



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

”Estudio de la glicoproteína alfa-1 ácida (AGP) en línea celular THP-1. Estandarización de PCR en tiempo real”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

YURIRIA CORTÉS CHI

DIRECTORA DE TESIS: DRA. DIANA AGUILAR LEÓN



México, D. F.

2006



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	FERNANDO GARCÍA TAMAYO
Vocal	MARIA ELENA IBARRA RUBIO
Secretario	DIANA AGUILAR LEÓN
1er suplente	JOSÉ IGNACIO PÁRAMO RAMÍREZ
2º suplente	SONIA MAYRA PÉREZ TAPIA

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN.
DEPTO. PATOLOGÍA.
SECCIÓN PATOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS.
DEPTO. AUTOINMUNIDAD**

DIANA AGUILAR LEÓN
Directora de Tesis

MARIANA TELLEZ ARAIZA
Supervisora técnica

YURIRIA CORTÉS CHI
Sustentante

Este trabajo es producto de la fe, el esfuerzo y la constancia que he aprendido de mis padres, a quienes admiro y dedico con cariño y amor la culminación de esta etapa de mi vida.

A mis hermanos, a quienes quiero y agradezco su existencia, por brindarme su apoyo y alegría incluso en los momentos más estresantes.

A mi familia que siempre me ha brindado la confianza, la motivación y el apoyo incondicional que me hacen ser mejor cada día. Gracias.

A la persona que le da luz a mi vida, Armando, quien es no sólo mi amor, también es mi amigo y compañero, con quien comparto la vida entera. Eternamente gracias

A la Mtra. Aida Navas quien me ayudó a encontrar este camino.

Al Dr. Erasmo por haberme dedicado parte de su valioso tiempo para la culminación de este trabajo y a Diana por toda la experiencia y el conocimiento compartidos, pero sobre todo por el apoyo, la amistad y la confianza que nos ha unido. Con profundo agradecimiento.

A la Dra. Ma. Elena, quien me orientó en la organización de este trabajo. Gracias.

A todos mis compañeros del laboratorio que han hecho de mi estancia en él una etapa sin precedentes. Gracias.

A Juanita con quién enfrenté la realidad de trabajar por primera vez en un laboratorio fuera de la facultad. A Mariana, Liliana y Lalo del INER, y a José, Dulce, Alex y Jaime de Nutrición por compartir su vasta experiencia conmigo. Gracias.

Gracias también a mi amiga Claudia, quien ha sido un gran apoyo y con quien he compartido la peripecias de este camino.

Gracias a todos mis amigos y compañeros de la facultad quienes hicieron inolvidable mi paso por ella.

Sobre todo gracias a dios por permitirme llegar a esta etapa de mi vida

*A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la H. Facultad de Química, a quienes debo mi formación y de donde **siempre** estaré orgullosa de pertenecer. Gracias.*

INDICE

Antecedentes	2
Glicoproteína alfa-1- ácida	2
Estructura	2
Genes que codifican AGP	3
Polimorfismo	3
Producción de AGP hepática y extrahepática	4
Expresión y regulación	5
AGP hepática	5
AGP extrahepática	7
Funciones biológicas	10
Propiedades Inmunomoduladoras	10
Unión a Fármacos	11
Estudio de AGP en la línea celular THP-1	12
Introducción	14
PCR	14
PCR en tiempo real	18
Lipopolisacárido (LPS)	20
Forbol miristato acetato (PMA)	20
Planteamiento del problema	21
Objetivo general	21
Objetivo particular	21
Hipótesis de trabajo	21
Material y métodos	22
Resultados	31
Discusión	35
Conclusiones	39
Perspectivas	40
Bibliografía	41
Anexo I. Abreviaturas	50
Anexo II. Reactivos y soluciones	52

INTRODUCCIÓN

El estudio de AGP en leucemias ha mostrado un incremento en sus niveles plasmáticos, en especial durante la fase de actividad tumoral. En este contexto, se ha detectado que algunos factores solubles obtenidos al cultivar blastos de leucemias mieloides agudas, cuyo peso molecular es similar a la AGP, tienen actividad inmunosupresora [79,80]. También se ha reportado la producción y expresión constitutiva e inducible de AGP en monocitos [41,16].

Entonces, es posible pensar que el aumento de los niveles plasmáticos de AGP en leucemias pueda estar relacionado a un incremento en la expresión génica y la producción de la AGP en células leucémicas respecto a las normales, y que este aumento pueda ser parte de un mecanismo de evasión tumoral.

La utilización de las células THP-1, línea celular derivada de una leucemia mielomonocítica, permitirá establecer las condiciones óptimas para el estudio de la expresión génica, síntesis proteica y glicosilación de la AGP en células tumorales de pacientes con leucemias mielomonocíticas.

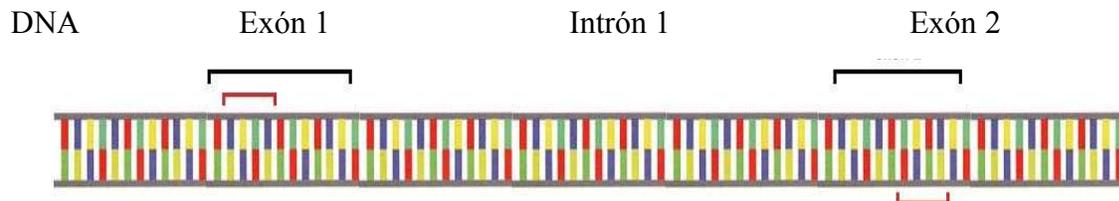
En este trabajo en particular, se establecerán las condiciones óptimas para determinar el comportamiento de la expresión génica de AGP, mediante PCR en tiempo real, al aplicar los estímulos LPS y LPS/PMA en las células THP-1.

PCR

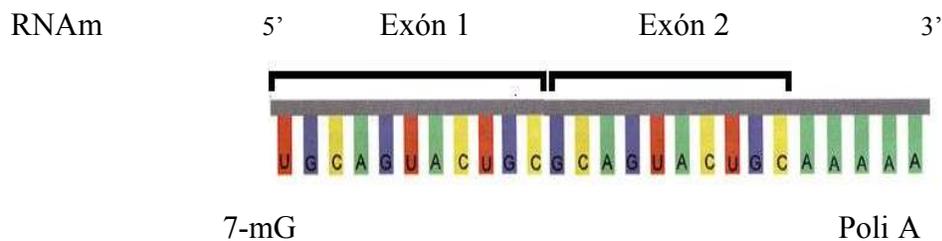
La Reacción en Cadena de la Polimerasa es una herramienta utilizada en la actualidad para amplificar fragmentos de DNA (PCR) o de RNA (RT-PCR) con el fin de detectar secuencias, polimorfismos y mutaciones, entre otras aplicaciones.

La RT-PCR, la variante más importante de la PCR en investigación biomédica, permite estudiar la expresión de genes utilizando como molde el DNA complementario formado a partir de la presencia del RNAm mediante la transcripción inversa.

Los genes en el DNA contienen en su secuencia exones e intrones:

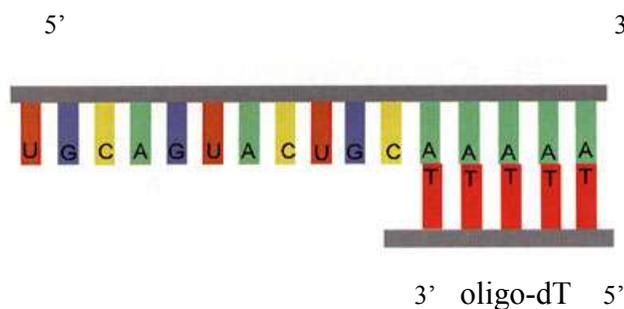


Después de la transcripción, el pre-RNAm sufre varios procesos post-transcripcionales; la adición de un cap (7-metil guanósina) en el extremo 5', la adición de una cola de adeninas (poli-A) en el extremo 3', y la remoción y empalme de los intrones (*splicing*), dando lugar al RNAm:

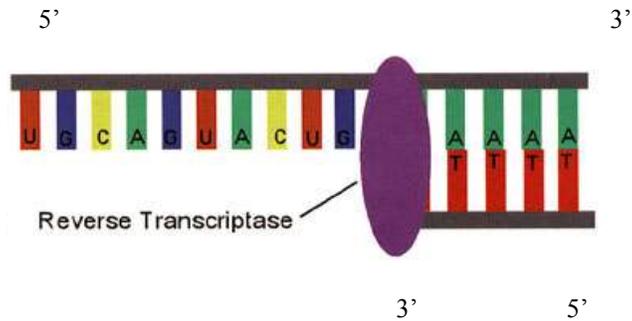


A continuación se presenta la secuencia de los pasos de la RT-PCR:

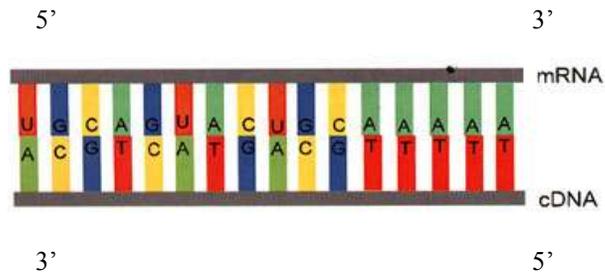
- 1) Unión del oligo-dT (12 a 18 timinas) a la cola de poliadeninas que caracteriza al RNAm



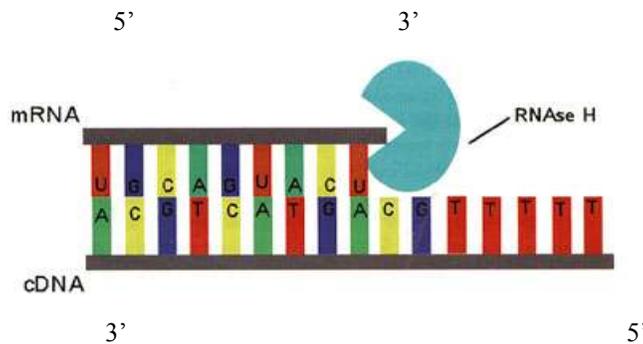
2) Unión de la transcriptasa reversa al complejo RNAm-oligodT



3) Síntesis del DNA complementario



4) El RNAm es removido con RNAsa H. El DNAc está listo para la PCR



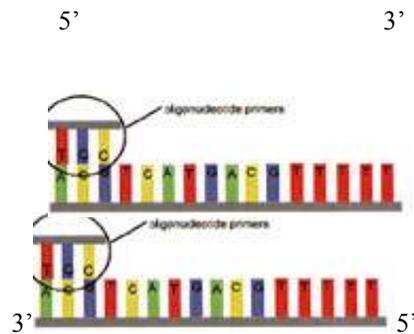
La PCR es un proceso repetitivo de tres pasos consecutivos que incluyen la desnaturalización del DNA, el alineado de los oligonucleótidos específicos y la extensión de la DNA polimerasa. Estos tres pasos están caracterizados por tres

diferentes temperaturas.

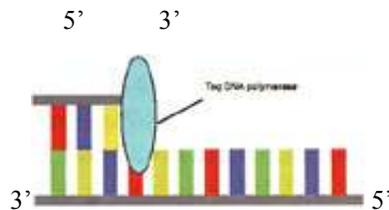
La desnaturalización es la separación de las dos cadenas complementarias de DNA unidas por puentes de hidrógeno fácilmente deshechos con la aplicación de altas temperaturas, 94-95°C.

Los oligonucleótidos son secuencias antisentido (3'-5') de 18 a 22 bases específicos y complementarios a los dos extremos 3' de la secuencia diana.

La temperatura de alineado de los oligonucleótidos varía entre 45° y 70°C, y depende de cada par de oligonucleótidos, de su longitud y del porcentaje de GC.



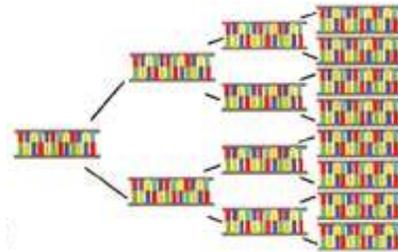
La elongación se lleva a cabo mediante una DNA polimerasa enzimáticamente activa a temperaturas relativamente altas (72°C) y estable hasta 95°C. Generalmente es utilizada la *Taq* polimerasa procedente de la bacteria *Thermus aquaticus*, sin embargo, tiene la desventaja de no poseer actividad de exonucleasa 3'-5'.



Además de las temperaturas óptimas de la enzima, la *Taq* polimerasa necesita $MgCl_2$ como cofactor y dNTP's como sustrato, para formar el DNA de doble cadena.



