



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**EFEECTO DE MONOCITOS Y PLAQUETAS SOBRE UNIONES INTERCELULARES
ENDOTELIALES**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA**

**AUTOR: RAÚL GERMAN FARIAS BRAVO
PROFESOR GUÍA: DR. TM. RODRIGO MOORE CARRASCO**

**TALCA-CHILE
2019**

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

DEDICATORIA

A mis tres hermosas madres: Rosa Bravo Lizana, Adriana Bravo Lizana y Nilda Bravo Lizana, quienes me dieron la fuerza, apoyo incondicional y oportunidad de convertirme en lo que hoy en día soy.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos quienes de una u otra forma me brindaron ayuda para realizar esta memoria, en especial al Dr. Rodrigo Moore por guiarme en este proceso, a la Mg. Cs Natalia Veliz Olivo, por su activo apoyo en la parte técnica, procedimental y cognitiva, y al Dr. Claudio Valenzuela.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	1
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	4
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
MARCO TEÓRICO.....	8
1. APARATO CARDIOVASCULAR.....	8
2. ENDOTELIO.....	10
2.1. FUNCIÓN ENDOTELIAL	11
2.2. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL	12
3. INFLAMACIÓN.....	13
4. MIGRACIÓN TRANSENDOTELIAL DE LEUCOCITOS.....	15
5. UNIONES INTERCELULARES ENDOTELIALES.....	19
5.1 UNIONES ADHERENTES.....	22
5.2 CONEXINAS	24
5.3 UNIONES ESTRECHAS.....	25
HIPÓTESIS	29
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
1. LÍNEAS CELULARES EMPLEADAS.....	30

2. PROCEDIMIENTO PARA TRABAJAR CON CÉLULAS HUMANAS EN CULTIVO.....	31
2.1 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.....	31
2.2 DESCONGELAMIENTO DE LAS CÉLULAS.....	32
2.3 MANTENCIÓN DE LAS CÉLULAS CULTIVADAS.....	32
2.3.1.LÍNEAS CELULARES NO ADHERENTES.....	32
2.3.2.LÍNEAS CEULARES ADHERENTES.....	33
3. PREPARACIÓN DE PLAQUETAS LAVADAS.....	34
4. ENSAYO DE TRANSMIGRACIÓN DE MONOCITOS Y PLAQUETAS.....	34
4.1 ACONDICIONAMIENTO DE LA MEMBRANA TRANSWELL.....	35
4.2 FORMACIÓN DE LA MONOCAPA ENDOTELIAL.....	35
4.3 DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA MONOCAPA ENDOTELIAL.....	35
4.4 MIGRACIÓN CELULAR Y OBTENCIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS.....	36
5. DETERMINACIÓN DE CONDICIONES IDEALES PARA qPCR.....	38
5.1 DISEÑO DE PRIMERS.....	38
5.2 EVALUACIÓN DE PRODUCTO ÚNICO.....	39
5.3 EFICIENCIA DE LOS PRIMERS.....	40
6. EXPOSICIÓN DE LA MONOCAPA ENDOTELIAL A MEDIOS CONDICIONADOS.....	40
7. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL.....	41
8. TRATAMIENTO CON DNASA Y GENERACIÓN DE ADN COMPLEMENTARIO.....	41
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	42
RESULTADOS.....	43
1. SELECCIÓN DE PRIMERS.....	43

2.	DETERMINACIÓN DE PRODUCTO ÚNICO	43
3.	DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LOS PRIMERS	48
	DISCUSIÓN.....	51
	CONCLUSIÓN.....	58
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1: Secuencias de partidores utilizados para qPCR.....	44
Tabla 2: Selección de primers según Ct y amplificación de producto único	48
Tabla 3: Eficiencia de los primers de Claudina-5 y Ocludina.....	50

FIGURAS

Figura 1: Corte transversal de una arteria de grueso calibr	10
Figura 2: Etapas de la extravasación endotelial de leucocitos	16
Figura 3: Moléculas participantes en la migración celular.....	18
Figura 4: Proteínas de unión intercelular endotelial	21
Figura 5: Estructura de la ocludina humana asociada a la membrana plasmática.....	26
Figura 6: Medios de cultivo celular	31
Figura 7: Distribución de líneas celulares en las membranas de Transwell.....	37
Figura 8: Esquema de pocillo de transmigración celular o cámara de Boyden.....	37
Figura 9: Curva de melting primers ZO-1	45
Figura 10: Electroforesis producto ZO-1	46
Figura 11: Curva de melting primers Claudina-5	46
Figura 12: Curva de melting primers Ocludina	47
Figura 13: Gráficos eficiencia primers de Claudina 5 opción uno.....	49
Figura 14: Gráficos eficiencia primers de Ocludina opción uno.....	49

RESUMEN

Si bien, está documentado que las proteínas de unión intercelular cumplen un importante rol en la permeabilidad vascular, en la migración transendotelial solo se ha relacionado la interacción de los leucocitos con estas proteínas de una manera físico-mecánica, no obstante, en un reciente estudio se determinó que también podría existir una interacción indirecta por vía paracrina. Debido a la importancia de las uniones intercelulares en la permeabilidad vascular (específicamente las proteínas de las Tight Junctions) es que se espera que parte del mecanismo esté dado por la generación de un cambio en la regulación de la expresión génica de estas, inducido por acción paracrina producto de la interacción monocitos-plaquetas-endotelio. Para interrogar este mecanismo, se desarrolló un modelo *in vitro* replicando un microdominio endotelial y se llevó a cabo la confección de primers, en conjunto con la evaluación de sus parámetros de amplificación y eficiencia, con el fin de determinar como los medios condicionados obtenidos de la interacción monocitos-plaquetas-endotelio son capaces de modificar la expresión génica de ZO-1, Claudina-5 y Ocludina, por medio de qPCR. Los resultados demuestran que los primers tuvieron un buen diseño, presentando en su mayoría una amplificación de producto única y una eficiencia aceptable. Se concluye, con los análisis realizados, que es posible utilizar los primers diseñados para la cuantificación de la expresión génica de las proteínas Claudina-5 y Ocludina, en estudios posteriores.

Palabras claves: Tight Junctions, qPCR, Claudina-5, Ocludina y migración transendotelial.

INTRODUCCIÓN

La inflamación es un proceso inespecífico en el cual participan una gran cantidad de células y moléculas ligadas al aparato circulatorio, entre ellas las células endoteliales, leucocitos y plaquetas. Este proceso está implicado en un gran número de patologías y los mecanismos moleculares que tienen relevancia o protagonismo han sido un amplio objeto de estudio.

Una de las etapas que más ha causado interés en la literatura es la de la migración transendotelial de leucocitos que se lleva a cabo en procesos inflamatorios, ya que el número de moléculas de distinto tipo que forman parte de la inflamación y las reacciones o uniones que se llevan a cabo desde que los leucocitos entran en contacto con el endotelio activado, hasta que estos son capaces de atravesar esta barrera vascular para llegar a su tejido diana, es realmente compleja y mayormente desconocida.

El endotelio está conformado por células, que al igual que el resto de los tejidos, están unidas entre sí. En las células endoteliales se han descrito dos subtipos de uniones intercelulares: las uniones apretadas o “zona occludens” (del inglés “tight junctions”) y las uniones adherentes o “zona adherens” (del inglés “adherens junctions”), que le dan diferentes niveles de permeabilidad y selectividad para el paso de moléculas y células a través de estas.

