One. El porcentaje de agregación observado en presencia todas las concentraciones de cicloheximida es similar al observado en las células con solo el anticuerpo y no se encontró una diferencia estadísticamente significativa. En la Figura 19 se observan imágenes representativas de la agregación homotípica a las 4h, 12h y 24h en presencia de distintas concentraciones de cicloheximida. Se aprecia que no hay diferencia entre el tamaño de los agregados debida al tratamiento con el inhibidor. Estos resultados sugieren que no es necesaria la síntesis de proteínas *de novo* para el fenómeno de agregación homotípica inducido por el entrecruzamiento de CD13.

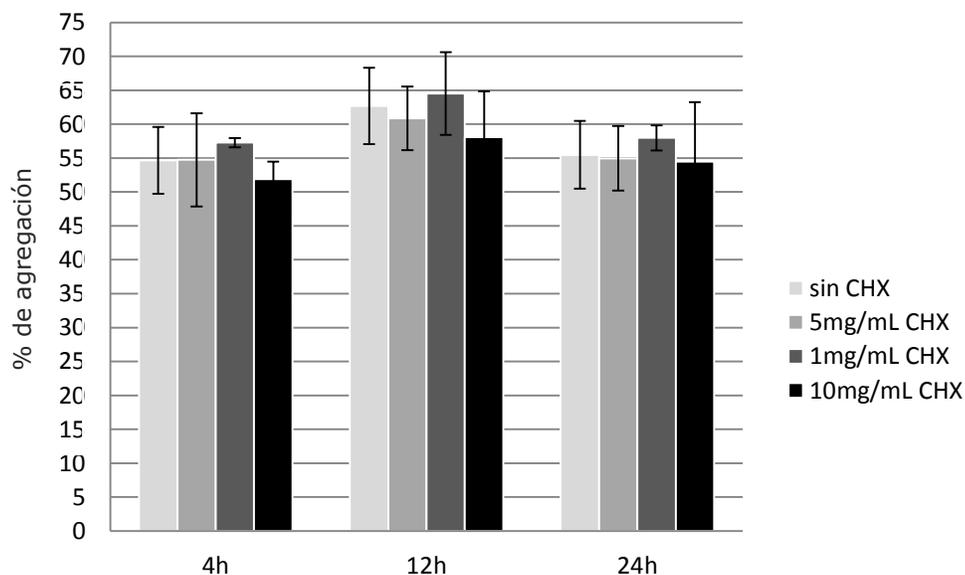


Figura 18. Porcentaje de agregación homotípica de células U-937 inducida por el anticuerpo 452 (anti-CD13), a distintos tiempos (4, 12 y 24h) con diferentes concentraciones de cicloheximida (sin cicloheximida, 1mg/mL, 5mg/mL y 10mg/mL).