La aplicación cíclica de estos tres procesos lleva a una amplificación exponencial del producto de PCR que entonces puede ser detectado ya sea por electroforesis en agarosa o bien con agentes intercalantes o sondas marcadas, en el caso de PCR en tiempo real [81].



PCR EN TIEMPO REAL

La PCR tiempo real es una variante de PCR en la cual es posible cuantificar el número de copias del producto esperado, donde los procesos de amplificación y detección se llevan a cabo de manera simultánea y es posible observar la cantidad de DNA sintetizado al final de cada ciclo.

Existen dos tipos de sistemas de detección:

Los agentes intercalantes: fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a DNA de doble hélice, como el SYBR Green.

Las sondas específicas marcadas con fluorocromos donador y aceptor, entre las que se encuentran las TaqMan o sondas de hidrólisis, molecular beacons y sondas FRET [96].

En lo que se refiere al SYBR Green, la señal fluorescente es relativamente baja cuando no está unido al DNA, sin embargo, la señal incrementa significativamente cuando se une al DNA de doble cadena. Esta señal se incrementa proporcionalmente con el aumento de la cantidad de amplicón generado con cada ciclo de amplificación, por eso se usa para la cuantificación del DNA [96].

El principal inconveniente del SYBR Green es su baja especificidad, ya que se une indistintamente a productos inespecíficos o a dímeros de oligonucleótidos, sin embargo, es posible mejorar su especificidad empleando condiciones de reacción óptimas y una selección cuidadosa de los oligonucleótidos para evitar la formación de dímeros. Además, es recomendable iniciar la reacción de síntesis a altas temperaturas para disminuir el riesgo de amplificaciones inespecíficas [96].

En PCR en tiempo real, el número de copias blanco es determinada por el ciclo fraccional al cual se alcanza una cantidad umbral del amplicón (Ct, threshold cycle), en un punto donde el amplicón se es detectable, pero sigue estando dentro de la fase exponencial de la amplificación [82-84]. Los métodos para medir el Ct están basados en monitorear la fluorescencia de la generación del amplicón [85-87].

La cuantificación absoluta se puede llevar a cabo usando una curva estándar, construida al amplificar cantidades conocidas del DNA blanco en un grupo paralelo de reacciones corridas bajo condiciones idénticas que las de la muestra [84-88].

La preparación de una curva estándar con exactitud cuantitativa depende tanto de la exactitud de la cuantificación del DNA estándar, ya sea por densitometría o espectrofotometría, como de la calidad de la construcción de la curva [89-90].

Los estándares pueden ser plásmidos, productos de PCR o bien, DNA genómico. En este trabajo se utilizaron productos de PCR como estándares.

Por otra parte, los estímulos utilizados fueron LPS y LPS/PMA. Existen estudios que han reportado la inducción de la expresión génica de AGP en las células THP-1 con LPS [39,40] así como la diferenciación celular con PMA [91].

LIPOPOLISACÁRIDO (LPS)

El lipopolisacárido bacteriano, es una mezcla de fragmentos de las paredes externas de las bacterias gram negativas, así como un potente activador de los macrófagos. Las respuestas de los macrófagos al LPS están mediadas principalmente por la proteína de unión al LPS (LBP), el CD14 y el receptor 4 de tipo Toll de mamífero. En este sistema, el componente LBP es el transportador del LPS, el CD14 es el receptor de reconocimiento mientras que el receptor de tipo Toll actúa como componente de transducción de señales [92].

La ocupación del receptor activa diversas cinasas citoplásmicas, lo que conduce a la activación de factores de transcripción, principalmente AP-1 y NF- κ B. Los genes activados por estos factores de transcripción codifican citocinas y enzimas del estallido respiratorio [92].

FORBOL MIRISTATO ACETATO (PMA)

El PMA tiene efectos pleiotrópicos en la diferenciación de células normales y malignas. Se ha reportado que induce la diferenciación de las células leucémicas promielocíticas humanas HL-60 en macrófagos y las células leucémicas linfocíticas crónicas humanas en células plasmacitoides [14, 21]. Por otra parte, el tratamiento con PMA transforma las células leucémicas mielomonocíticas THP-1 en células con las características funcionales de macrófagos maduros [91].

La actividad de diferenciación de PMA es mediada por la porción de 62pb en el extremo 5' del elemento regulatorio distal (DRE) del promotor del gen de AGP [31].

ANTECEDENTES

GLICOPROTEÍNA ALFA-1 ÁCIDA (AGP)

La glicoproteína alfa-1 ácida, también llamada orosomucoide (ORM), fue descrita en 1950 por Karl Schmid [1] y Richard J. Winzler et. al. [2]. Esta proteína resultó ser poco usual por su alto contenido en carbohidratos y su punto isoeléctrico (pI) ácido.

Dentro de sus actividades fisiológicas se han descrito varios efectos inmunomoduladores, la habilidad de unirse a fármacos básicos y hormonas esteroideas, así como pertenecer al grupo de los reactantes de fase aguda. Su concentración sérica es estable en condiciones fisiológicas (aproximadamente 1g/L en humano) y se eleva en respuesta al daño en tejidos, inflamación o infección [3].

ESTRUCTURA

La AGP humana es una glicoproteína con peso molecular de 41 a 43 kDa, un pI de 2.8 a 3.8 y un alto contenido de carbohidratos, 45%, en forma de cinco glicanos [4].

Este polipéptido tiene una cadena simple de 183 aminoácidos con dos puentes disulfuro. Existen dos variantes, ORM1 y ORM2, codificados por dos genes diferentes, entre las cuales hay una diferencia de 22 aminoácidos [5]. Además, en las posiciones 32 y 47, puede haber sustitución de aminoácidos, lo que es reflejo del polimorfismo que distingue a esta proteína.

La AGP es una de las pocas glicoproteínas que contienen glicanos tetra-antenarios, además de glicanos di y tri-antenarios y tiene cinco sitios de N-glicosilación: Asn-15, -38, -54, -75 y -85. Uno de los azúcares terminales más comunes de los glicanos de AGP es el ácido neuramínico (NeuAc) y es el que explica su pI excepcional. Otro azúcar terminal común es la fucosa, de hecho, un alto grado de fucosilación está asociado con un bajo contenido o ausencia total de glicanos di-antenarios, y con un alto contenido de glicanos tri y/o tetra-antenarios [3]. Existen de 12 a 20 glicofomas de

AGP en suero humano normal; la glicosilación en el sitio 1 (Asn-15) nunca tiene glicanos tetra-antenarios, el sitio 2 (Asn-38) no tiene glicanos con fucosa, el 4 (Asn-75) nunca tiene glicanos di-antenarios, y sólo los sitios de glicosilación 4 y 5 (Asn-85) tienen glicanos tetra-antenarios con más de una fucosa.

La microheterogeneidad que le confieren estas glicoformas depende de las condiciones fisiopatológicas, como son reacciones de fase aguda, embarazo, artritis reumatoide severa, cirrosis hepática alcohólica y hepatitis. Estos cambios en la glicosilación pueden, por supuesto, modificar las funciones biológicas de AGP [6-9].

GENES QUE CODIFICAN AGP

La AGP humana es el producto de tres genes adyacentes: AGP-A, AGP-B y AGP-B' que ocupan 70kb del genoma localizados en el cromosoma 9. El gen AGP-A se expresa activamente en el hígado y codifica para la mayor parte de la AGP sérica, la variante ORM1. Los genes AGP-B y AGP-B' son idénticos, se expresan al menos 100 veces menos que AGP-A, y codifican para la variante ORM2 [10]. Es importante destacar que solamente AGP-A puede ser inducido por un estímulo de fase aguda. La región codificadora de AGP, 6.6 kb, está compuesta por seis exones y cinco intrones, además de una región de flaqueo en 5' de 1.2kb y en 3' una de 2kb [11].

POLIMORFISMO

El polimorfismo genético clásico ocurre en los productos más abundantes, los controlados por el locus ORM1, el cual es altamente polimórfico. ORM1 está dividido en dos alelos, ORM*F y ORM*S, a su vez, ORM*F se divide en dos subtipos de alelos, ORM1*F1 y ORM1*F2. ORM1*F1 y ORM1*S se observan alrededor del mundo, mientras que ORM*F2 es común en poblaciones europeas. El locus ORM2 es monomórfico en la mayoría de las poblaciones [12].

El polimorfismo de ORM1 se genera cuando se reemplaza una glutamina por una

arginina. Las sustituciones de aminoácidos son causadas por una transición de adenina a guanina en el codón 20 del exón 1 y en el codón 156 del exón 5 de la AGP-A. ORM1*F1 está caracterizada por los tripletes CAG (Gln) y GTG (Val), ORM1*F2 por los tripletes CAG (Gln) y ATG (Met), y ORM1*S por los tripletes CGG (Arg) y GTG (Val) [12].

PRODUCCIÓN DE AGP HEPÁTICA Y EXTRAHEPÁTICA

La AGP es una de las proteínas plasmáticas sintetizadas principalmente por el hígado, aunque también se ha reportado su expresión extrahepática.

La producción hepática de las proteínas de la fase aguda se incrementa en respuesta a varios estímulos: traumas físicos como cirugías ó heridas, infecciones bacterianas, o estímulos inflamatorios inespecíficos [13]. Estas proteínas de la fase aguda se dividen en dos tipos, las tipo 1, reguladas por IL-1, IL-6 y glucocorticoides, y las tipo 2, reguladas por citocinas tipo IL-6 y glucocorticoides [14]. La AGP se encuentra dentro de las proteínas tipo 1 de fase aguda.

La producción extrahepática de AGP y otras proteínas de fase aguda ha sido descrita en las últimas cuatro décadas. Actualmente se admite que la producción de AGP en células extrahepáticas puede ser regulada por mediadores inflamatorios en forma similar a lo que ocurre con las células hepáticas.

En 1978 Gahmberg y Andersson [15] describieron que al usar anticuerpos específicos contra AGP humana se pudieron marcar linfocitos, granulocitos y monocitos humanos. Otros estudios han evidenciado que al cultivar granulocitos humanos, la línea celular de monoblastos humana THP-1 [16], monocitos circulantes y macrófagos tisulares [16,17] se puede detectar la síntesis y secreción de AGP, no así cuando se cultivan los linfocitos T ni B [16].

Por otra parte, se ha establecido una estrecha relación entre AGP y cáncer desde 1977, cuando Twining y Brecher [18] identificaron AGP en tumores de mama, colon, tejido anal, estómago, íleon y pulmón, aunque otros autores reportaron la presencia de AGP en tejido normal de miocardio [19].

Además de que la síntesis de AGP depende principalmente del proceso de transcripción, es una proteína que está presente en los gránulos secundarios de los neutrófilos, y es exocitada en respuesta a la activación. Dado que los neutrófilos constituyen la principal línea de defensa en los sitios de infección y daño, Theilgaard-Mönch y cols. [20], han propuesto que la AGP derivada de los neutrófilos lleva a cabo acciones inmunomoduladoras locales durante la fase inicial de la respuesta inmune.

Es posible que la producción local de AGP en el sitio inicial de la reacción de fase aguda contribuya a mantener la homeostasis reduciendo el daño del tejido involucrado en el proceso inflamatorio y modulando no sólo la respuesta inmune sistémica sino también la respuesta local [3].

EXPRESIÓN Y REGULACIÓN

AGP hepática

La IL-1, IL-6 y glucocorticoides son los principales moduladores de la expresión génica de AGP en las células hepáticas de humano, rata, ratón y conejo [21,22]. La combinación de estos componentes tiene acción sinérgica [23-25]. Así mismo, se ha mostrado que otra citocina, IL-8, puede incrementar también la producción de AGP de hepatocitos humanos aislados [26] y que el ácido retinóico aumenta la respuesta de AGP a IL-6, pero actúa como un modulador negativo de la síntesis del RNAm de AGP inducido por glucocorticoides [27-28].

Los hepatocitos de rata han representado un buen modelo para estudiar la expresión génica de la AGP hepática (Figura 1) [25].

Las actividades de IL-1 e IL-6 son mediadas por el *elemento regulatorio distal* (DRE) [29,30], situado a 5kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de AGP y que está dividido en una porción 5' de 62pb que media la inducción por IL-1 o ésteres de forbol y una porción 3' de 54pb que media la respuesta de IL-6. Además de estas dos porciones, el DRE incluye sitios de unión para el factor transcripcional C/EBP β (CCAAT/enhacer binding protein β) que parece actuar como un mediador indirecto de la señal de citocinas para el gen de AGP [31].