En procesos inflamatorios, como lo son la respuesta inmune, el daño endotelial y la aterosclerosis, se conoce que los leucocitos realizan una extravasación desde el lumen vascular hacia los tejidos adyacentes afectados, y que, en esta extravasación a través del endotelio, las uniones entre las células que conforma este tejido cambian para facilitar la migración celular, sin embargo, lo que aún no está dilucidado es cómo los leucocitos ejercen la modificación de estas uniones proteicas. Se postula que este proceso podría estar asociado a una modificación a nivel de expresión de las proteínas que forman las uniones intercelulares, ejercida por acción paracrina de los monocitos, plaquetas o interacción monocito-plaqueta, sobre las células endoteliales. Es por lo anteriormente descrito que se pretende estudiar el efecto de los monocitos, plaquetas o el medio condicionado de estos, sobre la expresión génica de proteínas de unión intercelular en células endoteliales, mediante un modelo de simulación *in vitro* del microambiente vascular activado.

MARCO TEÓRICO

1. APARATO CARDIOVASCULAR

El aparato cardiovascular está principalmente formado por el corazón y los vasos sanguíneos que irrigan el organismo. El corazón es una gran bomba muscular intermitente y autocontrolada que está formada por cuatro cavidades que se agrupan formando dos bombas más pequeñas, las cuales se encargan de generar la fuerza suficiente para enviar, con cada latido, el volumen de sangre necesario a dos circuitos cerrados. Por un lado, está la bomba conformada por el atrio izquierdo y el ventrículo izquierdo, la cual envía sangre a la circulación general (mayor), y por otro lado está la bomba formada por el atrio derecho y el ventrículo derecho, que envía sangre a la circulación pulmonar (menor). Para que la sangre llegue a una zona en específico en el organismo, existen los vasos sanguíneos, los cuales forman una red de conductos que dirige esta sangre desde el corazón hacia los tejidos y también desde los tejidos hacia el corazón, permitiendo así que estos obtengan nutrientes y realicen el recambio gaseoso necesario para proveerse de oxígeno y eliminar el dióxido de carbono producido por el metabolismo celular. (1)

Entre los distintos vasos sanguíneos, recorriendo desde el corazón hacia los tejidos, en primer lugar, se encuentran las arterias, las cuales son vasos que distribuyen la sangre en el sentido anteriormente mencionado y que a medida que se alejan del corazón se ramifican progresivamente disminuyendo su calibre hasta llegar a ser vasos con un diámetro mucho menor a la arteria inicial, denominándose arteriolas. Una vez en el interior de los tejidos, las

arteriolas se ramifican en múltiples vasos microscópicos llamados capilares, los cuales son las ramas más pequeñas del aparato cardiovascular y se distribuyen entre las células de manera tal que casi todas las células del organismo están cerca de al menos un capilar sanguíneo. Es en esta estructura vascular donde se lleva a cabo el recambio gaseoso, tanto de oxígeno en un sentido, como de dióxido de carbono en el sentido contrario. Volviendo desde el tejido hacia el corazón, los capilares se unen entre ellos, formando grupos que dan origen a vasos sanguíneos pequeños denominados vénulas, los cuales son muy similares a las arteriolas, pero con una capa de músculo liso mucho más delgada. Las vénulas se fusionan a medida que se acercan al corazón formando vasos sanguíneos de mayor calibre, dando lugar a las venas, las cuales finalmente retornan la sangre al corazón. (2)

Los vasos sanguíneos, dependiendo de su calibre, están formados y recubiertos por distintas capas concéntricas: externa/adventicia, muscular/media e interna/íntima (fig. 1). La capa o túnica externa está formada por un tejido conjuntivo que es la continuación del tejido conectivo que proviene de los órganos o estructuras por las cuales circula el vaso. La capa muscular o media se compone de tejido conectivo formado por fibras musculares y elásticas, que dependiendo de si el vaso sanguíneo es arterial o venoso, o si es de mayor o menor calibre, tendrá distintos porcentajes de fibras musculares con respecto a las fibras elásticas, siendo las arterias y arteriolas las con un mayor porcentaje de músculo, y las vénulas y venas las con menor porcentaje. Por último, la capa más interna de los vasos sanguíneos es la túnica íntima, esta delimita la luz o diámetro vascular y está formada por una capa de células denominada endotelio, y una membrana basal, pudiendo además estar todo esto recubierto por una capa subendotelial de tejido conectivo laxo. Cabe destacar que no todos los vasos sanguíneos presentan tres capas en su pared vascular, siendo los vasos de gran o grueso calibre los que cuentan con todas estas bien desarrolladas, sin embargo, la capa que es inherente a todo tipo de vaso sanguíneo independiente de su calibre o función, es el endotelio. (3)

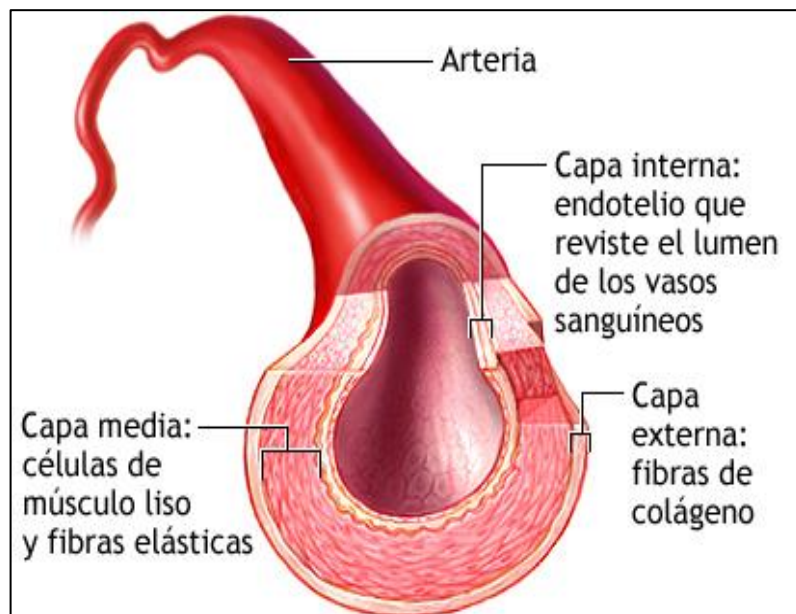


Figura 1: Corte transversal de una arteria de grueso calibre. La imagen muestra tres de las capas más importantes de los vasos sanguíneos, a partir de una figura que representa el corte transversal de una arteria de grueso calibre con una amplia capa muscular. Tomada de MedlinePlus, 2019. (4)

2. ENDOTELIO

El endotelio es un tejido muy simple formado por epitelio escamoso con solo una capa de células mesenquimales, el cual recubre la parte interna de todos los vasos sanguíneos del cuerpo humano. El endotelio puede ser continuo o discontinuo, el continuo puede ser fenestrado o no fenestrado. Las fenestraciones son poros transcelulares de aproximadamente 70 nm de diámetro y se extienden a través del grosor total de la célula y poseen un diafragma delgado de 5 a 6 nm alrededor de su entrada. En cuanto al endotelio continuo, por un lado, el endotelio continuo no fenestrado se encuentra en las arterias, venas y capilares del cerebro,

la piel, el corazón y los pulmones, mientras que, por otro lado, el endotelio continuo fenestrado es característico de los órganos involucrados en la filtración o la secreción de sustancias, incluyendo aquí: las glándulas endocrinas y exocrinas, los glomérulos renales, entre otros. En cuanto al endotelio discontinuo, es similar al endotelio fenestrado, excepto que las fenestraciones tienen un mayor diámetro y es encontrado en ciertos lechos vasculares sinusoidales, por ejemplo: el hígado. (5)

La unidad estructural básica del endotelio es la célula endotelial (CE), la cual es generalmente plana (a veces cubica) y su grosor puede variar desde menos de $0.1 \mu\text{m}$ en los capilares y venas, hasta $1 \mu\text{m}$ en la aorta (6). Entre las CE existe gran heterogeneidad a nivel de morfología, función, expresión génica y composición antigénica, lo cual no es inesperado, debido a que deben especializarse dependiendo de las diferencias hemodinámicas, fisiológicas y estructurales de los vasos sanguíneos de los cuales forman parte (7). Las células endoteliales, además de cumplir un papel estructural en la pared de los vasos sanguíneos, tiene un rol protagónico en numeradas situaciones a nivel circulatorio, y por ende, es pertinente conocer tanto sus funciones, como disfunciones.