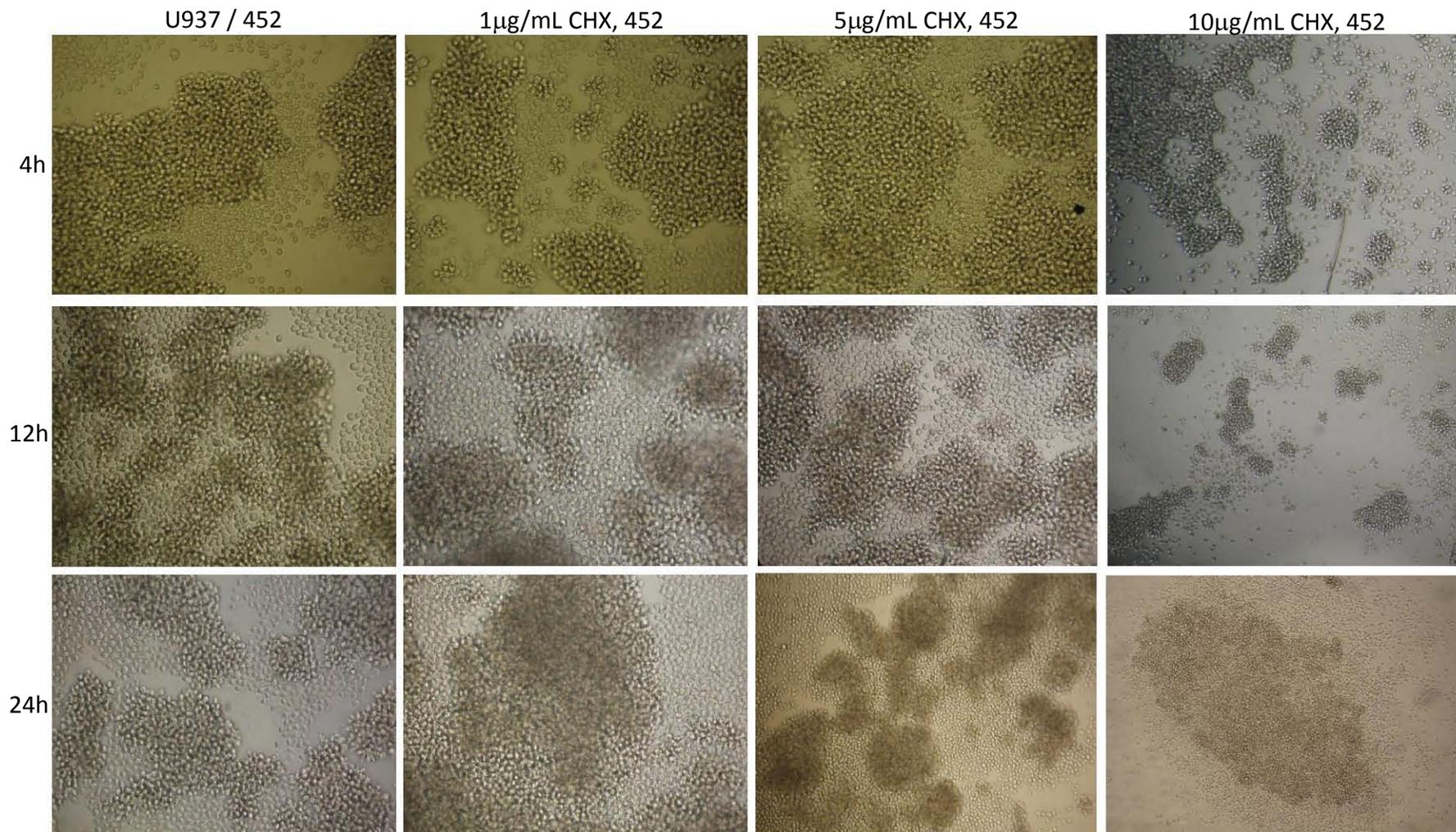


Figura 19. Agregación homotípica de células U-937 (4h, 12h y 24h). Fotografías representativas de 3 distintos experimentos con y sin cicloheximida.

8. Discusión

La adhesión celular es importante durante diversos procesos fisiológicos como la angiogénesis, la embriogénesis, procesos inmunológicos (presentación de antígeno, migración celular, citotoxicidad y fagocitosis), etc. Además, es crucial para la metástasis y la invasividad de tumores cancerosos de distinto origen (gástrico, colón, etc.) [27-29]. Para llevar a cabo la adhesión, las células hacen uso de algunas de las moléculas de adhesión (integrinas, selectinas, cadherinas, proteoglicanos y moléculas pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas) y moléculas de la matriz extracelular (fibronectinas, lamininas, metaloproteasas de matriz, colágenas y elastina), que se asocian entre si ya sea de manera homofílica o heterofílica o bien pueden activar o desactivar a otras proteínas en el caso de las metaloproteasas de matriz [7, 9 y 18].

En el laboratorio se describió la agregación homotípica en monocitos aislados de sangre periférica, células U-937 (línea celular promonocítica) y células THP-1 (línea celular monocítica), al entrecruzar a CD13 con anticuerpos monoclonales anti-CD13 [4]. Este fenómeno puede deberse a que la estimulación de la célula a través de CD13 induzca la activación de receptores o moléculas de adhesión que se encuentren presentes en la membrana de las células, o bien inducir un aumento en la expresión de moléculas de adhesión.

En este trabajo, se analizaron posibles cambios en el nivel de expresión de moléculas de adhesión y de matriz extracelular inducido por el entrecruzamiento de CD13 en células U937. Debido a que la agregación homotípica llega a un máximo después de 4h de inducir el entrecruzamiento de CD13 y se mantiene hasta las 24h, se analizó la expresión de ARNm a las 12h de entrecruzar a CD13 y se comparó con

la expresión en células en que no se indujo agregación homotípica. Ya que la agregación alcanza un máximo aproximadamente a las 12h y se mantiene hasta las 24h, se consideró que a las 12h fuese probable que pudiesen detectarse cambios en la transcripción de los genes de moléculas de adhesión. Con los resultados que se obtuvieron empleando un arreglo comercial que analiza la expresión de 84 genes de moléculas de adhesión y de matriz extracelular, se encontraron 4 genes cuya transcripción muestra una tendencia a aumentar tras el entrecruzamiento de CD13 (CNTN1, SELE, MMP10 y COL6A2).