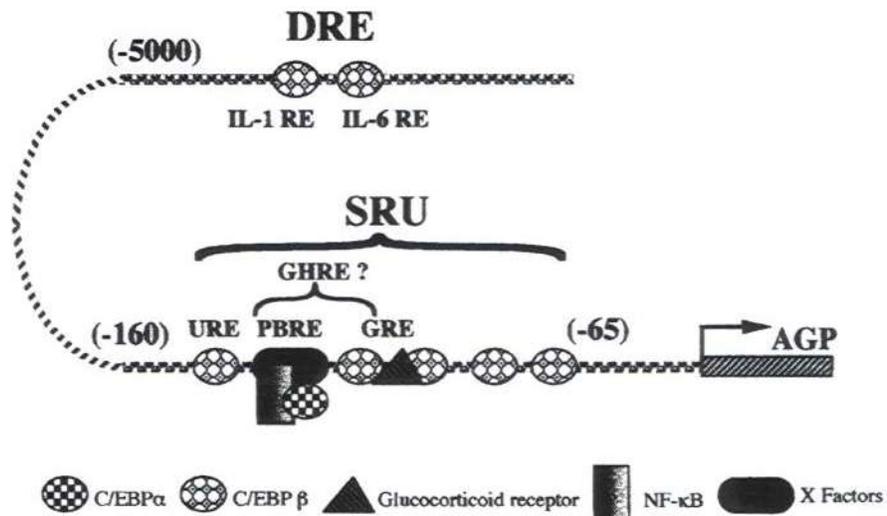


Fig. 1. Elementos regulatorios y factores *trans* implicados en la expresión del gen de AGP. SRU. Unidad responsiva de esteroides. DRE. Elemento regulatorio distal. URE. Elemento responsivo río arriba. PBRE. Elemento responsivo de fenobarbital. GRE. Elemento responsivo de glucocorticoides. GHRE. Elemento responsivo de la hormona del crecimiento. IL-1 RE. Elemento responsivo de IL-1. IL-6 RE. Elemento responsivo de IL-6.

Los glucocorticoides actúan a través de un *elemento responsivo de glucocorticoides* (GRE) situado a 110 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de AGP, dentro

de la *unidad responsiva de esteroides* (SRU) que al igual que el DRE contiene sitios de unión para los factores de transcripción de la familia C/EBP (C/EBP β y C/EBP α) [32-34].

Para alcanzar una máxima inducción del promotor de AGP con glucocorticoides, el GRE que se une al *receptor de glucocorticoides* (GR) interacciona con C/EBP β y el *elemento responsivo río arriba* (URE) así como otras regiones interactúan con C/EBP β [35].

Además de los mediadores inflamatorios, la expresión génica de AGP puede modularse por otras moléculas como el fenobarbital (PB) que actúa directamente sobre hepatocitos incrementando su expresión mediante una vía independiente de la inflamación [36] a través de un *elemento responsivo de fenobarbital* (PBRE) localizado dentro de la SRU [37].

Por otra parte, se ha demostrado que el mayor regulador negativo de la expresión génica constitutiva de AGP es la *hormona del crecimiento* (GH), que también regula la expresión de los genes de la respuesta de fase aguda en el hígado durante la respuesta inflamatoria [38].

AGP extrahepática

La regulación de la expresión génica extrahepática se ha examinado en los últimos años y ahora es bien admitida la hipótesis de que una respuesta de fase aguda puede tomar lugar en células extrahepáticas y que debe ser regulada por mediadores inflamatorios [3].

Varios estudios describieron la presencia de la glicoproteína alfa-1 ácida, pero la prueba directa de su síntesis activa en tejido extrahepático o tipos de células en condiciones

normales o patológicas, se obtuvo mediante la medición de los niveles de su RNAm constitutivo o inducible (Cuadro 1).

Al respecto, hay estudios que demuestran la inducción de la expresión génica de AGP con lipopolisacárido (LPS) bacteriano en riñón [39] y pulmón [40].

Es importante destacar que existen estudios en macrófagos alveolares (AM) [41] y células epiteliales alveolares tipo II (PII) [40] en los que los niveles de RNAm aumentan a la par con la síntesis protéica y la secreción de AGP demostrando la participación de IL-1 β en la modulación transcripcional y post-traducciona [42].

La regulación de la expresión génica de AGP por glucocorticoides y mediadores de la fase aguda de AM y PII ocurre, como en hepatocitos, a nivel transcripcional y post-transcripcional y requiere de factores protéicos [43].

Cuadro 1. Expresión extrahepática de AGP.

Órganos o tipos celulares	Proteína	RNAm	Constitutiv	Inducible
Riñón		+[39]	-[39]	+[39]
Adipositos		-[39]		
Bazo		-[39]		
Timo		-[39]		
Corazón	+[44]	-[39]	+[44]	
Testículos		-[39]		
Íleon	+ [45]			+[45]
Estómago	+[45]			+[45]
Colon	+[45]		+[45]	+[45]
Células epiteliales intestinales		+[52]		+[52]
Células epiteliales prostáticas	+[46]			+[46]
Cerebro		-[39]		
Mama	+[47,45]		+[45]	+[45,47]
Células epiteliales de mama	+[48]		+[48]	
Útero			-[49]	
Decidua	+[49]			+[49]
Pulmón	+[45]	-[39] y +	-[40,45]	+[40,45]
Fibroblastos pulmonares		+[41]		+[41]
Células epiteliales alveolares tipo II	+[40]	+[40]	-[40]	+[40]
Macrófagos alveolares	+[41]	+[41]	+/-[41]	+[41]
Macrófagos peritoneales		-[41]		
Monocitos	+[41,16] +[15,50]		+[41,16] + [15,50]	+[41,16] +[50]
Linfocitos	+[15,50]		+[15,50]	+[50]
Granulocitos	+[15,50]		+[15,50]	+[50]
Células endoteliales	+[51]	+[51]	+[51]	

La expresión o la ausencia de expresión de la proteína y su RNAm se representan mediante los signos “+” o “-” respectivamente. Cuando el gen de AGP es expresado, se indica si es constitutivo o inducible (inflamación o cáncer).

FUNCIONES BIOLÓGICAS

Aún cuando la función exacta de AGP todavía no es totalmente comprendida, se le puede considerar como un anti-inflamatorio natural y un agente inmunomodulador.

Propiedades Inmunomoduladoras

Se ha demostrado que la AGP actúa *in vivo* e *in vitro* como una molécula inmunomoduladora. En estudios *in vitro*, la AGP inhibe la activación de neutrófilos [53], incrementa la secreción de un inhibidor de IL-1 en macrófagos murinos, que probablemente es el receptor antagonista de IL-1 [54], y modula la secreción de citocinas de monocitos y macrófagos inducidas por LPS [55]. También inhibe la lisis mediada por linfocitos de células blanco alogénicas y antagoniza la respuesta mitogénica de linfocitos usando LPS, fitohemaglutinina y aloantígenos [56].

Desde hace casi una década, se ha demostrado que la AGP interactúa directamente con LPS neutralizando y aumentando la eliminación del LPS [57].

Se ha sugerido también que AGP es requerida para mantener la permeabilidad capilar, incrementando probablemente la selectividad de carga polianiónica de la barrera endotelial [58].

Los trabajos acerca de su efecto *in vivo*, han mostrado que la infusión de AGP protege a ratones normales o sensibilizados con galactosamina contra la hepatitis y el shock letal inducido por TNF alfa [59]. Se ha sugerido que la actividad inhibitoria en la agregación plaquetaria de AGP [60] y su potente inhibición de quimiotaxis de neutrófilos y metabolismo oxidativo [53] son parte de sus propiedades protectoras. Se ha mostrado que la AGP inhibe específicamente la apoptosis inducida por TNF alfa, pero no la inducida por anti-Fas en hepatocitos de ratones. Se ha concluido que la AGP confiere protección *in vivo* por un mecanismo indirecto mientras que *in vitro*, no ha logrado proteger las células de hepatoma humano de una apoptosis inducida por TNF alfa y actinomicina D [61].

Por otra parte, se ha mostrado que la actividad inmunomoduladora de AGP depende de su glicosilación.

Por ejemplo, la inhibición de la proliferación linfocítica depende del grado de glicosilación; las variantes de AGP humana no reactivas con concanavalina A (Con A) son las más efectivas [62]. Otro caso es la inhibición de la agregación plaquetaria, la cual aumenta cuando AGP es desializada [63]. Éstos y otros ejemplos como éstos muestran que los carbohidratos de AGP juegan un papel crucial en las funciones inmunomoduladoras de esta glicoproteína.

El efecto neto de las funciones biológicas de AGP, es el restablecimiento de la homeostasis sistémica después de infecciones propagando varias actividades anti-inflamatorias y resistencia bacteriana no específica.

Unión a Fármacos

La AGP, junto con la albúmina y las lipoproteínas, representan las proteínas plasmáticas de unión a fármacos más importantes que pueden tener implicaciones farmacocinéticas importantes. Las variaciones en los niveles plasmáticos de AGP durante los procesos inflamatorios pueden alterar considerablemente el nivel del fármaco libre sin afectar su concentración total en plasma, por lo que la concentración libre del fármaco en plasma reflejará más exactamente la intensidad del efecto farmacológico [3].

La AGP se une principalmente a fármacos básicos y neutros de origen endógeno o exógeno. Es capaz de unirse a sustancias básicas como tamoxifen [64], propanolol [65], vaniloides [66], IgG3, heparina, serotonina [64], factor activador de plaquetas (PAF) [67], melatonina [68] e histamina [69]. Además, se une y acarrea moléculas que modulan su expresión génica como ésteres de forbol [66], drogas ácidas como fenobarbital [70], ácido retinóico [71] y esteroides endógenos como el cortisol [72].

Generalmente se asume que los fármacos básicos se unen principalmente a la albúmina sérica, sin embargo, su interacción con la AGP puede contribuir significativamente a la unión total en plasma de estos fármacos, especialmente en enfermedades donde la concentración de AGP circulante aumenta y/o la de albúmina sérica disminuye [70,73].

Algunos estudios que han analizado la naturaleza de la unión de AGP a fármacos han señalado que esta ocurre principalmente a través de uniones hidrofóbicas debido a residuos hidrofóbicos cerca del sitio de unión de AGP [3].

La capacidad de unión de la AGP también depende de sus cambios conformacionales, la polaridad del ligando (la interacción es más débil para esteroides con mayor polaridad), la temperatura y residuos de aminoácidos que se encuentran en la periferia de los dominios hidrofóbicos de AGP. El pH es uno de los parámetros más importantes en la unión de fármacos a AGP, ya que la unión de fármacos en plasma incrementa a medida que incrementa el pH [74]. La desialización también puede afectar la unión [75]; los estudios al respecto han revelado que ésta reduce la unión de propanolol, mientras que la unión de progesterona no cambia.

Después de la desialización, la asialoglicoproteína es eliminada del plasma por el receptor específico de galactosa de los hepatocitos [76].

ESTUDIO DE AGP EN THP-1

THP-1 es una línea celular leucémica monocítica inmortalizada que fue generada a partir de una muestra sanguínea de un paciente con leucemia monocítica aguda. Su naturaleza monocítica está caracterizada por la presencia de alfa-naftil butirato esterasa, producción de lisozima, actividad fagocítica de eritrocitos de cabra sensibilizados y la capacidad de restaurar la respuesta de linfocitos T usando concanavalina A (Con A). Además, tiene receptores Fc y C3b pero no inmunoglobulinas de superficie o citoplasmáticas [77].

Nuestro interés en utilizar estas células mielomonocíticas, se inició al encontrar estudios que han evidenciado la síntesis y secreción de AGP en la línea celular THP-1 [16], lo que da la oportunidad de utilizarla como un modelo para estudiar los cambios extrahepáticos que pueden ocurrir en la expresión génica de AGP.

También existe evidencia de la endocitosis de una de las variantes de AGP en relación a su afinidad con Con A. Por cromatografía de afinidad con concanavalina A, AGP puede separarse en tres formas: AGP A, la forma no reactiva con Con A, AGP B, de reactividad retardada, y AGP C, la forma reactiva con Con A. De estas tres variantes, AGP C, con dos glicanos biantenarios de los cinco que tiene, es endocitada por las células THP-1 [78].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las células leucémicas THP-1 de origen mielomonocítico producen AGP, y es posible que alguna alteración en su RNAm, del cual depende principalmente la síntesis protéica, esté relacionada con su capacidad para suprimir algunas funciones efectoras de la respuesta inmune antitumoral.