2.1. FUNCIÓN ENDOTELIAL

Las funciones del endotelio son: el mantenimiento del tono vascular, la regulación del crecimiento celular vascular, regulación de la adhesión leucocitaria y plaquetaria, regulación de la trombosis y fibrinólisis, y mediación de la inflamación, sin embargo, la importancia del endotelio radica principalmente en que es una barrera altamente selectiva, es decir, solamente es permeable a algunos fluidos, iones y otras macromoléculas según sus características fisicoquímicas, regulando el paso de estas entre la circulación sanguínea y los tejidos

adyacentes por medio del glucocálix endotelial (capa superficial constituida por glicoproteínas, proteoglicanos y proteínas plasmáticas atrapadas, involucrado en la regulación de la permeabilidad vascular, pudiendo afectar la capacidad de diferentes moléculas para acceder al endotelio según su tamaño y su carga) y por medio de la modificación de los complejos proteicos que forman las uniones intercelulares endoteliales. (6)

El endotelio es un tejido metabólicamente muy activo, con una función relevante en la homeostasis vascular. Esta implica mantener un equilibrio elevadamente regulado entre un estado vasodilatador y uno vasoconstrictor. El estado vasodilatador se asocia comúnmente con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antitrombóticas, mientras que, por el contrario, un estado de tipo vasoconstrictor está frecuentemente relacionado con un ambiente prooxidante, proinflamatorio y protrombótico. El endotelio normal detecta cambios en distintos factores hemodinámicos (p.ej. presión y fuerzas de rozamiento) y hormonales (p. ej. sustancias vasoactivas, como mediadores que se producen en las células del sistema inmune y en las plaquetas), y entonces sintetiza y libera sustancias biológicamente activas que mantienen la homeostasis vascular. (8)

2.2. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

Luego de una variedad de estímulos nocivos, el endotelio experimenta una modulación fenotípica a un estado no adaptativo, comúnmente denominado "disfunción endotelial", caracterizado por la pérdida o desregulación de los mecanismos homeostáticos operativos en células endoteliales sanas. Esta condición fisiopatológica se asocia con una mayor expresión de moléculas de adhesión, una mayor síntesis de factores proinflamatorios y protrombóticos,

un mayor nivel de estrés oxidativo, biodisponibilidad reducida del óxido nítrico (determinante importante de la función endotelial), y una vasorreactividad anormal, que pueden conducir a diferentes manifestaciones. (9, 10)

La disfunción endotelial se considera en la actualidad una de las primeras manifestaciones de la enfermedad vascular y genera un ambiente circulatorio que predispone a la inflamación, la vasoconstricción y el incremento de la permeabilidad vascular, facilitando el desarrollo de arterosclerosis, agregación plaquetaria y trombosis. En las últimas décadas se ha demostrado que factores de riesgo coronario bien conocidos (el colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL), el tabaquismo, la diabetes, la hipertensión, etc.) y otros factores emergentes (radicales libres de oxígeno, homocisteína, infecciones, déficit estrogénico, etc.) producen disfunción endotelial. (11)

3. INFLAMACIÓN

La inflamación es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas. Son diversos los estímulos que pueden ocasionar una lesión tisular, ya sean de tipo exógenos o endógenos pudiendo dar lugar a esta compleja reacción en el tejido conectivo vascularizado. Esta reacción de carácter vascular da lugar a la acumulación de líquido y leucocitos en los tejidos extravasculares, y clásicamente se ha considerado integrada por los cuatro signos de Celso: calor, rubor, tumor y dolor. El calor y rubor se deben a las alteraciones vasculares que determinan una acumulación sanguínea en el foco, el tumor se

produce por el edema y acúmulo de células inmunes en la zona lesionada, mientras que el dolor es producido por la acción de determinados mediadores sobre las terminaciones nerviosas del dolor. (12)

Los aspectos básicos que se destacan en el proceso inflamatorio son, en primer lugar, la focalización de la respuesta, que tiende a circunscribir la zona de lucha contra el agente agresor. En segundo lugar, la respuesta inflamatoria es inmediata, de urgencia y, por tanto, preponderantemente inespecífica, aunque puede favorecer el desarrollo posterior de una respuesta específica. En tercer lugar, el foco inflamatorio atrae a las células inmunes de los tejidos cercanos, denominado también como quimiotaxis. De forma esquemática se puede dividir la inflamación en cinco etapas:

1. Liberación de mediadores: En una primera instancia se liberan moléculas que son sintetizadas por el mastocito bajo la estimulación de determinados factores.
 2. Efecto de los mediadores: Una vez liberadas, estas moléculas producen modificaciones vasculares y efectos quimiotácticos que favorecen la llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.
 3. Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio: Proviene en su mayor parte de la sangre, pero también de las zonas circundantes al foco.
 4. Regulación del proceso inflamatorio: Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio también integra una serie de mecanismos inhibidores tendentes a finalizar o equilibrar el proceso.
 5. Reparación: Fase constituida por fenómenos que van a determinar la reparación total o parcial de los tejidos dañados por el agente agresor o por la propia respuesta inflamatoria.
- (13)

Dentro de estas etapas, una de las que ha sido mayormente objeto de estudio en los últimos años, es la etapa tres, es decir, la llegada de las células inmunes al foco de lesión, pues son innumerables la cantidad de moléculas e interacciones involucradas en este proceso, tanto en la quimiotaxis, como en la transmigración endotelial de las células inmunes como tal.

4. MIGRACIÓN TRANSENDOTELIAL DE LEUCOCITOS

El proceso de extravasación leucocitaria o transmigración endotelial es un paso crucial de la respuesta inflamatoria, el cual implica la migración de los leucocitos desde el lumen vascular hasta los tejidos diana, donde ejercen su función efectora. La extravasación de los leucocitos está mediada por la acción conjunta de receptores de adhesión celular y factores quimiotácticos, e implica cambios morfológicos drásticos tanto en leucocitos como en células endoteliales. De este modo, constituye un proceso activo para ambos tipos celulares que promueve la rápida y eficiente llegada de los leucocitos a los focos inflamatorios sin comprometer la integridad de la barrera endotelial. (14)

Se ha visto que el funcionamiento coordinado de los receptores de adhesión, en conjunto con el citoesqueleto y las moléculas de señalización es crucial para llevar a cabo la extravasación leucocitaria (13). La secuencia de eventos que se desencadenan desde que los leucocitos salen de la luz vascular hasta que alcanzan el tejido intersticial (extravasación o transmigración) se pueden dividir en: marginación y rodamiento, adhesión firme y extravasación a través del endotelio. Cuando el flujo sanguíneo de las vénulas es normal, los leucocitos se desplazan a las paredes del vaso porque disminuyen las fuerzas de cizallamiento

(debido al incremento de la permeabilidad vascular), y este proceso de acumulación es al que se le denomina “marginación”. Después se adhieren al endotelio de manera transitoria (rodamiento) hasta que llegan a un punto en el que las uniones son tan firmes, que la célula se adhiere y fija en esa zona endotelial. Tras su adhesión firme, se produce una pronunciada respuesta morfológica de la célula endotelial, formando “estructuras de acoplamiento” o “copas transmigratorias”, posterior a eso, los leucocitos emiten sus pseudópodos hacia las uniones que existen entre las células endoteliales, se introducen apretadamente a través de ellas, y quedan situados entre la célula endotelial y la membrana basal. Luego atraviesan la membrana basal y salen al espacio extravascular, llegando al tejido diana; este último proceso es denominado “diapédesis” (Fig. 2). (12, 15)