Contactina 1 (gen CNTN-1) es una molécula de adhesión neuronal que se relaciona con el desarrollo del sistema nervioso, se encuentra anclada a la membrana junto a una proteína G [37]. Este gen se ha encontrado sobreexpresado en análisis realizados en líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar. Su participación en procesos de adhesión y migración se demostró al inhibirse la capacidad de invasividad de estas células en ensayos en matrigel cuando se suprimió la expresión de esta molécula, o bien una menor metástasis en un modelo animal transfectado con un ARN de interferencia para CNTN-1 [36]. La colágena 6 α 2 (gen COL6A2) es una de las 3 cadenas α de la colágena VI, que es una molécula de matriz extracelular capaz de interactuar con otras moléculas presentes en la matriz (fibronectina u otras colágenas) para formar una especie de red alrededor de la célula. Mutaciones en esta molécula han sido asociadas a la distrofia muscular [19 y 20]. La expresión de selectina E (gen SELE) se induce en células endoteliales por IL-1 y FNT α ; esta selectina participa en la diapedesis de leucocitos hacia los tejidos, mediando el rodamiento de los leucocitos [9 y 12]. Se ha observado que la expresión de la selectina E y de otras moléculas de adhesión aumenta cuando células endoteliales se exponen a nicotina [38].

En el caso de monocitos o líneas celulares de este linaje (U-937 y THP-1), la expresión de contactina-1 es muy baja o nula. Incluso en datos reportados en GeoProfiles (NCBI) su cuantificación por medio de Affimetrix Genechip, se encuentra por debajo del límite de detección para una cuantificación confiable. De igual manera la expresión de selectina E y colágena 6 α 2 se encuentra por debajo de los niveles de detección del sistema utilizado [43].

La MMP10 forma parte de la matriz extracelular, su función consiste en cortar a otras metaloproteasas de matriz o a otras proteínas presentes en la matriz extracelular para activarlas. Se le ha visto sobreexpresada en varios tipos de cánceres [42]. Esta molécula tiene una baja expresión en monocitos aunque aparentemente es un poco mayor a contactina-1, selectina E y colágena 6 α 2 [43], sin embargo en los ensayos realizados en estos datos la expresión se encuentra por debajo del nivel de detección confiable.

En vista de que los experimentos con el arreglo de moléculas de adhesión y de matriz extracelular mostraron datos sugerentes de que la transcripción para MMP10, CNTN1, COL6A2 y SELE aumenta a consecuencia del entrecruzamiento de CD13, se decidió realizar un análisis posterior de la transcripción de estos genes por PCR en tiempo real a distintos tiempos (1h, 4h, 12h y 24h). Para esto, se diseñaron iniciadores que permitieran evaluar de forma cuantitativa la cantidad de ARNm en las muestras de células agregadas y sin agregar. Debido a que el nivel de expresión de estos genes es muy bajo en estas células, se trató de aumentar la sensibilidad de la detección efectuando una pre-amplificación antes de realizar la reacción de PCR. Sin embargo, aunque al realizar la estandarización del método con pre-amplificación se obtuvo una buena eficiencia y reproducibilidad, tampoco con esta variación se logró cuantificar de manera confiable la expresión de estos genes en las

células U-937, ya que a pesar de que se logró tener el amplificado deseado para los genes CNTN1 y COL6A2, también había la amplificación de dímeros entre los iniciadores debido a la poca cantidad de ARNm de estos, de tal manera que estos genes pueden estar pasando de tener una nula expresión a comenzar a expresarse.

La cantidad de ARN mensajero para la metaloproteasa 10 (MMP10) mostró una tendencia a aumentar a las 12h, al igual que los resultados obtenidos con el arreglo. Debido a que la expresión del gen es baja no se pudo obtener exactamente el número de veces que aumenta su expresión, pero en los cuatro experimentos realizados se obtuvo un aumento de su expresión de entre 2,5 y 3 veces, siendo estadísticamente significativo en dos de los experimentos realizados.

La metaloproteasa 10 se ha visto implicada en la invasividad y metástasis de tumores junto con otros tipos de metaloproteasas (MMP3 y MMP1) y se ha visto sobreexpresada también en muestras de pacientes con cáncer gástrico; al inhibirse esta sobreexpresión disminuyó la capacidad migratoria de estas células cancerosas [41]. En otro tipo de cáncer, en linfoma de células T también se vio que al entrar en contactos las células cancerosas con células epiteliales se induce la expresión de esta metaloproteasa (MMP10), la cual es dependiente de la interacción entre LFA-1 e ICAM-1 [42]. En otros estudios realizados en muestras de colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn, se encontró a la metaloproteasa 10 con una mayor expresión comparado con un tejido normal. También durante procesos como la reparación de tejidos (tejido muscular) se observó que aumenta la expresión de MMP10 lo que probablemente indique que participa durante la formación de la membrana basal [39-40]. Por otra parte, CD13 se ha encontrado sobreexpresado en distintos tipos de cánceres e inclusive se le ha asociado con una mala prognosis. Entonces es interesante que al

entrecruzar a CD13 aumente la transcripción del gen MMP10, lo que pudiera dar lugar a una célula cancerosa con una mayor capacidad para invadir otros tejidos. Sin embargo es importante ver si este cambio en la transcripción también se encuentre reflejado en la cantidad de proteína sintetizada al entrecruzar a CD13 y que esto le confiriera una mayor capacidad para migrar y adherirse a otros tejidos.