OBJETIVO GENERAL

Cuantificar mediante PCR en tiempo real, la expresión génica basal de los exones 3 y 5 de AGP en la línea celular THP-1 así como su expresión génica inducida con LPS y LPS/PMA.

OBJETIVO PARTICULAR

Establecer las condiciones óptimas del método de PCR en tiempo real para estudiar la expresión génica de los exones 3 y 5 de la AGP en la línea celular leucémica monocítica THP-1.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Es posible determinar mediante PCR en tiempo real si hay un cambio cuantitativo en la transcripción de los exones 3 y 5 de AGP al estimular las células THP-1 con LPS y LPS/PMA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estimulación y cosecha de las células

Las células THP-1 (obtenidas de la American Type Culture Collection, TIB-202) fueron mantenidas en cultivo en medio RPMI 1640, suplementado con 10% de suero fetal (Invitrogen) y 2mM de L-glutamina (Invitrogen) a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Después de lograr un crecimiento apropiado, las células (2.5×10^4 /mL) fueron estimuladas con LPS (*E. coli*) 1µg/mL [94] así como con LPS/PMA (1µg/mL[94] / 10ng/mL[93]). Posteriormente fueron cosechadas los días 1, 3, 5 y 7 en una primera fase del experimento, y a las 3, 6, 12 y 24 horas en una segunda fase. Las células no diferenciadas con PMA y no estimuladas con LPS fueron usadas como control. Se obtuvieron muestras por triplicado.

Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó por el método de tiocianato de guanidinio [95], empleando un sistema comercial (Qiagen, Valencia CA) basado en columna. Las células de cultivo se colectaron en tubo Eppendorf de 1.5 mL, se lavaron 2 veces con PBS pH 7.3 y se resuspendieron en 350 µL de buffer RLT1, homogenizando suavemente. Se adicionaron 350 µL de etanol al 70%, se homogenizó el preparado y se colocaron los 700 µL en la columna, centrifugando a continuación a ≥ 8000 g por 5 min a 4°C. Se eliminó el líquido del tubo recolector, se adicionaron 700 µL del amortiguador comercial RW1 dentro de la columna, se centrifugó a ≥ 8000 g por 5 min a 4°C, se eliminó nuevamente el líquido del tubo recolector y se adicionaron 500 µL de RPE en la columna antes de centrifugar a ≥ 8000 g por 5 min a 4°C. La columna se transfirió a un tubo de recolección nuevo y se adicionaron 50 µL de agua en la columna, se centrifugó a ≥ 8000 g por 5 min a 4°C. En el tubo de recolección quedó el RNA al cual se verificó cantidad por espectrofotometría (260/280nm) y calidad por corrimiento electroforético en un gel de agarosa.

Tratamiento con DNasa I

Antes de la transcripción inversa se eliminó el posible DNA contaminante con la desoxirribonucleasa I (Invitrogen) adicionando 1 μ L de Buffer 10X (200mM Tris-HCl pH 8.4, 20mM MgCl₂, 500mM KCl), 1U de DNasa I y c.b.p.10 μ L de agua DEPC por cada μ g de RNA en las muestras. Después de una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente se inactivó la DNasa I con 1 μ L de EDTA incubando 10 minutos a 65°C.

Transcripción Inversa

Una vez purificado el RNA, se procedió a la transcripción inversa utilizando el sistema comercial Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen). A cada mezcla de reacción se adicionó 1 μ L de Buffer RT 10X, 1 μ L de dNTP's 5mM cada uno, 1 μ L de Oligo dT 10 μ M, 1 μ L de inhibidor de RNasas 10U/ μ L, 1 μ L de reverso transcriptasa 4U/ μ L, 6 μ L de agua libre de RNasas y 5 μ g de RNA de cada muestra. Después de mezclar, se incubó en el termociclador Tuochgene Gradient (TECHNE) 1 hora a 37°C para llevar a cabo la retrotranscripción y 15 minutos a 93°C para inactivar a la enzima.

Tratamiento con RNasa H

Para eliminar el RNAm del híbrido RNA-DNA formado en la retrotranscripción y tener un DNA complementario más puro, se utilizó la ribonucleasa H (Invitrogen) adicionando 1U de RNasa H a cada tubo de reacción e incubando 20 minutos a 37°C. La reacción se detuvo incubando 5 minutos a 4°C con 50 μ L de paraformaldehído (SIGMA) al 4%.

Diseño de los Oligonucleótidos

Se accedió a la secuencia del RNA mensajero y regiones de los exones de AGP humana en www.ensembl.com, y con la ayuda del programa Primer Express (Applied Biosystems, USA) se diseñaron los oligonucleótidos sentido y antisentido para identificar los exones 3 y 5 de AGP.

Los oligonucleótidos óptimos tanto para PCR como PCR en tiempo real (Cuadro 2) se seleccionaron bajo las siguientes condiciones: longitud del oligonucleótido entre 18 y 25 nucleótidos, contenido de G ≡ C 40-60%, valor de $T_m = 60^\circ$, longitud del producto de 100 a 150 pb, evitando complementariedad de 2 o 3 bases en el extremo 3' de los pares de oligonucleótidos para reducir la formación de dímeros. La temperatura de alineado para cada par de oligonucleótidos puede estar por arriba o por debajo de la T_m la cual se obtuvo a partir de la siguiente fórmula: $T_m = 2^\circ\text{C}(\text{Número de [T+A]}) + 4^\circ\text{C}(\text{Número de [G+C]})$.

	Secuencia		Temperatura de Alineación
	Sentido	Antisentido	
G3PDH	CTAAGCCCCCGCAGTCATTGT	TGGTGACATTGAGGCCAGC	60°C
Exón 3 de AGP	GTGGGAGGCCAAGAGCATT	AGACAGCCCCCAGTTCCTCTC	59°C
Exón 5 de AGP	TGCTGACAAGCCAGAGACGA	GGCTCACACTTATCCTTTTCCCAAT	59°C
Cuadro 2. Oligonucleótidos seleccionados para amplificar los exones 3 y 5 de AGP y G3PDH			

PCR

La PCR para G3PDH (como gen constitutivo), y para los exones 3 y 5 de AGP, se realizó en un volumen final de 25 μ L. Se utilizó el sistema comercial Taq PCR Master Mix (Qiagen) adicionando 12.5 μ L del Master Mix (5 U Taq Polimerasa, 2X Buffer, 3mM MgCl₂, 400 μ M de cada dNTP), 10.5 μ L de agua libre de RNasas, 0.1mM de cada oligonucleótido, sentido y antisentido y 1 μ g del DNAc. Se homogenizó y se colocó en el termociclador Tuochgene Gradient (TECHNE) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 15 min, 35 ciclos de 95°C por 30 seg, temperatura de alineado por 30 seg, 72°C por 45 seg, extensión final de 72°C por 5 min, y finalmente refrigeración a 4°C. Se verificó el producto por corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1.8% teñido con SYBR Green I (Molecular Probes) y se procedió a realizar los ensayos de PCR en tiempo real.

Electroforesis

La detección de los productos de la PCR se realizó mediante un corrimiento electroforético utilizando un gel de agarosa (Invitrogen) al 1.8% en TAE 1X y SYBR Green I (Molecular Probes) 1:10000.

Las muestras se prepararon con 2 μ L de buffer de carga y 5 μ L del producto de PCR. Se corrieron 30 minutos a 80mV en una cámara de electroforesis (BIORAD) y se observaron en el analizador de imagen ChemiImager 4400 (Alpha Innotech).

Además de las muestras, se corrió un marcador de peso (Φ X174 RF DNA/*Hae* III Fragments, Invitrogen, o, DNA Molecular Weight Marker XIII, Roche Applied Science, Germany).

Estandarización de la PCR

Las condiciones óptimas de amplificación para los oligonucleótidos seleccionados (G3PDH y los exones 3 y 5 de AGP) se establecieron utilizando el RNA de las células THP-1 como molde.

Después de experimentar diferentes temperaturas de alineado (por abajo y por arriba de la T_m) y concentraciones de $MgCl_2$, los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.8% con SYBR Green I (1:10,000), utilizando un marcador de peso como de referencia (Figura 2).

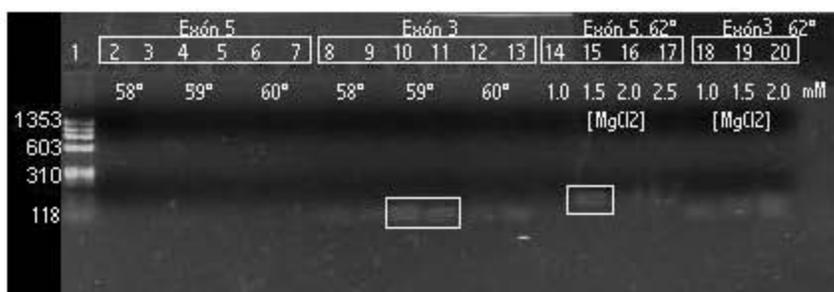


Fig. 2. Estandarización de la PCR para los oligonucleótidos de los exones 3 y 5 de AGP. Carril 1: Marcador de peso Φ X174 RF DNA/*Hae* III Fragments, Invitrogen. Carriles 2-3, 4-5 y 6-7: productos de PCR para el exón 5 de AGP amplificados a 58, 59 y 60° respectivamente, con PCR MasterMix (Qiagen). Carriles 8-9, 10-11 y 12-13: productos de PCR para el exón 3 de AGP, amplificados a 58, 59 y 60° respectivamente, con PCR MasterMix (Qiagen). Carriles 14, 15, 16 y 17: productos de PCR para el exón 5 de AGP amplificados a 62° y diferentes concentraciones de $MgCl_2$ (1, 1.5, 2 y 2.5 mM, respectivamente). Carriles 18, 19 y 20: productos de PCR para el exón 3 de AGP amplificados a 62° y 1, 1.5 y 2 mM de $MgCl_2$.

Los recuadros en la Figura 1 enmarcan las bandas más definidas que representan las condiciones óptimas de temperatura de alineado y concentración de $MgCl_2$ para la PCR.

Constitutivo

La presencia del DNA complementario en todas las muestras, se comprobó realizando una PCR del gen constitutivo G3PDH y visualizando el producto por electroforesis (Figura 3).

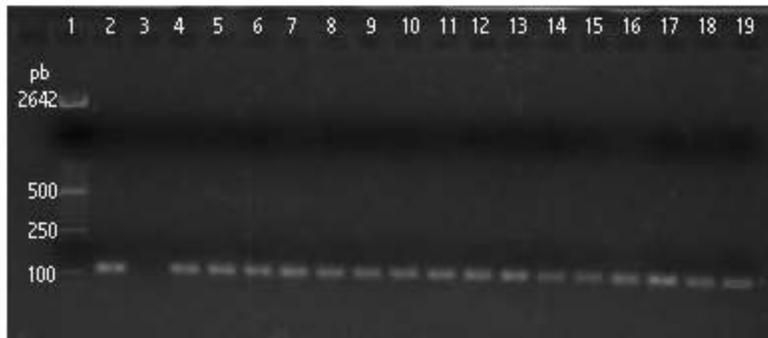


Fig. 3. Constitutivo. Carril 1: Marcador de peso DNA Molecular Weight Marker XIII (Roche Applied Science, Germany). Carril 3: Control negativo de la PCR para G3PDH (mezcla de reacción sin muestra). Carriles 2, 4-19: productos de PCR para G3PDH amplificadas a 60° con PCR Master Mix (Qiagen), células THP-1 estimuladas con LPS y/o PMA y cosechadas a las 3, 6, 12, 24 horas, o bien, a los 3, 5 y 7 días de cultivo.

Curvas estándar para PCR en tiempo real

Una vez que se definieron las condiciones óptimas de la PCR para G3DPH, y los exones 3 y 5 de AGP, se realizó una densitometría con el programa ChemiImager 4400 (Alpha Innotech), extrapolando la intensidad de las bandas teñidas con SYBR Green I en una curva de intensidad vs concentración del marcador de peso Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, anexo II) a fin de cuantificar cada uno de los productos y preparar las diluciones para generar las curvas estándar correspondientes de PCR (Figura 4).