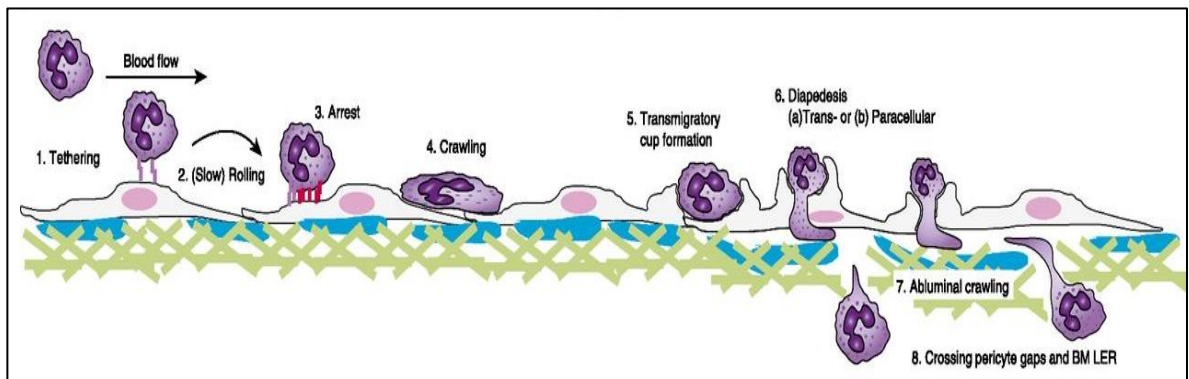


Figura 2: Etapas de la extravasación endotelial de leucocitos. La figura muestra cada una de las fases de la extravasación; primero la marginación y el rodamiento (o *Rolling*) de los leucocitos a lo largo del endotelio (1 y 2), seguida de una detención y adhesión firme en una zona específica (3.) Posteriormente, los glóbulos blancos se arrastran horizontalmente (*crawling*) (4) sobre las células endoteliales para encontrar un sitio permisivo para la trans migración, y una vez encontrado este sitio, ocurre la diapédesis (paracelular o transcelular), logrando llegar al tejido diana (5-8). Tomada de Schnoor, M, 2015. (15)

Una explicación un poco más molecular del proceso de migración transendotelial, sería la siguiente: Si bien, la marginación está mediada principalmente por factores quimiotácticos y cambios en el flujo sanguíneo producto de la inflamación, el rodamiento está mediado por la L-selectina (expresada en monocitos) y la P y E-selectina (expresada en el endotelio), interactuando con PSGL-1 (P-selectina glicoproteína ligando 1), CD44 o E-selectina ligando-1 (ESL-1). PSGL-1 y ESL-1 son los principales responsables del anclaje y la rodadura de los leucocitos en el endotelio, y debido a las bajas velocidades de rodadura, aumenta el tiempo de tránsito de los monocitos a través de los vasos inflamados, lo que favorece la probabilidad de que los monocitos se encuentren y se activen por las quimiocinas o mediadores de lípidos presentados en la superficie endotelial. En los monocitos, se sabe que la integrina 4 (VLA-4) ralentiza la rotación dependiente del ligando 1 de la E-selectina, lo que conduce a una adhesión estable. La detención de leucocitos se exagera aún más por unión entre las integrinas LFA-1 o Mac-1 y VLA-4, con los miembros de la superfamilia de la Ig del endotelio: ICAM-1 y VCAM-1, respectivamente (fig. 3, A) (16). En cuanto a la diapédesis, durante la migración transendotelial, las uniones célula-célula se desacoplan de forma transitoria y local para permitir que los leucocitos se crucen, y una vez que los leucocitos se adhieren firmemente al endotelio para realizar la extravasación, esta puede llevarse a cabo por vía transcelular o vía paracelular; en la vía transcelular, el leucocito pasa (literalmente) a través de una célula endotelial, donde la remodelación de actina dependiente de Wave-2 y Arp2/3 es necesaria para la apertura y cierre de los poros transmigratorios. La ICAM-1 se internaliza dentro de las caveolas enriquecidas con caveolina-1 para estabilizar el poro transmigratorio. La ICAM-1 se transloca a la membrana basal, donde puede servir como receptor para los leucocitos transmigrados (fig. 3, B1). En la vía paracelular, que es la más ampliamente estudiada, y la más común en la transmigración, las proteínas de unión a la actina, como la ZO-1 y la α -catenina (que estabilizan la barrera endotelial al conectar las TJ y las AJ al citoesqueleto de actina), deben desmontarse de sus receptores de adhesión y el citoesqueleto, para permitir así la apertura de la unión. Esto se acompaña de la formación de fibras de actomiosina contráctiles para ejercer fuerzas de tracción en las uniones (fig. 3, B2). (15, 16)

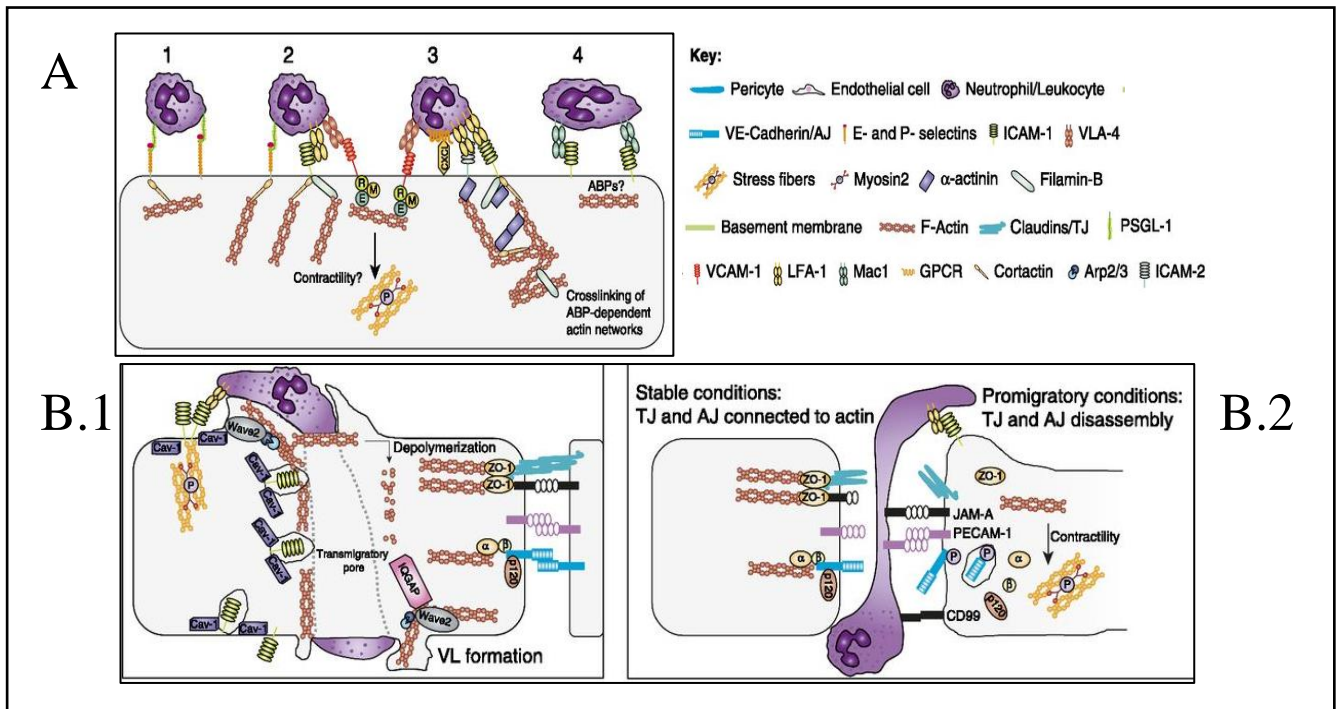


Figura 3: Moléculas participantes en la migración celular. La figura representa un “zoom” hacia las uniones que se generan en las distintas etapas de la transmigración, específicamente la A es la representación de las uniones que se llevan a cabo desde el *rolling* hasta la adhesión firme y *crawling*, mientras que B representa las interacciones moleculares que hay en una extravasación transcelular (B1) o paracelular (B2). Tomada y adaptada de Schnoor, M, 2015. (15)