En este trabajo se analizaron cambios en la expresión génica de un gran número de moléculas de adhesión, pertenecientes a distintas familias (integrinas, cadherinas, selectinas, superfamilia de las inmunoglobulinas y varias moléculas que pertenecen a la matriz extracelular). Es interesante que ninguna proteína de la familia de las integrinas, que se encuentran frecuentemente implicadas en procesos de adhesión de leucocitos, mostrara cambios en el nivel de transcripción. Se sabe que fenómenos de adhesión mediados por estas proteínas pueden ocurrir por cambios en su expresión génica que resultan en un cambio en su nivel de expresión en membrana, o por cambios de expresión debidos a la fusión de vesículas que contienen ya a la proteína, o bien a su activación, es decir cuando la integrina cambia su conformación para pasar de un estado de baja afinidad a un estado de mayor afinidad por su ligando. En trabajos previos, se analizó si en células U-937 el entrecruzamiento de CD13 inducía cambios en el nivel de expresión en membrana de las integrinas β_1 , β_2 y α_L (CD29, CD18 y CD11a respectivamente) por medio de citometría de flujo, sin embargo no se encontró un aumento en ninguna de las proteínas analizadas, lo que está de acuerdo con los resultados de este trabajo en el que no se encontraron aumentos en su nivel de transcripción.

Los datos del nivel de expresión muestran que estas células (U-937) tienen una expresión génica alta de varias cadenas pertenecientes a la familia de las integrinas (ITGA4, ITGA5, ITGA6, ITGAL, ITGAV,

ITGB1 e ITGB2) en las células sin ningún estímulo. El estado de activación de estas integrinas, se puede analizar mediante anticuerpos monoclonales comerciales que reconocen solo la forma activada de la integrina mediante tinciones. En este respecto, cabe mencionar que datos del laboratorio han demostrado que la integrina CD11b pasa a su conformación de alta afinidad cuando se estimula a la célula a través de CD13 después de 5 y 10min de entrecruzar con el anticuerpo monoclonal anti-CD13. Para determinar si este cambio en la afinidad de esta integrina participa en la agregación homotípica, podría determinarse si anticuerpos anti CD11b inhiben la agregación homotípica inducida por CD13. Por otra parte también se puede analizar si las integrinas (ITGA4, ITGA5, ITGA6, ITGAL, ITGAV, ITGB1 e ITGB2) aumentan su nivel de expresión en membrana tras el entrecruzamiento de CD13, a pesar de que no haya un aumento en su transcripción, debido a la fusión de vesículas que contengan a la proteína.

Respecto al fenómeno de la agregación homotípica, nuestros datos indican que la síntesis de proteínas no tiene relevancia para que este proceso comience ni para que se mantenga a lo largo de 24h después de entrecruzar a CD13. En los experimentos realizados con un tratamiento previo de un inhibidor de la síntesis de proteínas (cicloheximida) los resultados no mostraron un cambio en el porcentaje de agregación entre inducir la agregación con el inhibidor o sin el.

En este trabajo encontramos que la agregación homotípica de las células U937 como consecuencia del entrecruzamiento de CD13 no induce cambios a nivel de ARNm de una batería amplia de moléculas de adhesión, y que tampoco depende de la síntesis de proteínas. El fenómeno de agregación homotípica no se explica con la inducción de distintas moléculas de adhesión, por lo que este trabajo apunta a que la

adhesión sea un fenómeno dependiente de activación de moléculas ya presentes en la membrana de la célula.

9. Conclusiones

- ❖ El entrecruzar a CD13 en células U-937 con el anticuerpo monoclonal 452, induce una agregación homotípica la cual después de 12h lleva a una mayor transcripción del gen para metaloproteasa de matriz 10 siendo dos a tres veces mayor que el control.
- ❖ En la línea celular U-937, la expresión de CNTN-1, COL6A2 y SELE es demasiado baja para poderla cuantificar aun con un método de pre-amplificación estandarizado. Para el caso de CNTN-1 y COL6A2 a pesar de las complicaciones de la técnica se observa una tendencia a la estimulación de su expresión.
- ❖ La inhibición de la síntesis de proteínas, no tuvo ningún efecto sobre el porcentaje de agregación homotípica.
- ❖ La agregación homotípica puede estar mediada por moléculas de adhesión que ya se encuentren en la membrana, pudiendo solo modificar su activación como el caso de las integrinas.
- ❖ El aumento de la transcripción del gen MMP10 puede reflejar un cambio en la cantidad de proteína que se sintetiza, lo que puede repercutir en un efecto sobre otros procesos distintos a la agregación homotípica, como podría ser la capacidad migratoria de estas células.