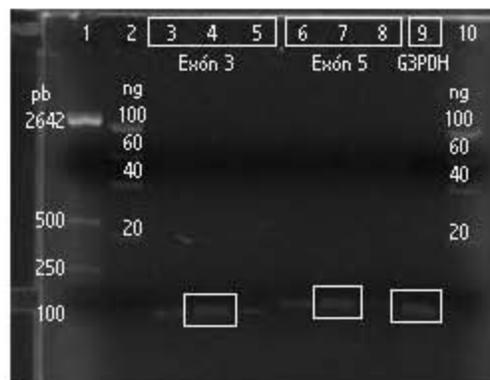


Fig. 4. Densitometría. Carril 1: Marcador de peso DNA Molecular Weight Marker XIII (Roche Applied Science, Germany). Carril 2 y 10: Marcador de peso con masa (Low DNA Mass Ladder. Invitrogen). Carriles 3-5: productos de PCR para el exón 3 de AGP. Carriles 6-8: productos de PCR para el exón 5 de AGP. Carril 9: producto de PCR para G3PDH.

Las bandas en los recuadros de la figura 4 representan los productos de PCR cuantificados por densidad óptica, a partir de los cuales se prepararon las curvas estándar.

Con los datos anteriores se calculó el número (Y) de copias por litro (L) de cada producto de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$(X \mu\text{g}/\mu\text{L DNA} / [\text{tamaño del producto de PCR} \times 660]) \times 6.022 \times 10^{23} = Y \text{ copias/L}$$

Donde

660 es el peso molecular promedio de cada uno de los cuatro nucleótidos

6.022×10^{23} es el número de Avogadro

Las curvas estándar se generaron realizando diluciones seriadas de los productos de PCR cuantificados para cada par de oligonucleótidos (G3PDH, y exones 3 y 5 de APG). Cada curva tuvo 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , y 1×10^2 copias/ μL de cada producto de PCR.

PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real se llevó a cabo en el termociclador 75000 Real Time PCR System. Applied Biosystem, USA.

Para cada tubo de reacción se utilizó $1 \mu\text{g}$ de DNA, $12.5 \mu\text{L}$ de Syber Green PCR Master Mix (HotStarTaq DNA Polimerasa, PCR Buffer (Tris-Cl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 mM MgCl_2 , pH 8.7), dNTP's, SYBR Green I y ROX), $10.5 \mu\text{L}$ de agua libre de RNasa, $0.1 \mu\text{M}$ de oligonucleótido sentido y 0.1mM de oligonucleótido antisentido. Tanto la curva como las muestras se realizaron por duplicado, así como el control negativo que consiste en la mezcla de amplificación sustituyendo la muestra por agua.

Las condiciones usadas fueron 15 min a 95°C como paso inicial de desnaturalización,

seguida de 40 ciclos de 95°C por 20 seg, temperatura de alineado por 20 seg y 72°C por 34 seg.

Las cantidades del RNAm específico en las muestras se midieron utilizando las curvas estándar correspondientes.

El gen constitutivo G3PDH fue usado para normalizar la expresión de los exones 3 y 5 de AGP.

Para obtener el número de copias totales/ 10^6 copias de G3PDH para cada muestra se multiplicó el valor de la muestra por el factor de G3PDH (1×10^6 / valor de G3PDH de la muestra).

RESULTADOS

PCR en tiempo real

Una vez que se establecieron las condiciones óptimas de amplificación se confirmó que los fragmentos correspondientes a G3PDH, y a los exones 3 y 5 de AGP presentaron los tamaños esperados: 108pb para G3PDH, 102 pb para el exón3 de AGP y 120pb para el exón 5 de AGP.

Los productos de PCR para los exones 3 y 5 de AGP tuvieron una excelente definición sin bandas adicionales cuando se utilizó el sistema comercial PCR MasterMix (Qiagen), a 59°C y 62°C como temperaturas de alineado respectivamente, y 1.5mM de MgCl₂.

Estos productos fueron analizados por densitometría para obtener el número de copias para cada amplificado y a partir de este dato, obtener la curva estándar en número de copias por μL (10^8 a 10^2), que se utiliza como referencia en la PCR en tiempo real para cada amplificado (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resultados de la densitometría y el número de copias de cada producto.

Muestra	Área	Copias de producto/ μL
---------	------	-----------------------------------

Producto de G3DPH	5216	8.02x10 ¹⁰
Producto del exón 3 de AGP	5256	8.67 x10 ¹⁰
Producto del exón 5 de AGP	5094	6.63 x10 ¹⁰

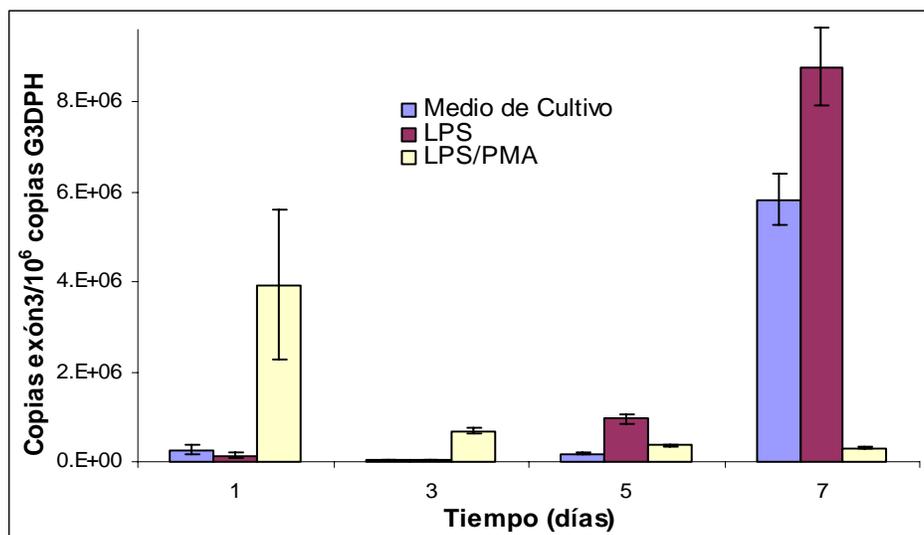
Al cultivar las células THP-1 en medio de cultivo sin estímulo, o en presencia de LPS y LPS/PMA, y obtener su RNA para analizar el transcrito de los exones 3 y 5 de AGP por PCR en tiempo real en diferentes intervalos de tiempo, se obtuvieron los siguientes resultados:

Primera fase experimental

En la Figura 4, se muestra la cinética en la expresión del exón 3 de AGP. El análisis del transcrito de la AGP reveló que las células en medio de cultivo sin estímulo presentaron una cantidad baja basal del exón 3 de AGP, excepto en el día 7, cuando el transcrito incrementó notablemente, resultados que coinciden con el reporte de que al séptimo día de cultivo las células THP-1 se adhieren al plástico y adquieren características morfológicas y funcionales de macrófagos activados sin estimulación exógena [98]. En ese mismo séptimo día de cultivo, las células estimuladas con LPS (1µg/mL) presentaron la mayor cantidad del transcrito

Con la adición de LPS/PMA se encontró un incremento del transcrito en el primer día de cultivo, mismo que disminuyó hacia el día 7.

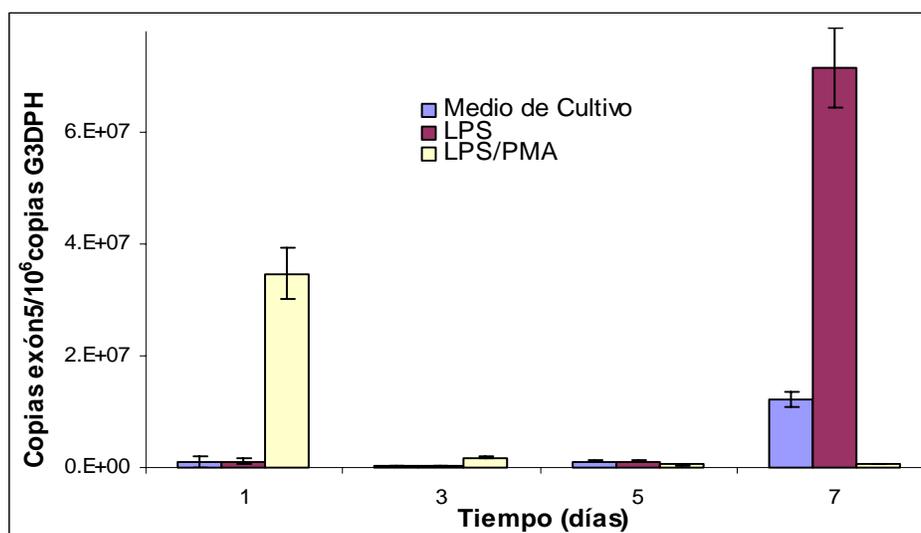
Fig.4. *Cinética de la expresión del exón 3 de AGP en células THP-1 estimuladas.*



Los resultados son presentados como media \pm desviación estándar.

La Figura 5, muestra la cinética de la expresión del exón 5 de AGP. Los resultados siguen la misma tendencia que la expresión del exón 3. Las células que no recibieron estímulo presentaron una cantidad basal baja del transcrito, las células estimuladas con LPS/PMA presentaron la cantidad máxima de transcrito en el primer día de estimulación y finalmente el transcrito del exón5 fue mucho mayor cuando las células recibieron estímulo con LPS que cuando fueron estimuladas con LPS/PMA, al igual que el transcrito del exón 3.

Fig.5. Cinética de la expresión del exón 5 de AGP inducida por LPS y LPS/PMA en células THP-1.



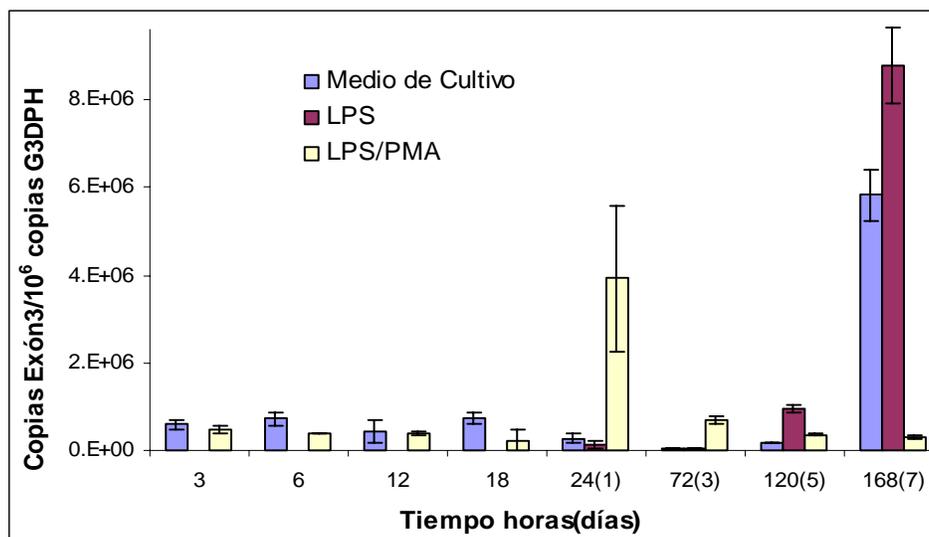
Los resultados son presentados como media \pm desviación estándar.

Al observar que el estímulo con LPS/PMA generó un incremento en el transcrito de AGP tanto de los exones 3 y 5 de AGP en el primer día de cultivo, se decidió estudiar los cambios en los dos transcritos durante las primeras 24 horas de cultivo con adición de LPS/PMA.

Segunda fase experimental

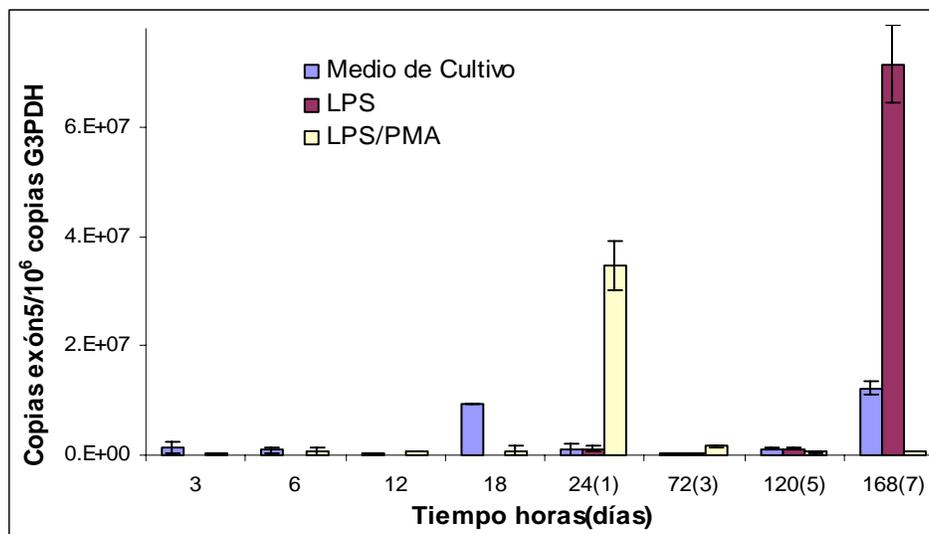
Los resultados de ésta segunda fase del experimento revelaron que el punto máximo de expresión al considerar los transcritos de los exones 3 y 5 de AGP ocurrió a las 24 horas de cultivo y no se encontró otro pico de estimulación durante las horas previas (Figuras 6 y 7).