La teoría más aceptada sobre el mecanismo utilizado por los leucocitos (incluyendo los monocitos) para atravesar la barrera endotelial, es la denominada: mecanismo de “cierre” o “zipper”. Esta teoría plantea que, a medida que el leucocito va pasando entre las células endoteliales, va abriendo las uniones intercelulares de forma mecánica, para luego que la célula ha atravesado, estas uniones vuelvan a ensamblarse.

Como se mencionó anteriormente, además de la ruta clásica de diapédesis ya nombrada, en la que los leucocitos cruzan a través de uniones interendoteliales (ruta paracelular), cada vez hay más indicios de que habría una ruta alternativa, en la que los leucocitos podrían migrar a través de células endoteliales individuales (ruta transcelular) sin perturbar mecánicamente las uniones interendoteliales (fig. 2). Este proceso tiene lugar preferencialmente en la microvasculatura, la barrera hematoencefálica o en vénulas de endotelio alto de los órganos linfoides secundarios, por contraposición a la macrovasculatura. Las observaciones recientes sobre el mecanismo de este proceso de migración transcelular indican que inicialmente los leucocitos generan podosomas invasivos dependientes de la actividad de Src kinasa y de WASP para palpar la superficie endotelial, que después evolucionan para formar el poro transcelular. Recientemente se ha descrito la existencia *in vivo* de estructuras endoteliales en forma de cúpula que cubren al leucocito durante la migración transendotelial, esto parece indicar que las estructuras endoteliales de anclaje podrían llegar a ser cúpulas que envolvieran totalmente los leucocitos en la cara luminal del endotelio, lo que permitiría la rotura de la membrana basolateral sin poner en peligro la función de barrera endotelial. (17)

A pesar de que la teoría de la ruta clásica está ampliamente aceptada, aún sigue siendo objeto de estudio, pues el mecanismo por el cual los leucocitos atraviesan el endotelio no está totalmente claro, y si bien se acepta que esto es por medio de un efecto mecánico de los leucocitos hacia las uniones intercelulares, no se ha descrito la posibilidad de que el proceso pueda ocurrir por efecto paracrino.

5. UNIONES INTERCELULARES ENDOTELIALES

Viendo el endotelio desde un punto de vista más molecular, las células endoteliales están unidas por complejos multiprotéicos que contienen proteínas integrales y proteínas citosólicas, siendo estas últimas las que unen las proteínas integrales al citoesqueleto intracelular (específica y mayoritariamente a actina), y en conjunto se les denomina “uniones intercelulares endoteliales”. Estas estructuras principalmente se encargan de mantener la homeostasis tejido-fluido, y regulan el paso de sustancias desde los tejidos hacia la circulación sanguínea (o en sentido contrario), siendo la presión oncótica plasmática derivada de la albúmina circulante, el factor principal que contribuye al intercambio pasivo de fluidos y solutos de vuelta a la circulación (18). Además, cumplen un rol primordial en la extravasación de leucocitos, ya que se requiere una apertura y cierre de estas proteínas, finamente regulados. Las proteínas de unión también pueden transferir señales intracelulares, que modulan el crecimiento de las células endoteliales y la apoptosis, y se puede esperar que la información transducida comunique a las células su propia posición, mediando la inhibición del crecimiento dependiente del contacto y estableciendo la polaridad celular. La pérdida de uniones interendoteliales como resultado de un proceso agudo o crónico, conduce a un flujo de fluido proteico hacia el intersticio que causa edema tisular. (19)

Las uniones interendoteliales o intercelulares endoteliales, están formadas por complejos de proteínas de uniones adherentes o Adherens Junctions (AJ), uniones estrechas o Tight Junctions (TJ) y uniones de brecha, también denominadas conexinas o Gap Junctions (GJ). Tanto las AJs como TJs forman unas estructuras de tipo cremallera ubicadas pericelularmente a lo largo de las fronteras de células endoteliales, por medio de la unión de distintos tipos de proteínas adhesivas. Por otro lado, las uniones de brecha son canales proteicos intercelulares que atraviesan las células endoteliales adyacentes, y permiten así, la comunicación eléctrica y química directa entre estas células, mediante el paso de iones y moléculas de señalización con un tamaño igual o menor a 1 kDa (18). En las células epiteliales, las uniones están constituidas de una manera altamente organizadas, con TJs y AJs siguiendo una distribución espacial totalmente definida a lo largo de las hendiduras intercelulares. Las Tight Junctions se concentran en el lado apical del borde celular, mientras que, por otro lado, las AJs se localizan debajo de las TJs. En contraste a las células epiteliales,

en las células endoteliales, la arquitectura de unión está menos definida y, a lo largo de la hendidura, las AJs se entremezclan con TJs (19).

Como se mencionó anteriormente, para clasificar las proteínas de unión intercelular, la forma más común de hacerlo es agrupándolas o separándolas en tres grupos: las uniones adherentes (AJ), las conexinas y las uniones estrechas (TJ) (fig. 4). A continuación, se entrega información un poco más detallada cada uno de los grupos.

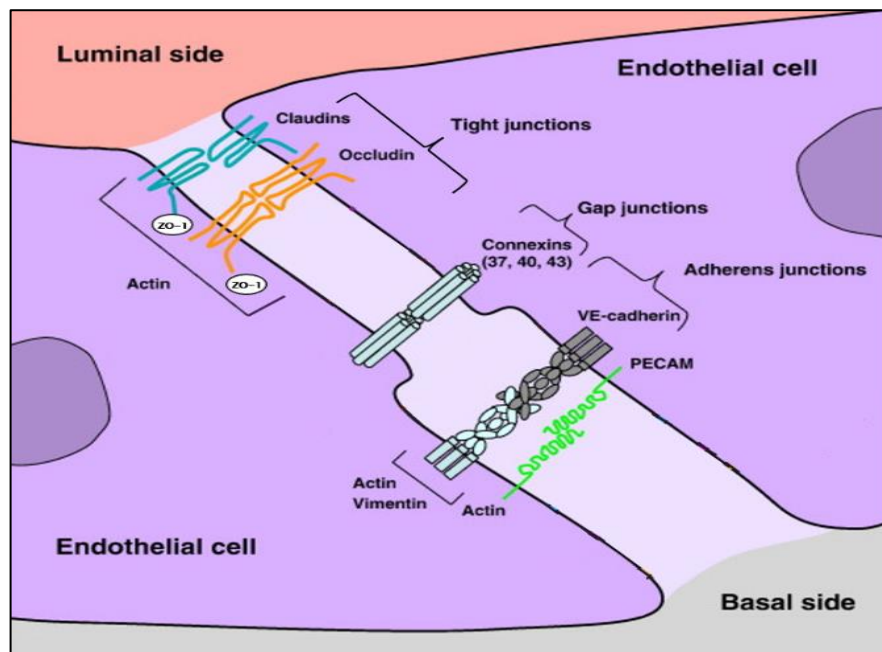


Figura 4: Proteínas de unión intercelular endotelial. Se esquematizan parte de las proteínas que participan en la unión intercelular de las células endoteliales, representando específicamente algunas, como: VE-cadherina, perteneciente a las Adherens Junctions; conexinas, perteneciente a las Gap Junctions; y ZO1, claudina y ocludina, pertenecientes a las Tight Junctions. El esquema no está a una escala de tamaño definida y es solo referencial. Tomada y adaptada de Wallez, Y, 2008. (20)