10. Referencias

1. Mina-Osorio P. (2008) The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends in Molecular Medicine* 14:361-370.
2. Riemann D., Kehlen A., Langner J. (1999) CD13 – not just a marker in leukemia typing. *Immunology today* 20:83-88.
3. Navarrete Santos A., Langner J., Herrmann M., and Riemann D. (2000) Aminopeptidase N/CD13 Is Directly Linked to Signal Transduction Pathways in Monocytes. *Cellular Immunology* 201:22-32.
4. Mina-Osorio P., Shapiro L., Ortega E. (2006) CD13 in cell adhesion: aminopeptidase N (CD13) mediates homotypic aggregation of monocytic cells. *Journal of Leukocyte Biology* 79:719-730.
5. Mina-Osorio P., Ortega E. (2006) Aminopeptidase N (CD13) functionally interacts with FcγRs in human monocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 77:1008-1017
6. Mina-Osorio P., Winnicka B., O’Conor C., Grant C., Vogel L., Rodriguez-Pinto D., Holmes K., Ortega E., Shapiro L. (2008) CD13 is a novel mediator of monocytic/endothelial cell adhesion. *Journal of Leukocyte Biology* 84:448-459.
7. Müller U (2005) Cell Adhesion Molecules and Human Disorders. *Encyclopedia of Life Sciences*. DOI: 10.1038/npg.els.0005169.
8. Xutglà M., Otero MJ., Sánchez JE. (1997) Moléculas de adhesión en las interacciones entre los leucocitos, el endotelio y la matriz extracelular (I). Estructura, distribución y función biológica. *Medicina clínica* 108:472-477.

9. Vleminckx K (2001) Adhesive Specificity and the Evolution of Multicellularity. *Encyclopedia of Life Sciences*. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001273.pub2
10. Saiki I., Yoneda J., Abe U., Nakajima O., Tsuruo T. and Azuma I. (1993) Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor-cell invasion and extracellular matrix degradation. *International Journal of Cancer* 54:137-143
11. Lam S., Loftus J. (2005) Integrins. *Encyclopedia of Life Sciences*. DOI: 10.1038/npg.els.0005910
12. Lucila S., von Andrian U. (2005) Immunological Adhesion and Homing Molecules. *Encyclopedia of Life Sciences*. DOI: 10.1038/npg.els.0003990
13. Giancotti F. G., et al. (1999) Integrin Signaling. *Science* 285:1028-1032.
14. Halbleib J., Nelson J. (2006) Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes and Development* 20:3199-3214.
15. Ley K., Laudanna C., Cybulsky M. I. and Nourshargh S. (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology* 7:678-689.
16. Davies J. A. (2001) Extracellular Matrix. *Encyclopedia of Life Sciences*. DOI: 10.1038/npg.els.0001274
17. Berrier A., Yamada K. (2007) Cell-Matrix Adhesion. *Journal of Cellular Physiology* 213:565-573.
18. Meredith J. E., Fazeli B. and Schwartz M. (1993) The Extracellular Matrix as a Cell Survival Factor. *Molecular Biology of the Cell* 4:953-961.

19. Ricard-Blum S. (2010) The collagen family. *Cold Spring Harb Perspectives in Biology*. DOI: 10.1101/cshperspect.a004978.
20. Gelse K., Pöschl E., Aigner T. (2003) Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55:1531-1546.
21. Juliano R. L. and Haskill S. (1993) Signal Transduction from the Extracellular Matrix. *The Journal of Cell Biology* 120:577-585.
22. Werb Z., Tremble P. M., Behrendtsen O., Crowley E., and Damsky C. (1989) Signal Transduction through the Fibronectin Receptor Induces Collagenase and Stromelysin Gene Expression. *The Journal of Cell Biology* 109:877-889.
23. Durbeej M (2010) Laminins. *Cell and Tissue Research* 339:259-268.
24. Kessenbrock, Plaks, and Werb (2010) Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell* 141:52-67.
25. Bohórquez-Sierra J. C. (2006) Metaloproteinasas de matriz: su implicación en las enfermedades vasculares periféricas. *Angiología* 58:269-277.
26. Giambernardi, Grant, Taylor, Hay R., Maher V., McCormick J., and Klebe R. (1998) Overview of Matrix Metalloproteinase Expression in Cultured Human Cells. *Matrix Biology* 16:483-496.
27. Glinsky V., Glinsky G. V., Glinskii O., et al. (2003) Intravascular Metastatic Cancer Cell Homotypic Aggregation at the Sites of Primary Attachment to the Endothelium. *Cancer Research* 63:3805-3811.