Fig.6. Cinética de la expresión del exón 3 de AGP en células THP-1 estimuladas.



Los resultados son presentados como media \pm desviación estándar.

Fig.7. Cinética de la expresión del exón 5 de AGP en células THP-1 estimuladas.



Los resultados son presentados como media \pm desviación estándar.

DISCUSIÓN

La AGP puede ser considerada como un inmunomodulador importante y su síntesis parece estar involucrada en el restablecimiento de la homeostasis sistémica durante procesos infecciosos o en el daño tisular de otro tipo, propagando varias actividades anti-inflamatorias y de resistencia bacteriana no específica.

La producción de AGP, de la cual depende su concentración plasmática, ocurre principalmente en células hepáticas y es regulada por algunas citocinas de la inmunidad innata como IL-1 e IL-6 y glucocorticoides [14,17].

Desde 1977, se ha señalado que su producción fuera del hígado puede involucrar distintas estirpes celulares y al respecto se reporta que la AGP es sintetizada constitutivamente por células epiteliales, endoteliales, miocardio, monocitos, granulocitos, colon, mama y macrófagos alveolares, mientras que su expresión se puede inducir en fibroblastos, células intestinales, riñón, próstata, decidua y cultivos de líneas mielomonocíticas (Cuadro 1). Los reportes respecto a la síntesis de AGP por linfocitos son diversos; Shibata y cols. [16] reportaron que los linfocitos T y B no sintetizan ni secretan AGP, mientras que Gahmberg y cols. [15] y Nakamura y cols. [50] reportan tanto la síntesis como la expresión constitutiva e inducible de AGP en linfocitos.

La inducción de la expresión extrahepática de AGP sugiere que esta glicoproteína no sólo modula la respuesta inmune sistémica, sino que también lo hace localmente reduciendo el daño del tejido involucrado en el proceso inflamatorio. Se ha sugerido que la AGP derivada de los neutrófilos lleva a cabo acciones inmunomoduladoras locales durante la fase inicial de la respuesta inmune [20].

Se ha reportado que la AGP inhibe la respuesta quimiotáctica, activación y agregación de neutrófilos, metabolismo oxidativo [53], así como la agregación plaquetaria [60]; disminuye las propiedades efectoras de macrófagos uniéndose a los receptores de quimiocinas CCR5 desplazando a MIP1 α y MIP1 β . También induce la producción de

inhibidores de IL-1 en monocitos [54], suprime la producción de TNF α y parece suprimir tanto la activación de los linfocitos T inducida por mitógenos o aloantígenos, como la síntesis de IL-2 y la citotoxicidad mediada por TNF α [56,97].

En todos los trabajos a cerca de la expresión de AGP se han usado métodos de PCR convencional, pero sólo en un reporte reciente que fue publicado durante el desarrollo de nuestro estudio, se ha aplicado la PCR en tiempo real para lograr una cuantificación del nivel de RNAm de AGP [20]. Esta metodología permite detectar cambios en la transcripción que no son visibles por métodos de PCR convencional.

Por otra parte, la capacidad biosintética y de secreción de AGP en la línea celular THP-1 [16], ubica a estas células como un excelente modelo para estudiar tanto la transcripción como la producción de AGP a nivel extrahepático, por ejemplo, para el estudio de la expresión génica de esta glicoproteína en leucemias.

El análisis del nivel de transcripción usando oligonucleótidos de dos exones diferentes y obtener resultados parecidos sugiere que nuestra técnica es específica para AGP. La especificidad de la PCR en general está contemplada desde el diseño de los oligonucleótidos y en la variante de PCR en tiempo real puede confirmarse a través de una curva de disociación (*melting curve*) donde se mide fluorescencia vs temperatura, cuyo análisis reveló en este trabajo la ausencia de dímeros de oligonucleótidos y/o contaminaciones al observarse únicamente un pico de fluorescencia [81].

La PCR en tiempo real, demostró ser una técnica sensible y específica que nos permitió evaluar pequeños cambios en la expresión de un gen. Nosotros usamos un sistema de cuantificación basado en la amplificación de DNAc y densitometría pero también es factible generar curvas estándar que permitan llevar a cabo la cuantificación utilizando DNA o plásmidos, cuyo número de copias, o bien concentración total son conocidos [81].

El aumento en el transcrito de AGP en las células leucémicas mielomonocítica THP-1 cuando se estimularon con LPS y con LPS/PMA, puede estar relacionado con la generación de este proceso tumoral. Si bien se ha reportado un incremento en los niveles plasmáticos de AGP en leucemias [79,80], no existen evidencias directas acerca de si su nivel de transcripción, el aumento de la producción de AGP o algún cambio en la glicosilación puedan estar relacionados al desarrollo de leucemias de origen mieloides o causar alteraciones en la respuesta antitumoral.

En lo que respecta a la relación entre AGP y cáncer, se ha sugerido que su participación puede ser parte de los mecanismos de evasión tumoral debido a que los niveles plasmáticos de esta glicoproteína se elevan en leucemias, especialmente en la fase de actividad tumoral y al igual que nuestros resultados, otros autores han descrito que la línea celular THP-1 obtenida a partir de una leucemia mielomonocítica puede producir AGP [16].

En algunos estudios se ha reportado que la variante ORM-2 puede estar asociada con cáncer de pulmón, mama y ovario [99]; los niveles plasmáticos de AGP y su glicosilación pueden alterarse como consecuencia de distintos procesos tumorales [100] y que la presencia de AGP en líquido de ascitis en cáncer de ovario puede inhibir la proliferación de linfocitos T [101]. Al revisar los trabajos específicos de AGP en leucemias se observó un incremento en sus niveles plasmáticos en especial durante la fase de actividad tumoral. En este contexto, se ha detectado que algunos factores solubles obtenidos al cultivar blastos de leucemias mieloides agudas cuyo peso molecular es similar a la AGP tienen actividad inmunosupresora [79,80]. También es interesante que algunas glicofomas de AGP se unen a moléculas tipo lectina en la membrana de células mielomonocíticas y pueden ser endocitadas por esta vía, sugiriendo que tienen un efecto autócrino [78], el cual puede regular algunas funciones efectoras de esta estirpe celular.

En este trabajo, se evidenció la capacidad de las células THP-1 de expresar en forma similar los exones 3 y 5 de AGP tras el estímulo con LPS/PMA donde se observó un incremento en la expresión en el día 1, mientras que al adicionar únicamente LPS este incremento se retardó hasta el día 7.

El LPS derivado de bacterias gram negativas es considerado el activador más potente de la respuesta secretoria de monocitos y macrófagos, mientras que el PMA es un éster de forbol que modula la expresión génica de las células monocíticas, diferenciándolas a macrófagos [91]. La observación de que el LPS ha logrado inducir la producción de AGP en líneas celulares de origen hepático [21] y que este producto bacteriano participa en las vías de activación de las regiones promotoras que inducen la transcripción de AGP sugiere que este estímulo tiene la capacidad de modular el nivel de transcripción y seguramente la síntesis de AGP de origen extrahepático, al menos en monocitos.

El hallazgo de un incremento en la transcripción de AGP mediante un método cuantitativo, al mantener las células THP-1 únicamente en medio de cultivo por 7 días es consistente con la capacidad de diferenciación que tiene esta línea celular en cultivos prolongados [98]. Esto también explica que la combinación LPS/PMA fue capaz de incrementar la expresión de AGP en el primer día, probablemente mediante la inducción de la diferenciación por parte del PMA, lo cual no ocurre cuando sólo se adiciona LPS.

CONCLUSIONES

Se establecieron las condiciones óptimas de PCR en tiempo real para estudiar la expresión génica de los exones 3 y 5 de la AGP en la línea celular leucémica monocítica THP-1.

Sabiendo que la AGP es una proteína de fase aguda, el pico de expresión de ambos exones se encontró a las 24 horas de cultivo cuando se estimuló con LPS/PMA, mientras que al estimular sólo con LPS, se observó un retardo en el incremento de la expresión a los 7 días. Esto debido a que el PMA es por excelencia un diferenciador celular y el LPS es un factor estimulante de la producción de AGP, por lo que la combinación genera un rápido incremento en la expresión de esta glicoproteína.

PERSPECTIVAS

Una vez estandarizada la técnica de PCR en tiempo real, se podrán estudiar los niveles del transcrito de AGP en leucemias mielomonocíticas.

También se estudiarán los cambios en la síntesis protéica y en la glicosolación de la AGP tanto en la línea celular THP-1 como en pacientes con leucemias de origen mielomonocítico, a fin de reforzar las evidencias que permitan proponer que la AGP participa en los mecanismos de la evasión tumoral.

BIBLIOGRAFÍA

1. K. Schmid, Preparation and properties of serum and plasma proteins. XXIX. Separation from human plasma of polysaccharides, peptides and proteins of low molecular weight. Crystallization of an acid glycoprotein. *J. Am. Chem. Soc.* 75 (1953) 60-68.
2. H.E. Weimer, J.W. Mehl, R.J. Winzler, Studies on the mucoproteins of human plasma. V. Isolation and characterization of a homogeneous mucoprotein, *J. Biol. Chem.* 185 (1950) 561-568.
3. T. Fournier, N. Medjoubi-N, D. Porquet, Alpha 1-Acid Glycoprotein; Review, *Biochim. Biophys. Acta* 1482 (2000) 157-171.
4. H. Yoshima, A. Matsumoto, T. Mizuochi, T. Kawasaki, A. Kobata, Comparative study of the carbohydrate moieties of rat and human plasma alpha 1-acid glycoproteins, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 8476-8484.
5. K. Schmid, in F.W. Putman (Ed.), α 1-acid glycoprotein in: *The Plasma Proteins*, Academic Press, New York, 1975, pp. 183-288.
6. D. Biou, C. Bauvy, H. Nguyen, P Codogno, G. Durand, M. Auberti, Alterations of the glycan moiety of human alfa 1-acid glycoprotein in late-term pregnancy, *Clin. Chim. Acta* 204 (1991) 1-12.
7. D. Biou, P. Chanton, D. Konan, N. Seta, H. Nguyen, J. Féger, G. Durand, Microheterogeneity of the carbohydrate moiety of human alpha 1-acid glycoprotein in two benign liver diseases: alcoholic cirrhosis and acute hepatitis, *Clin. Chim. Acta* 186 (1989) 59-66.
8. N. Serbource-Goguel Seta, G. Durand, M. Corbic, J. Agneray, J. Féger, Alterations in relative proportions of microheterogenous forms of human alpha 1-acid glycoprotein in liver disease, *J. Hepatol.* 2 (1986) 245-252.
9. J.M. Wieruszkeski, B. Fournet, D. Konan, D. Biou, G. Durand, 400-MHz ¹H-NMR spectroscopy of fucosylated tetrasialyl oligosaccharides isolated from normal and cirrhotic alpha 1-acid glycoprotein, *FEBS Lett.* 238 (1988) 390-394.
10. L. Dente, M.G. Pizza, A. Metspalu, R. Cortese, Structure and expression of the genes coding for human alfa 1- acid glycoprotein, *EMBO J.* 6 (1987) 2289-2296.
11. L. Dente, U. Ruther, M. Tripodi, E.F. Wagner, R. Cortese, Expression of human alpha 1-acid glycoprotein genes in cultured cells and in transgenic mice, *Genes Dev.* 2 (1988) 259-266.
12. I. Yuasa, K. Umetsu, U. Vogt, H. Nakamura, E. Nanba, N. Tamaki, Y. Irizawa, Human orosomucoide polymorphism : molecular basis of the three common ORM1 alleles, ORM1*F1, ORM1*F2 and ORM1*S, *Hum Genet.*, 99, (1997), 393-398.