5.1. UNIONES ADHERENTES

Las uniones adherentes están compuestas por dos familias de receptores transmembrana y receptores de adherencia: las cadherinas y las nectinas. Estos dos tipos de proteína presentan regiones extracelulares que median la adhesión de las células a sus vecinas, mientras que las regiones intracelulares interactúan con una serie de proteínas citoplasmáticas que le dan estabilidad a la unión intercelular. Más específicamente, los dominios extracelulares de las nectinas se dimerizan con el dominio extracelular de las nectinas de las células adyacentes, mientras que la cola citoplásmica recluta afadin (proteína de unión a filamentos de actina) (21). Del mismo modo, las cadherinas se unen a las cadherinas de las células vecinas, mientras su cola citoplásmica recluta β -catenina, que a su vez se une a la α -catenina. Estas proteínas intracelulares controlan el ensamblaje y la dinámica de las uniones adherentes modulando las conexiones con el citoesqueleto de actina y estimulando las vías de señalización. (22, 23)

En el estudio de las uniones adherentes, se ha visto que existe una gran cantidad de diversas proteínas que participan en la formación de estas, sin embargo, a continuación, solo se plantean las características de algunas de las más destacadas: las VE-cadherinas y las cateninas.

La VE-cadherina pertenece a la superfamilia de las cadherinas clásicas y es una cadherina tipo II que posee una alta actividad adhesiva (20). Su rol, fundamentalmente, es mediar las interacciones homotípicas entre una célula y su célula adyacente, de una forma dependiente

de calcio (24). Estructuralmente, la VE-cadherina contiene un sitio de unión proximal para las cateninas p120 y p0071, y un sitio de unión distal para β -catenina y plakoglobina, ambas están vinculadas a la α -catenina, que puede interactuar con la α -actinina o con vinculina (20). Si bien, la expresión de la mayoría de las cadherinas está dada ampliamente en los tejidos, la expresión de VE-cadherina está limitada y es específica exclusivamente de las células endoteliales, debido a que su promotor se encuentra reprimido en otros tipos de células (25). Su rol está dado básicamente en la mantención de la unión de las células endoteliales entre sí, sin embargo, también se ha demostrado que podría tener implicancias en el nivel de expresión de la claudina-5 (una de las proteínas objeto de estudio en este trabajo científico) (26).

Las cateninas son un grupo de proteínas citosólicas que se encargan de generar la unión de las cadherinas con la actina o con los microtúbulos de citoesqueleto endotelial, proporcionando así un apoyo mecánico a esta unión. Las cateninas se subdividen en 3 grupos: β -catenina, α -cateninas y catenina p120 (p120ctn). La β -catenina se une a la región distal de la membrana del dominio citoplásmico de la cadherina, mientras que los miembros de la familia p120ctn se unen a la región proximal de la membrana de la cadherina (27). La estructura de la β -catenina incluye 12 repeticiones de armadillo (ARM) de aproximadamente 520 residuos de aminoácidos centrales que son responsables de la unión a la región intracelular de la cadherina; la β -catenina participa en una variedad de vías de señalización que regulan la proliferación celular, la supervivencia, la migración, la diferenciación durante el desarrollo embrionario y la regeneración de tejidos en organismos adultos; a diferencia de la multitud de cadherinas, solo hay una proteína β -catenina única que se expresa de forma ubicua y es obligatoria para toda la formación clásica de complejos de cadherina-catenina (28). La familia de proteínas p120ctn incluye dominios de repetición de 9-10 brazos que flanquean los extremos amino (NH_2) y carboxilo (COOH), y todos estos miembros de la familia tienen una amplia distribución en los tejidos, interactuando con la cadherina VE en su dominio yuxtamembrana, siendo un regulador clave de la expresión, el tráfico y la estabilidad de la cadherina VE en la membrana plasmática (24). La α -catenina, por su parte está relacionada estructuralmente con otras cateninas; tiene 4 dominios de haces

de hélices y carece de dominios ARM, siendo el extremo NH₂ el que se une a la β-catenina y el extremo COOH el que se une a la actina-F; además, las α-cateninas se unen a otras proteínas de unión a la actina, incluidas la vinculina, EPLIN, α-actinina y forminas, y pueden formar dímeros que tienen una afinidad distinta por el complejo cadherina-catenina, controlando así precisamente la regulación dinámica del citoesqueleto de actina en respuesta a la interacción extracelular de cadherina con células adyacentes (29).

5.2.CONEXINAS

En el grupo de las conexinas, se puede decir que son sistemas de comunicación de la membrana celular que une los citoplasmas de células adyacentes, el cual sirve para sincronizar respuestas mediante intercambio directo de iones o pequeñas moléculas de bajo peso molecular. Las uniones GAP (UG) están constituidas por proteínas transmembrana denominadas conexinas (Cx), las cuales forman un "hemicanal" o conexón, y al juntarse con otro conexón de una célula adyacente, forman un canal intercelular (30). En los vasos sanguíneos, estos canales facilitan la comunicación de las células endoteliales de larga distancia y sincronizan la contracción de las células del músculo liso de la pared vascular (31). Las células endoteliales de los vasos sanguíneos, incluyendo las del sistema coronario que impregna el corazón, presentan Cx37, Cx40, Cx43, y Cx45, pero el nivel de expresión, o incluso la presencia de estas, depende del diámetro de los vasos. Cx37 y Cx43 son predominantes en todos los niveles vasculares hasta los capilares, a diferencia de Cx40, que no está presente en las células endoteliales de los capilares, y Cx45 que sólo está presente en las arterias grandes. En el lado venoso, la expresión de las conexinas es baja. Las células musculares lisas que rodean el endotelio expresan Cx37, Cx43 y Cx45, mientras que la expresión de Cx40 es baja o no está presente. Algunas de estas conexinas se han encontrado asociadas a aterosclerosis, estando aumentadas en células espumosas, pero no tienen un rol protagónico en la permeabilidad vascular transendotelial (32).

5.3.UNIONES ESTRECHAS

Finalmente, y las que son más relevantes en este estudio, son las proteínas de las Tight Junctions. Las uniones estrechas son el componente más apical de las uniones intercelulares, teniendo principalmente dos funciones. Tienen una función de barrera o compuerta que regula el paso de iones, agua y macromoléculas a través de las regiones entre las células (es decir, el espacio paracelular) y también tienen la función de cerca que establece y mantiene la polaridad celular al regular la distribución de los lípidos dentro de la membrana. La arquitectura y composición de las TJ endoteliales varía entre los diferentes lechos vasculares. Las uniones estrechas están compuestas por más de 40 proteínas que se pueden dividir en dos grupos: las proteínas transmembrana (responsables de establecer contacto célula-célula en el espacio intercelular, entre ellas las claudinas y la ocludina) y las proteínas de unión a la actina citoplasmática (sirven como un enlace al citoesqueleto de actina, como por ejemplo, las proteínas de la zonula occludens (ZO)) (18, 22). A continuación, una revisión un poco más detallada de las proteínas que conforman las uniones estrechas involucradas en este estudio.