28. Montoya M. C., Sancho D., Vicente-Manzanares M., Sánchez-Madrid F. (2002) Cell adhesion and polarity during immune interactions. *Immunological Reviews* 186:68-82.
29. Bischoff J. (1997) Cell Adhesion and Angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation* 99:373-376.
30. Giugni, T.D. et al. (1996) Neutralization of human cytomegalovirus by human CD13-specific antibodies. *J. Infect. Dis.* 173:1062–1071.
31. Rahbar, A. et al. (2006) Detection of cytotoxic CD13-specific autoantibodies in sera from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Journal of Autoimmunity.* 26:155-164.
32. Todd I. (2010) Cells of the Immune System. *Encyclopedia of Life Sciences.* DOI: 10.1002/9780470015902.a0001123.pub3
33. Bogdan C. (2006) Macrophages. *Encyclopedia of Life Sciences.* DOI: 10.1038/npg.els.0004007
34. Abbas, A. Lichtman, A. Pillai, S. (2008) Inmunología celular y molecular. 6ta ed. Elsevier. Barcelona, España.
35. Kindt T., Goldsby T., Osborne A., Kuby J. (2007) Immunology.
36. Jen-Liang Su, Ching-Yao Yang, Jin-Yuan Shih, et al. (2006) Knockdown of Contactin-1 Expression Suppresses Invasion and Metastasis of Lung Adenocarcinoma. *Cancer Research* 63:2553-2561.
37. Revest J. M., Faivre-Sarrailh C., Maeda N., Noda M., Schachner M., Rougon G. (1999) The interaction between F3 immunoglobulin domains and protein tyrosine phosphatases ζ/β triggers bidirectional signalling between neurons and glial cells. *The European Journal of Neuroscience* 11:1134-1147.

38. Alamanda V., Singh S., Lawrence N. J., Chellappan S. P. (2012) Nicotine-mediated induction of E-selectin in aortic endothelial cells requires Src kinase and E2F1 transcriptional activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 418:56-61.
39. Vaalamo M., Karjalainen-Lindsberg M-L., Puolakkainen P., Kere J., and Saarialho-Kere U. (1998) Distinct Expression Profiles of Stromelysin-2 (MMP-10), Collagenase-3 (MMP-13), Macrophage Metalloelastase (MMP-12), and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-3 (TIMP-3) in Intestinal Ulcerations. *American Journal of Pathology* 152:1005-1014.
40. Rechart O., Elomaa O., et al. (2000) Stromelysin-2 is Upregulated During Normal Wound Repair and is Induced by cytokines. *The Society for Investigative Dermatology* 115:778-787.
41. Van Themsche C., Alain T., Kossakowska A. E., Urbanski S., Potworowski E. and St-Pierre Y. (2004) Stromelysin-2 (Matrix Metalloproteinase 10) Is Inducible in Lymphoma Cells and Accelerates the Growth of Lymphoid Tumors In Vivo. *Journal of Immunology* 173:3605-3611.
42. Ming-Hsun Wu, Yo-Ting Tsai, Kuo-Tai Hua, Kun-Che Chang, Min-Liang Kuo, Ming-Tsan Lin (2012) Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid inhibit macrophage-induced gastric cancer cell migration by attenuating the expression of matrix metalloproteinase 10. *The Journal of Nutritional Biochemistry*.
43. Gebhard C., Schwarzfischer L., Pham T. H., Schilling E., et al. (2006) Genome-wide profiling of CpG methylation identifies novel targets of aberrant hypermethylation in myeloid leukemia. *Cancer Research* 66(12):6118-28.

11.1 Anexo I

PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real es un método de amplificación y cuantificación utilizado en biología molecular para el análisis de secuencias blanco de ácidos nucleicos, ya sea ADN o ARN.

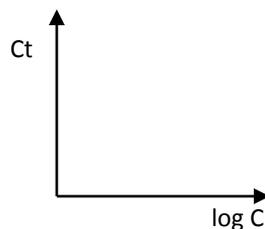
El método consiste en amplificar la secuencia blanco (ADN o cDNA) deseada y cuantificar esta amplificación con la ayuda de un fluoróforo el cual es afín a ADN de doble cadena, de tal manera que conforme aumente la cantidad de nuestro amplificado a lo largo de la reacción, se podrá cuantificar con un termociclador capaz de medir la fluorescencia en cada ciclo de la reacción.

La técnica de PCR en tiempo real tiene diversas aplicaciones, dentro de las cuales está la cuantificación de expresión génica, por medio de una cuantificación relativa en la que se comparan la expresión de mRNA presente en dos diferentes muestras, considerando una de ellas como referencia, este método se conoce como método de Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$).