13. G.H. Fey, G.M. Füller, Mol. Regulation of acute phase gene expression by inflammatory mediators, *Biol. Med.* 4 (1987) 323-338.
14. H. Baumann, K.R. Prowse, S. Marinkovic, K. Won, G.P. Jahreis, Stimulation of hepatic acute phase response by cytokines and glucocorticoids, *Ann. New York Acad. Sci.* 557 (1989) 280-296.
15. C.G. Gahmberg, L.C. Andersson, Leukocyte surface origin of human alpha1-acid glycoprotein (orosomucoid), *J. Exp. Med.* 148 (1978) 507-521.
16. Y. Shibata, K. Tamura, N. Ishida, Cultured human monocytes, granulocytes and a monoblastoid cell line (THP-1) synthesize and secrete immunosuppressive acidic protein (a type of alpha 1-acid glycoprotein), *Microbiol. Immunol.* 28 (1984) 99-111.
17. T. Fournier, N. Bouach, C. Delafosse, B. Crestani, M. Aubier, Inducible expression and regulation of the α 1-Acid Glycoprotein gene by alveolar macrophages: Prostaglandin E2 and Cyclic AMP act as new positive stimuli *J. Immunol.* 163 (1999) 2883-2890.
18. S.S. Twining, A.S. Brecher, Identification of alpha1-acid glycoprotein, alpha2-macroglobulin and antithrombin III as components of normal and malignant human tissues, *Clin. Chim. Acta* 75 (1977) 143-148.
19. R.J. Siegel, C. Fishbein, J.W. Said, Z.A. Tokes, W.E. Shell, Localization of alpha-1 acid glycoproteins in human myocardium, *Lab. Invest.* 52 (1985) 107-112.
20. K. Theilgaard-Mönch, L. Jacobsen, T. Rasmussen, C. Niemann, L. Udby, R. Borup, M. Gharib, P. Arkwright, A. Gombart, J. Calafat, B. Porse, N. Borregaard, Highly glycosylated α 1-acid glycoprotein is synthesized in myelocytes, stored in secondary granules, and released by activated neutrophils, *Journal of Leukocyte Biology*, 78, (2005), 1-9.
21. H. Baumann, J. Gauldie, Regulation of hepatic acute phase protein genes by hepatocyte stimulatory factors and other mediators of inflammation, *Mol. Biol. Med.* 7 (1990) 147-159.
22. T. Alam, J. Papaconstantinou, Interaction of acute-phase-inducible and liver-enriched nuclear factors with the promoter region of the mouse alpha 1-acid glycoprotein gene-1, *Biochemistry* 31 (1992) 1928-1936.
23. T. Alam, M.R. An, R.C. Mifflin, C.C. Hsieh, X. Ge, J. Papaconstantinou, trans-activation of the alpha 1-acid glycoprotein gene acute phase responsive element by multiple isoforms of C/EBP and glucocorticoid receptor, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 15681-15688.
24. H. Baumann, C. Richards, J. Gauldie, Interaction among hepatocyte-stimulating factors, interleukin 1, and glucocorticoids for regulation of acute phase plasma proteins in human hepatoma (HepG2) cells, *J. Immunol.* 139 (1987) 4122-4128.

25. T. Fournier, N. Mejdoubi, D. Monnet, G. Durand, D. Porquet, Phenobarbital induction of alpha 1-acid glycoprotein in primary rat hepatocyte cultures, *Hepatology* 20 (1994) 1584-1588.
26. S.J. Wigmore, K.C. Fearon, J.P. Maingay, P.B. Lai, J.A. Ross, Interleukin-8 can mediate acute-phase protein production by isolated human hepatocytes. *Am J. Physiol.* 273 (1997) E720-726.
27. A. Koj, A. Guzdek, T. Nakamura, T. Kordula, Hepatocyte growth factor and retinoic acid exert opposite effects on synthesis of type 1 and type 2 acute phase proteins in rat hepatoma cells, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 27 (1995) 39-46.
28. X. Li, T. Sumi, T. Matsukawa, Y. Nakanishi, Y. Ohba, Thyroid hormone, all-trans retinoic acid, and 9-cis retinoic acid functioned as negative modulators of the effect of glucocorticoid on induction of alpha 1-acid glycoprotein RNA in RLN-10 cells, *Biochem. Mol. Biol. Int.* 45 (1998) 1-10.
29. K.R. Prowse, H. Baumann, Hepatocyte-stimulating factor, beta 2 interferon, and interleukin-1 enhance expression of the rat alpha 1-acid glycoprotein gene via a distal upstream regulatory region, *Mol. Cell Biol.* 8 (1988) 42-51.
30. K.A. Won, H. Baumann, The cytokine response element of the rat alpha 1-acid glycoprotein gene is a complex of several interacting regulatory sequences, *Mol. Cell Biol.* 10 (1990) 3965-3978.
31. H. Baumann, K.K. Morella, Interleukin-6 signal communication to the alpha 1-acid glycoprotein gene, but not junB gene, is impaired in HTC cells, S.P. Campos, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 10495-10500.
32. P.M. Williams, T. Ratajczak, S.C. Lee, G.M. Ringold, AGP/EBP(LAP) expressed in rat hepatoma cells interacts with multiple promoter sites and is necessary for maximal glucocorticoid induction of the rat alpha-1 acid glycoprotein gene, *Mol. Cell Biol.* 11 (1991) 4959-4965.
33. R. Ingrassia, G.F. Savoldi, A. Caraccioli, M. Tironi, C. Poiesi, P. Williams, A. Albertini, D. Di Lorenzo, Characterization of a novel transcription complex required for glucocorticoid regulation of the rat alpha-1-acid glycoprotein gene, *DNA Cell Biol.* 13 (1994) 615-627.
34. T. Ratajczak, P.M. Williams, D. Di Lorenzo, G.M. Ringold, Multiple elements within the glucocorticoid regulatory unit of the rat alpha 1-acid glycoprotein gene are recognition sites for C/EBP, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 11111-11119.
35. G. Savoldi, A. Fenaroli, F. Ferrari, G. Rigaud, A. Albertini, D. Di Lorenzo, The glucocorticoid receptor regulates the binding of C/EBPbeta on the alpha-1-acid glycoprotein promoter in vivo. *DNA Cell Biol.* 16 (1997) 1467-1476.

36. T. Fournier, R. Vranckx, N. Mejdoubi, G. Durand, D. Porquet, Induction of rat alpha-1-acid glycoprotein by phenobarbital is independent of a general acute-phase response, *Biochem. Pharmacol.* 48 (1994) 1531-1535.
37. T. Fournier, N. Mejdoubi, C. Lapoumeroulie, J. Hamelin, J. Elion, G. Durand, D. Porquet, Transcriptional regulation of rat alpha 1-acid glycoprotein gene by phenobarbital, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 27175-27178.
38. D. Jarrar, S.E. Wolf, M.G. Jeschke, R.J. Ramirez, M. Debroy, C.K. Ogle, J. Papaconstantinou, D.N. Herndon, Growth hormone attenuates the acute-phase response to thermal injury, *Arch. Surg.* 132 (1997) 1171-1175.
39. N. Kalmovarin, W.E. Friedrichs, H.V. O'Brien, L.A. Linehan, B.H. Bowman, F. Yang, Extrahepatic expression of plasma protein genes during inflammation, *Inflammation* 15 (1991) 369-379.
40. B. Crestani, C. Rolland, B. Lardeux, T. Fournier, D. Bernuau, C. Pous, C. Vissuzaine, L. Li, M. Aubier, Inducible expression of the alpha1-acid glycoprotein by rat and human type II alveolar epithelial cells, *J. Immunol.*, 160, (1998), 4596-4605.
41. T. Fournier, N. Bouach, C. Delafosse, B. Crestani, M. Aubier, Inducible expression and regulation of the alpha 1-acid glycoprotein gene by alveolar macrophages: prostaglandin E2 and cyclic AMP act as new positive stimuli, *J. Immunol.* 163 (1999) 2883-2890.
42. J.T. Rogers, K.R. Bridges, G.P. Durmowicz, J. Glass, P.E. Auron, H.N. Munro, Translational control during the acute phase response. Ferritin synthesis in response to interleukin-1, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 14572-14578.
43. B.R. Shiels, W. Northemann, M.R. Gehring, G.H. Fey, Modified nuclear processing of alpha 1-acid glycoprotein RNA during inflammation, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 12826-12831.
44. R.J. Siegel, C. Fishbein, J.W. Said, Z.A. Tokes, W.E. Shell, Localization of alpha-1 acid glycoproteins in human myocardium, *Lab. Invest.* 52 (1985) 107-112.
45. S.S. Twining, A.S. Brecher, Identification of alpha1-acid glycoprotein, alpha2-macroglobulin and antithrombin III as components of normal and malignant human tissues, *Clin. Chim. Acta* 75 (1977) 143-148.
46. J.Y. Dube, G. Paradis, B. Tetu, R.R. Tremblay, Synthesis of alpha 1-acid glycoprotein by the human prostate, *Prostate* 15 (1989) 251-258.

47. L.D. Papsidero, T. Nemoto, T.M. Chu, Identification of a breast tumor-associated orosomuroid by concanavalin A affinity chromatography, *Cancer Biochem. Biophys.* 3 (1978) 15-18.
48. S.J. Gendler, G.B. Dermer, L.M. Silverman, Z.A. Tokes, Synthesis of alpha 1-antichymotrypsin and alpha 1-acid glycoprotein by human breast epithelial cells, *Cancer Res.* 42 (1982) 4567-4573.
49. T. Thomas, S. Fletcher, G.C. Yeoh, G. Shreiber, The expression of alpha(1)-acid glycoprotein mRNA during rat development. High levels of expression in the decidua, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 5784-5790.
50. T. Nakamura, P.G. Board, K. Matsushita, H. Tanaka, T. Matsuyama, T. Matsuda, Alpha 1-acid glycoprotein expression in human leukocytes: possible correlation between alpha 1-acid glycoprotein and inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis, *Inflammation* 17(1993) 33-45.
51. J. Sorensson, G.L. Matejka, M. Ohlson, B. Haraldsson, Human endothelial cells produce orosomuroid, an important component of the capillary barrier, *Am. J. Physiol.* 276 (1999) H530-H534.
52. F. Boudreau, S.J. Yu, C. Asselin, CCAAT/enhancer binding proteins beta and delta regulate alpha1-acid glycoprotein gene expression in rat intestinal epithelial cells, *DNA Cell Biol.* 17 (1998) 669-677.
53. M. Vasson, M. Roch-Arveiller, C. Coderc, J. Baguet, D. Raichvarg, Effects of alpha-1 acid glycoprotein on human polymorphonuclear neutrophils: influence of glycan microheterogeneity, *Clin. Chim. Acta* 224 (1994) 65-71.
54. H. Tilg, E. Vannier, G. Vachino, C. Dinarello, J.J.W. Mier, Antiinflammatory properties of hepatic acute phase proteins. Preferential induction of interleukine 1 (IL-1) receptor antagonist over IL-1 β synthesis by human peripheral blood mononuclear cells, *J. Exp. Med.* 178 (1993) 1629-1636.
55. A. Boutten, M. Dehoux, M. Deschenes, J.D. Rouzeau, P.N. Bories, G. Durand, α 1-Acid Glycoprotein potentiates lipopolysaccharide-induced secretion of interleukin-1 β , interleukin-6 and tumor necrosis factor- α by human monocytes and alveolar and peritoneal macrophages, *Eur. J. Immunol.* 22 (1992) 2687-2695.
56. M. Bennet, K. Schmid, Immunosuppression by human plasma α 1-Acid Glycoprotein: Importance of the carbohydrate moiety, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77, (1980), 6109-6113.
57. D.F. Moore, M.R. Rosenfeld, P.M. Gribbon, C.P. Winlove, C.M. Tsai, Alpha-1-acid (AAG, orosomuroid) glycoprotein: interaction with bacterial lipopolysaccharide and protection from sepsis, *Inflammation* 21 (1997) 69-82.
58. F.E. Curry, J.C. Rutledge, J.F. Lenz, Modulation of microvessel wall charge by plasma glycoprotein orosomuroid, *Am. J. Physiol.* 257 (1989) H1354-1359.