La ocludina es una proteína tetra-span (se extiende por la membrana cuatro veces) con un peso molecular aproximado de 65 kDa, la cual forma dos bucles extracelulares. El primer bucle extracelular media las interacciones de la ocludina entre células adyacentes, mientras que el segundo bucle extracelular es necesario para la unión de la ocludina con las uniones estrechas. Los extremos terminales citoplásmicos están orientados a mediar las interacciones proteína-proteína. El extremo COOH es importante para la formación de barreras de uniones estrechas y se une a varias proteínas citoplásmicas, incluidas las proteínas ZO (fig. 5) (22). Si bien, las ocludinas no son fundamentalmente necesarias para la formación de las cadenas

TJ, la ocludina se asocia con un aumento de la funcionalidad y estabilidad de estas uniones (20). Estudios relacionan la disminución del contenido de ocludinas en las células endoteliales con un aumento permeabilidad vascular, lo que hace pertinente su estudio para este investigación. (20, 33)

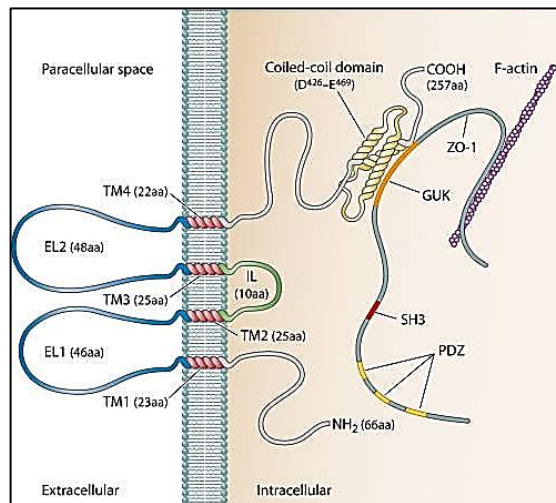


Figura 5: Estructura de la ocludina humana asociada a la membrana plasmática. Se pueden apreciar los dominios individuales de la ocludina y la interacción del extremo COOH-terminal de esta con el dominio GUK de ZO-1. “EL1 y 2” representan los bucles o “loops” extracelulares 1 y 2; GUK: dominio de guanilato quinasa; IL: bucle intracelular; SH3: dominio de homología 3 de Src; TM 1 a 4: dominios transmembrana 1 a 4. Tomada de Cummins, 2012. (33)

Las claudinas tienen cuatro dominios transmembrana, con el extremo NH₂ y el extremo COOH en el citoplasma, los cuales están dispuestos de tal manera que hay dos grandes bucles extracelulares y una cola citoplásmica. El bucle extracelular 1 contiene varios residuos de aminoácidos cargados que regulan la selectividad de la carga paracelular, mientras que el

segundo bucle extracelular media la dimerización de la claudina entre células adyacentes, lo que ayuda a sellar la unión y regular el transporte paracelular. Estas proteínas son denominadas la “columna vertebral” de las uniones estrechas y son los componentes más importantes de este tipo de uniones (22). Se cree que estas hebras proporcionan una barrera física entre la membrana apical y basolateral, teniendo la función de una “cerca”. Las claudinas regulan directamente la función de “puerta” como canales de unión estrecha paracelular (PTJC) que tienen propiedades biofísicas similares a las del canal iónico tradicional, incluida la selectividad de carga iónica, la dependencia de la permeabilidad de la concentración de iones y la competencia por el movimiento de moléculas permeativas (20). Dentro de las claudinas, unas de las más expresadas son la 5 y en menor cantidad la 3, siendo cambios aminoacídicos específicos la única diferencia. Tiene un rol protagónico en la regulación de la permeabilidad endotelial y por lo mismo se ha encontrado una gran relación entre la expresión de esta proteína y el paso de moléculas y células a través del endotelio (20, 33).

Las proteínas de la zónula ocludens (ZO) son miembros de la familia MAGUK (homólogos de guanilato quinasa asociados a membrana) con dominios de unión a proteínas de unión Adherens y Tight, además del citoesqueleto de actina. Entre las ZO, se encuentran ZO-1, ZO-2 y ZO-3, las cuales son estructuralmente similares con dos dominios importantes para mediar las interacciones proteína-proteína, cada dominio media las interacciones con proteínas específicas conocidas por localizarse en uniones adherentes y/o uniones estrechas. Dadas sus interacciones con las uniones adherentes y los componentes de uniones estrechas, se ha propuesto que, específicamente la ZO-1 es una proteína de andamiaje denominada como “el puente” entre las uniones Adherens y Tight (18, 22). En otras palabras, esta proteína es la que les da consistencia a los otros componentes proteicos al unir estos a la actina intracelular del citoesqueleto, y, por ende, de no estar presente, las otras uniones no tendrían la estabilidad necesaria para cumplir su función. (20)

La organización de las uniones endoteliales varía a lo largo del árbol vascular en función de los requerimientos específicos del órgano en donde se encuentren. Por ejemplo, en el cerebro, donde se demanda un control extremadamente estricto de la permeabilidad entre los componentes de la sangre y el sistema nervioso, las uniones están bien desarrolladas y son ricas en TJ. Mientras que, las vénulas postcapilares, que permiten el tráfico dinámico de células circulantes y proteínas plasmáticas, muestran unas TJ mal organizadas. Estas características morfológicas también pueden explicar la alta sensibilidad de las vénulas postcapilares a los agentes que aumentan la permeabilidad, como la histamina y la bradiquinina. En contraste, el endotelio de las arterias grandes, que controla la permeabilidad, tiene un sistema de TJ bien desarrollado. Finalmente, el endotelio linfático muestra estructuras de unión específicas, los complejos adherentes, que probablemente se especializan en controlar el paso de los linfocitos desde y hacia diferentes compartimentos. (19)

En un modelo experimental realizado en el Laboratorio de Medicina Molecular, Centro de Investigaciones Médicas, escuela de Medicina, Universidad de Talca, en el cual se quiso estudiar la migración de monocitos y plaquetas a través de una monocapa de endotelio activado *in vitro*, indirectamente se determinó que las moléculas producidas de la interacción monocito-plaqueta-endotelio, aumentaban la permeabilidad vascular, sin embargo, el mecanismo o proceso por el cual esto ocurría no fue determinado. (34)

Al relacionar estos resultados, y vincular las proteínas de unión intercelular con la migración transendotelial, hay posibilidades que el mecanismo paracelular y transcelular mediados por acción mecánica de los leucocitos, no sean la única vía de migración transendotelial, sino que puede haber un mecanismo paracrino, y una de las posibilidades de como regular el pasaje de estas células, podría ser el cambio en la expresión génica de las proteínas de unión intercelular, específicamente las que pertenecen a las Tight Junctions.

HIPÓTESIS

Los monocitos, plaquetas o su medio condicionado regulan la expresión génica de las proteínas involucradas en las uniones intercelulares del endotelio.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de los monocitos, plaquetas o el medio condicionado de estos, sobre la expresión génica de proteínas de unión intercelular en células endoteliales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.1 Diseñar oligonucleótidos para determinar la expresión de ZO-1, claudina 5 y ocludina, por medio de qPCR.
- 1.2 Evaluar la amplificación de producto único y eficiencia de los oligonucleótidos diseñados.
- 1.3 Determinar cambios de expresión génica de ZO-1, claudina 5, y ocludina, por medio de qPCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este trabajo de investigación, la modalidad utilizada fue un método *in vitro* replicado de un modelo desarrollado en Laboratorio de Medicina Molecular, Centro de Investigaciones Médicas, escuela de Medicina, Universidad de Talca, en el cual se simula un endotelio activado por medio de cultivo celular y medios de cultivo condicionados. Sin embargo, se le adaptó la medición de expresión génica de las proteínas de unión intercelular endotelial Ocludina, Claudina-5 y ZO-1.