Para el método de $\Delta\Delta Ct$ se debe realizar una validación de las reacciones para los diferentes genes blancos, calculando la eficiencia de la reacción de cada uno a través de una curva estándar, realizando lo siguiente:

1. Hacer diluciones de ADN que se amplificará y luego la reacción de PCR de cada una de las diluciones por triplicado.

2. Los valores de Ct que se obtengan se grafican contra el logaritmo de las cantidades de ADN.



3. Se calcula una regresión lineal de esta gráfica, en la que el valor de la pendiente (m) que se obtiene es $-3,32 \pm 10\%$, con un índice de correlación de 0,99.

4. El cálculo de la eficiencia se realiza según la ecuación:

$$Eficiencia = [10^{-1/m} - 1] \times 100$$

❖ Método comparativo de $\Delta\Delta Ct$

Se obtienen los Ct 's de cada condición para cada gen problema (Ct_{prob}) y para los genes endógenos (Ct_{end}). Se calcula un ΔCt restando:

$$\Delta Ct = Ct_{prob} - Ct_{end}$$

Para el análisis del arreglo de moléculas de adhesión y de matriz extracelular se calculó un promedio de los genes endógenos y este fue el que se restó a los genes problema.

$$Ct_{Pr\ end} = \frac{(Ct_{ACTB} + Ct_{HPRT1} + Ct_{B2M} + Ct_{GAPDH} + Ct_{RPL13A})}{5}$$

$$\Delta Ct = Ct_{prob} - Ct_{Pr\ end}$$

Después se calcula el $\Delta\Delta Ct$, para comparar los distintos genes problema entre los controles (ctrl) y las células estimuladas (est).

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{est} - \Delta Ct_{ctrl}$$

Por último se calcula el número de veces de cambio de cada gen problema:

$$\# \text{ veces de cambio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

11.2 Anexo II
Temperaturas de disociación

Arreglo de moléculas de adhesión y de matriz extracelular (SABioscience)

Gen	Td					
	E1		E2		E3	
	Ctrl/12h	452/12h	Ctrl/12h	452/12h	Ctrl/12h	452/12h
ITGA1	78.2	78.2	78.2	78.2	80.6	78.4
ITGA2	79.5	79.6	79.5	79.5	79.9	79.7
ITGA3	83.8	83.6	83.8	83.8	83.6	84
ITGA4	75.5	75.8	76.8	75.8	75.8	75.7
ITGA5	81.2	81.2	81.2	81.2	81.3	81.4
ITGA6	77.8	77.8	77.5	77.9	77.9	77.7
ITGA7	87.7	86.7	87	87.7	76.2	87.9
ITGA8	81.5	79.9	80.5	79.2	86.6	71.3
ITGAL	80.9	81.9	80.8	80.8	81	80.7
ITGAM	74.8	75.4	74.5	75.8	74.8	75.4
ITGAV	77.8	78.2	77.8	77.9	77.9	77.7
ITGB1	80.1	79.9	79.5	80.2	79.9	80
ITGB2	81.2	81.2	81.5	81.2	81.3	81.4
ITGB3	82.5	82.2	82.5	82.5	87	77.4
ITGB4	83.5	83.3	83.4	83.5	88	83.7
ITGB5	78.2	78.5	78.5	78.5	87.3	78.4
NCAM1	82.8	83	83.1	83.1	68.5	83.3
PECAM1	81.8	81.9	81.8	81.8	81.9	82
SELE	81.8	80.6	84.1	83.5	84.3	83.7
SELL	77.2	77.5	77.5	77.2	77.5	77.4
SELP	81.5	80.9	81.2	81.2	88.6	81
VCAM1	73.8	82.2	86.4	86.7	87.6	82

ICAM1	81.5	81.6	81.5	81.5	81.6	81.7
CD44	80.5	81.6	79.8	80.5	79.6	79
CDH1	80.1	83	79.2	84.1	82.6	83
CNTN1	83.8	83.6	83.8	84.1	85.9	84.3
CTNNA1	81.5	81.9	82.1	81.8	81.9	82
CTNNB1	80.9	80.9	81.2	81.2	81	81
CTNND1	82.8	83	83.1	83.1	83	83
CTNND2	84.2	81.2	70.1	76.2	76.5	72
HAS1	85.8	86	86.1	86.1	86.6	85
COL11A1	87.4	75.8	87.7	82.8	88.6	88.2
COL12A1	80.5	81.6	70.1	85.1	86.3	71
COL14A1	76.8	76.9	77.2	77.2	77.2	77.7
COL15A1	83.5	83.6	83.8	83.8	84	84
COL16A1	82.8	82.7	82.8	82.8	83	83
COL1A1	81.2	81.9	81.5	81.5	71	82.3
COL4A2	76.5	76.5	76.5	76.8	76.8	77.4
COL5A1	79.2	83.3	88.3	83.8	79.3	85.6
COL6A1	86.1	84	83.8	84.5	84.6	85
COL6A2	87.1	88	87.4	84.1	88	85.3
COL7A1	82.2	82.2	82.5	82.5	87	82.3
COL8A1	83.8	78.9	83.8	83.8	87.3	80.4
LAMA1	78.5	78.5	77.2	82.2	78.2	80
LAMA2	82.5	82.7	82.8	82.8	83	82.7
LAMA3	72.4	77.8	79.2	80.2	80.2	79.7
LAMB1	80.9	80.6	81.5	80.8	80.6	81.4
LAMB3	85.8	85.7	85.7	85.8	85.6	85.6
LAMC1	78.2	78.5	78.2	78.5	78.2	78.4
VCAN	81.2	81.2	76.5	76.8	80.6	76.7
CTGF	79.8	85.7	79.8	79.5	88.3	67.9