59. C. Libert, P. Brouckaert, W. Fiers, Walter protection by α 1-Acid Glycoprotein against Tumor Necrosis Factor-induced lethality, *J. Exp. Med.* 180 (1994) 1571-1575.
60. M. Costello, B. Fiedel, H. Gewurz, Inhibition of platelet aggregation by native and desialised alpha-1 acid glycoprotein, *Nature* 281 (1979) 677-678.
61. W. Van Molle, C. Libert, W. Fiers, P. Brouckaert, Alpha 1-acid glycoprotein and alpha 1-antitrypsin inhibit TNF-induced but not anti-Fas-induced apoptosis of hepatocytes in mice, *J. Immunol.* 159 (1997) 3555-3566.
62. O. Pos, R.A. Oostendorp, M.E. Van Der Stelt, R.J. Scheper, W. Van Dijk, Con A-nonreactive human alpha 1-acid glycoprotein (AGP) is more effective in modulation of lymphocyte proliferation than Con A-reactive AGP serum variants, *Inflammation* 14 (1990) 133-141.
63. M. Costello, B. Fiedel, H. Gewurz, Inhibition of platelet aggregation by native and desialised alpha-1 acid glycoprotein, *Nature* 281 (1979) 677-678.
64. K. Schmid, H. Kaufman, S. Isemura, F. Bauer, J. Emura, T. Motoyama, M. Ishiguro, S. Nanno, *Bochemistry* 12 (1973) 2711-2724.
65. F. Albani, R. Riva, R.M. Contin, A. Baruzzi, Stereoselective binding of propranolol enantiomers to human alpha 1-acid glycoprotein and human plasma, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 18 (1984) 244-246.
66. A. Szallasi, N.E. Lewin, P.M. Blumberg, Identification of alpha-1-acid glycoprotein (orosomucoid) as a major vanilloid binding protein in serum, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262 (1992) 883-888.
67. P.J. McNamara, K.R. Brouwer, M.N. Gillespie, Autacoid binding to serum proteins. Interaction of platelet activating factor (PAF) with human serum alpha-1-acid glycoprotein (AAG), *Biochem. Pharmacol.* 15 (1986) 621-624.
68. D. Morin, N. Simon, P. Depres-Brummer, F. Levi, J.P. Tillement, S. Urien, Melatonin high-affinity binding to alpha-1-acid glycoprotein in human serum, *Pharmacology* 54 (1997) 271-275.
69. W. Chachaj, Z. Bartecka, J. Malolepszy, Histamine binding proteins separated from human sera by the chromatographic method, *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 28 (1980) 947-951.
70. J. Schley, B. Mueller-Oerlinghausen, The binding of chemically different psychotropic drugs to alpha 1-acid glycoprotein, *Pharmacopsychiatry* 16 (1983) 82-85.
71. Z.H. Israili, H. El-Attar, *Clin. Pharmacol. Ther.* 33 (1983) 255.

72. B. Grimaldi, C. Hamberger, D. Tremblay, In vitro study of the binding of RU 486 and RU 42 633 to human serum proteins, *Prog. Clin. Biol. Res.* 300 (1989) 445-448.
73. S. Urien, E. Albengres, J.L. Pinquier, J.P. Tillement, Role of alpha-1 acid glycoprotein, albumin, and nonesterified fatty acids in serum binding of apazone and warfarin, *Clin. Pharmacol. Ther.* 39 (1986) 683-689.
74. K.V. Ponganis, D.R. Stanski, Factors affecting the measurement of lidocaine protein binding by equilibrium dialysis in human serum, *J. Pharm. Sci.* 74 (1985) 57-60.
75. A.K.L. Wong, J.C. Hsia, In vitro binding of propranolol and progesterone to native and desialylated human orosomucoid, *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 61 (1983) 1114-1116.
76. G. Ashwell, J. Harford, Carbohydrate-specific receptors of the liver, *Annu Rev Biochem* 52 (1982), 531-554.
77. S. Tsuchiya, M. Yamabe, Yamaguchi Y, Y. Kobayashi, T. Kono, K. Tada, Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1), *Int. J. Cancer* 26 (1980), 171-176.
78. V. Carpentier, P. Midoux, M. Monsigny, A.C. Roche, Endocytosis of α 1-acid glycoprotein variants by human monocytic lineage cells, *Biol. Cell*, 77, (1993), 187-193.
79. Jorgensen HG, Elliott MA, Allan EK, Carr CE, Holyoake TL, Smith KD., Alpha1-acid glycoprotein expressed in the plasma of chronic myeloid leukemia patients does not mediate significant in vitro resistance to STI571, *Blood*, 99, (2002), 713-715.
80. Orleans-Lindsay JK, Barber LD, Prentice HG, Lowdell MW., Acute myeloid leukaemia cells secrete a soluble factor that inhibits T and NK cell proliferation but not cytolytic function--implications for the adoptive immunotherapy of leukaemia, *Clinical and Experimental Immunology*, 126, (2001), 403-411.
81. J. Costa, Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real, *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 22, (2004), 299-305.
82. R. Higuchi, C. Fockler, G. Dollinger, R. Watson, Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions, *Biotechnology*, 11, (1993), 1026-1030.
83. T.B. Morrison, J. Weis, C.T. Wittwer, Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification, *Biotechniques*, 24, (1998), 954-962.

84. R. Rasmussen, Rapid Cycler Real Time, Methods and Applications. Springer Press, Heidelberg, (2001), 21-34.
85. C.T. Wittwer, M.G. Herrmann, A.A. Moss, R. Rasmussen, Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification, Biotechniques, 22, (1997), 130-138.
86. C.T. Wittwer, K. Ririe, R. Rasmussen, Gene Quantification, Birkhäuser, Boston, MA, (1998), 129-144.
87. A. Giulietti, L. Overbergh, D. Valckx, B. Decallone, R. Bouillon, C. Mathieu, An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression, Methods, 25, (2001), 386-401.
88. M.W. Pfaffl, M. Hageleit, Biotechnol. Lett., 23, (2001), 275-282.
89. H.G.M. Niesters, Quantitation of viral load using real-time amplification techniques, Methods, 25, (2001), 419-429.
90. U. Lehmann, H. Kreipe, Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies, Methods, 25, (2001), 409-418.
91. S. Tsuchiya, Y. Kobayashi, Y. Goto, H. Okumura, S. Nakae, T. Konno, K. Tada, Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester, Cancer Research, 42, (1982), 1530-1536.
92. A.K. Abbas, A.H. Lichtman, J.S. Pober, Inmunología Celular y Molecular 4^a ed., España, 2002, McGrawHill Interamericana, 287-289.
93. B. Dasgupta, K. Roychoudhury, S. Gguly, M.A. Akbar, P. Das, S. Roy, Infection of human mononuclear phagocytes and macrophage-like THP-1 cells with *Leishmania donovani* results in modulation of expression of a subset of chemokines and chemokine receptor, Scandinavian Journal of Immunology, 57, (2003), 366-374.
94. D. Al-Numani, M. Segura, M. Doré, M. Gottschalk, Up-regulation of ICAM-1, CD11a/CD18 and CD11c/CD18 on human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2, Clin. Exp. Immunol., 133, (2003), 67-77.
95. Chomczynski, P. & Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, N. Anal. Biochem. 162, (1987), 156-159.
96. Luque, Herraéz, Tema 15: Clonación acelular: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Biología Molecular e Ingeniería Genética, Ed. Harcourt, 2001, España, 187-196.
97. T. Hochepleidn, F. Berger, H. Baumann, C. Libert, α 1-Acid Glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties, Cytokine and Growth Factor Reviews, 14, (2003), 25-34.

98. Tominaga T, Suzuki M, Saeki H, Matsuno S, Tachibana T, Kudo T. Establishment of an activated macrophage cell line, A-THP-1, and its properties. *Tohoku J Exp Med.*, 186(2), (1988), 99-119.
99. Duche JC, Urien S, Simon N, Malaurie E, Monnet I, Barre J., Expression of the genetic variants of human alpha-1-acid glycoprotein in cancer. *Clinical Biochemistry*, 33, (2000), 197-202.
100. Croce MV, Price MR, Segal-Eiras A., Association of a alpha1 acidic glycoprotein and squamous cell carcinoma of the head and neck, *Pathology Oncology Research*, 7, (2001), 111-117.
101. A. Steven, *American Cancer Society*, 80, (1997), 1448-1456.

ANEXO I. ABREVIATURAS

A. Adenina

AGP. Glicoproteína α -1 ácida

AM. Macrófagos alveolares

Fas. CD95. Miembro de la familia de los receptors del TNF

AP-1. Proteína de activación 1

Asn. Asparagina

Arg. Arginina

ATCC. American Type Culture Collection

C. Citosina

C3b. Fracción 3b del complemento

CCR5. Receptor 5 de quimiocina CC

C/EBP. CCAAT/enhacer binding protein

ConA. Concanavalina A

Ct. Threshold cycle

DEPC. Dietil pirocarbonato

DNAc. DNA complementario

dNTP. Deoxirribonucleótidos tri-fosfato

DRE. Elemento regulatorio distal.

Fc. Fracción cristizable de un anticuerpo

FRET. Transferencia de energía fluorescente mediante resonancia

G. Guanina

G3PDH. Glucosa-3-fosfato deshidrogenasa

GH. Hormona del crecimiento

GHRE. Elemento responsivo de la hormona del crecimiento.

Gln. Glutamina

GR. Receptor de glucocorticoides

GRE. Elemento responsivo de glucocorticoides.

IL-1. Interleucina 1

IL-1 RE. Elemento responsivo de IL-1.

IL-6. Interleucina 6

IL-6 RE. Elemento responsivo de IL-6.
IL-8. Interleucina 8
LBP. Proteína de unión al lipopolisacárido
LPS. Lipopolisacárido
Met. Metionina
MIP1 α . Proteína 1 α inflamatoria de macrófagos
MIP1 β . Proteína 1 β inflamatoria de macrófagos
NF- $\kappa\beta$. Factor nuclear $\kappa\beta$
NueAc. Ácido nueramínico
ORM. Orosomucoide
PII. Células epiteliales alveolares tipo II
PAF. Factor activador de plaquetaria
PB. Fenobarbital
PBRE. Elemento responsivo de fenobarbital.
PBS. Amortiguador salino de fosfatos
PCR. Reacción en cadena de la polimerasa
pI. Punto isoeléctrico
PMA. Porbol miristato acetato
RLT1. Buffer de lisis (RNAeasy mini kit, Qiagen, Valencia CA)
RNA m . RNA mensajero
RPE. Segundo buffer de lavado (RNAeasy mini kit, Qiagen, Valencia CA)
RT-PCR. Reverso transcripción- Reacción en cadena de la polimerasa
RW1. Primer buffer de lavado (RNAeasy mini kit, Qiagen, Valencia CA)
SRU. Unidad responsiva de esteroides.
T. Timina
TAE. Amortiguador de tris-acetato-EDTA
Taq. *Termus aquaticus*
THP-1. Línea celular THP-1
T m . Temperatura a la cual se disocia la mitad del DNA
TNF α . Factor de necrosis tumoral alfa
URE. Elemento responsivo río arriba.
Val. Valina

ANEXO II. REACTIVOS Y SOLUCIONES

Agua DEPC 0.1%

Dietil pirocarbonato	1mL
Agua desionizada	c.b.p 1L

Agitar 12 h y esterilizar, por triplicado
Almacenar a temperatura ambiente

PBS 1X

KCl	0.2g
K ₂ HPO ₄	0.12g
NaCl	8.0g
Na ₂ HPO ₄	1.136g
Agua DEPC	c.b.p. 1L

TAE 1X

Tris base	4.84g
Ácido acético glacial	1.142mL
EDTA pH 8 0.5M	2mL
Agua	c.b.p. 1L

EDTA 0.5M pH 8

Ácido etilendiaminotetracético	43.83g
Agua	c.b.p. 300mL

Agarosa 1.8% en TAE 1X

Agarosa grado electroforesis 1.8g

TAE 1X 100mL

Buffer de carga

Azul de bromofenol 0.25% 0.025g

Xilencianol FF 0.25% 0.025g

Glicerol 30% 3mL

Agua c.b.p.10mL

Low DNA Mass Ladder

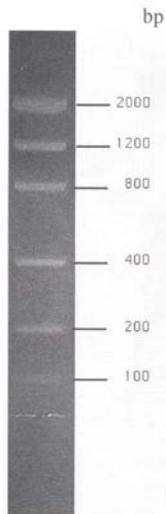


Table 1
Amount of DNA (ng) in each band

Fragment size	Volume of Low DNA Mass Ladder		
	2 μ l	4 μ l	8 μ l
2000 bp	100 ng	200 ng	400 ng
1200 bp	60 ng	120 ng	240 ng
800 bp	40 ng	80 ng	160 ng
400 bp	20 ng	40 ng	80 ng
200 bp	10 ng	20 ng	40 ng
100 bp	5 ng	10 ng	20 ng

Quality Control:

Agarose gel analysis shows that all bands (2000, 1200, 800, 400, 200, 100 bp) are clearly distinguishable. Sharpness and relative intensity of the bands and the absence of background are evaluated relative to a control lot by agarose gel analysis.

Low DNA Mass Ladder
4 μ l/application
2.0% agarose gel
stained with ethidium bromide