ECM1	81.2	80.3	81.2	80.8	80.6	81.4
FN1	80.5	80.3	80.5	80.5	80.6	80.7
SGCE	81.5	81.2	81.2	81.2	74.8	81.4
SPARC	84.2	84.3	84.4	84.5	81.6	84.6
SPG7	80.9	80.9	81.2	81.5	81.3	81
SPP1	79.2	78.9	77.8	77.5	78.2	78
TGFBI	67.4	80.9	80.8	74.2	75.8	74
THBS1	75.2	75.4	75.2	75.2	75.5	75.7
THBS2	77.5	77.5	77.5	77.5	77.9	77.7
THBS3	79.5	79.6	79.5	79.5	79.9	80.4
MMP1	80.5	80.3	80.5	80.5	80.6	80.4
MMP10	83.2	78.2	84.4	78.2	85	78.4
MMP11	82.5	82.2	82.5	82.8	81.9	82.7
MMP12	83.2	75.4	78.8	85.8	68.2	75.4
MMP13	77.5	75.8	77.5	77.2	82.6	76.7
MMP14	87.1	87	87.4	87.4	87	85.6
MMP15	85.1	85	85.1	85.1	88	80.4
MMP16	78.8	80.6	86.1	86.4	85.9	76.4
MMP2	78.2	78.5	78.8	79.2	78.2	79.4
MMP3	80.5	77.5	77.5	79.8	78.2	79.4
MMP7	74.2	73.8	73.5	74.2	75.1	75
MMP8	80.1	79.9	79.8	80.2	80.2	80
MMP9	78.8	78.5	78.8	78.8	78.2	79
TIMP1	81.2	80.9	81.2	81.2	81.3	81
TIMP2	85.5	85.7	85.7	85.8	85.9	85.9
TIMP3	82.2	82.2	82.5	82.5	80.6	82.3
ADAMTS1	77.2	79.6	83.8	88.4	85.9	79
ADAMTS13	85.1	85.3	85.4	85.4	86.6	85.6
ADAMTS8	81.8	83.3	83.8	83.5	85.3	83.3

Genes endógenos						
B2M	78.5	78.9	78.5	78.5	78.9	78.4
HPRT1	74.8	75.1	74.8	73.8	75.1	74.7
RPL13A	79.2	79.2	79.5	79.5	79.3	79.4
GAPDH	83.2	83.3	83.4	83.5	83.3	83.3
ACTB	78.8	79.2	79.5	79.2	79.3	79

11.3 Anexo III

Preparación de soluciones y geles de agarosa

✓ Solución TAE 50x

Tris base	12,1g
Ácido acético glacial	2,9mL
EDTA Na ₂	0,93035g

Aforar con agua estéril a 50mL

✓ Solución TAE 1x

TAE 50x	10mL
---------	------

Aforar con agua estéril a 500mL

✓ Solución de Bromuro de Etidio

Bromuro de etidio	10µL
-------------------	------

Aforar con agua estéril a 200mL

✓ Buffer de carga para ARN

Glicerol	9mL
Azul de bromofenol	0,075g
Xilencianol	0,075g

Aforar con agua estéril a 30mL

✓ Agua DEPC 0,1%

Dietilpirocarbonato	1mL
---------------------	-----

Aforar con agua estéril a 1000mL

Se mezcló bien y se dejó reposar por una hora. Después se metió a la autoclave por 20min.

✓ Solución de Etanol al 75%

Etanol absoluto 11,25mL

Aforar con agua inyectable a 15mL

✓ Gel de agarosa al 1,5%

Agarosa 0,3g

TAE 1x 20mL

Se preparó en un matraz Erlenmeyer de 100mL, se mezcló suavemente y se tapó. Se calentó en el microondas por 20s o hasta que hubiese una mezcla homogénea, inmediatamente se vació en la cámara de electroforesis, evitando hacer burbujas y se dejó que se enfriará para que se formara el gel.