1. LÍNEAS CELULARES EMPLEADAS

- 1.1. Monocitos THP-1: *Human Monocytic Cell Line* (THP-1, Monocitos, ATCC® TIB-202™) es una línea celular monocítica humana obtenida a partir de un paciente con leucemia monocítica aguda que presenta características similares a las expresadas por un monocito maduro.

- 1.2. Línea celular HMEC-1: *Human Microvascular Endothelial Cells 1* (HMEC-1, ATCC® CRL-3243™) es una línea celular endotelial originada por transfección e inmortalización a células de microvasculatura dermal que aún posee características endoteliales siendo un modelo vascular muy usado cuando se requiere el uso de epitelio vascular.

Ambas líneas celulares fueron donadas por el Doctor Fernando Delgado López del Laboratorio de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Católica del Maule.

2. PROCEDIMIENTO PARA TRABAJAR CON CÉLULAS HUMANAS EN CULTIVO

2.1. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Para el cultivo y mantención de las líneas celulares se prepararon dos medios de cultivo diferentes, a partir de “medios base” y algunos suplementos. La composición de cada uno está representada a continuación (fig. 6):

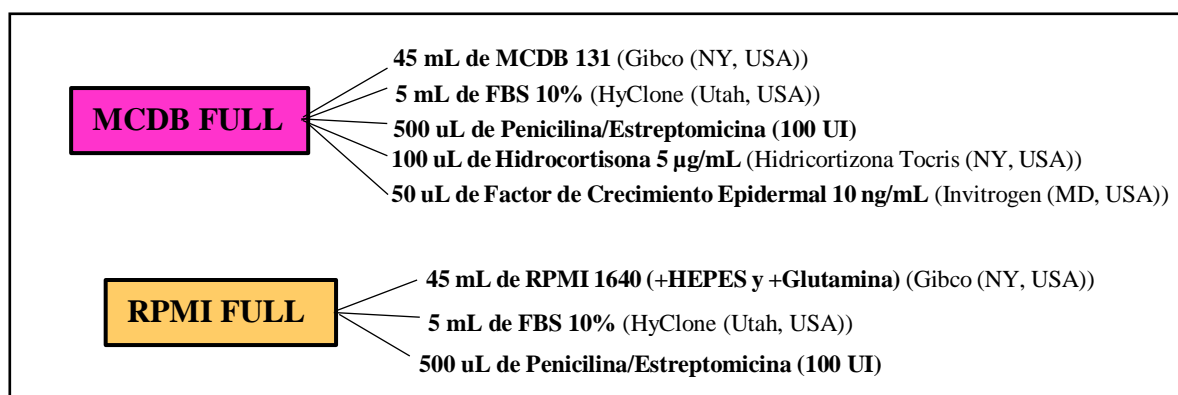


Figura 6: Medios de cultivo celular. El esquema representa los medios de cultivo utilizados y los suplementos que se le adicionaron, para preparar un volumen final de 50 mL. Estos medios de cultivo se volvieron a preparar según necesidad. Elaboración propia.

2.2.DESCONGELAMIENTO DE LAS CÉLULAS

Se extrajo el criovial con las células congeladas a -80°C y se descongeló a 37°C por 1 minuto en un baño termorregulado; el concentrado celular una vez líquido, se transfirió a un tubo cónico de 15 ml agregando medio de cultivo full precalentado a 37°C adecuado a la línea celular empleada, ya sea RPMI FULL para la línea THP-1, o MCDB 131 FULL para la línea HMEC-1. Luego se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos a 23°C . Pasada la centrifugación, se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet de cada tubo con su medio de cultivo correspondiente precalentado a 37°C , dejándolo a una concentración de 1×10^6 células/mL y agregando desde 5 a 7 ml en placas de cultivo estéril de 10 cm. Para el crecimiento celular, las células fueron incubadas a 37°C por 24 horas.

2.3. MANTENCIÓN DE LAS CÉLULAS CULTIVADAS

2.3.1. LÍNEAS CELULARES NO ADHERENTES

Se transfirió todo el contenido de la placa de células THP-1 a un tubo cónico de 15 mL y se centrifugó a 1000 rpm por 5 min a 23°C . Una vez centrifugado, se eliminó el sobrenadante y se tomaron 7 mL de RPMI FULL precalentado a 37°C , vertiendo 4 mL de este en el centro de una nueva placa de cultivo estéril de 10 cm, y los otros 3 mL se vertieron en el tubo con

pellet, utilizando el medio de cultivo para resuspender el sedimento, homogenizando cuidadosamente. Finalmente, se traspasó la resuspensión a la placa con los 4 mL medio, completando así 7 mL totales. Eso se incubó a 37°C, y dependiendo del requerimiento o uso de estas células, el proceso se repitió expandiendo el contenido de una placa, en dos, o bien, congelando las células a -80°C.

2.3.2. LÍNEAS CEULARES ADHERENTES

Una vez que las células lograron un 80-90% de confluencia, se aspiró el medio de cultivo MCDB131 FULL, se agregaron cuidadosamente 3 mL de solución PBS estéril para lavar y quitar restos del medio de cultivo, aspirando luego todo el PBS agregado. Posteriormente se agregó 1 mL de Tripsina/EDTA (Tripsina 1X. SAFC Biosciences (Kansas, USA)), cubriendo toda la superficie de la placa, para luego incubar esto por 7 minutos a 37°C con 5% CO₂ hasta observar el desprendimiento y cambio de forma de las células. Para detener la reacción se agregaron 5 mL de medio MCDB131 FULL tibio (37°C), y posterior a eso, se extrajo una alícuota para realizar conteo celular y se traspasó el resto de medio de cultivo a un tubo cónico para centrifugar a 1000 rpm por 5 minutos a 23°C. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido con 4 ml de medio MCDB131 FULL, el cual había sido calentado previamente a 37°. De esta resuspensión, se extrajo una alícuota y se vertió en una placa de 10 cm, asegurándose que esta alícuota fuese del volumen suficiente para dejar las células a una concentración de 1×10^5 células/mL en un volumen final de 7 mL, agregando medio de cultivo MCDB131 suplementado tibio (37°C) hasta alcanzar dicho volumen final. Dependiendo del uso se repitió el proceso en 2-3 días o se congelaron a -80°C.

3. PREPARACIÓN DE PLAQUETAS LAVADAS

Se obtuvieron 9 mL de sangre periférica de voluntarios sanos, con una edad media de 35 ± 8 años, y fueron mezclados con 1 mL de buffer de extracción de plaquetas. Dichos voluntarios firmaron un consentimiento informado previamente autorizado. Se excluyeron aquellos individuos que habían tomado antiagregantes plaquetarios o antiinflamatorios no esteroideos las 2 semanas previas a la obtención de la muestra, aquellos que hubiesen fumado hace menos de 24 horas, con comorbilidades o que hubiesen bebido alcohol hace menos de 48 horas.

Obtenida la sangre, esta se centrifugó a 1200 rpm por 10 minutos a 23 °C, se extrajo el sobrenadante (plasma rico en plaquetas, PRP) con mucho cuidado de no perturbar la capa leucocitaria, se traspasó a tubos Eppendorf y se centrifugó a 3700 rpm por 5 minutos a 23°C. Se eliminó el sobrenadante, para posteriormente resuspender el pellet con 200 µL de buffer CAF y se centrifugó a 700 rpm por 5 min a 23°C. Se extrajo el sobrenadante cuidadosamente y se volvió a centrifugar a 3700 rpm por 5 min a 23°C. El pellet finalmente fue resuspendido en medio MCDB131 con todos los suplementos del MCDB131 FULL, pero sin suero fetal bovino. La concentración se ajustó a 200×10^9 plaquetas/L. Cabe destacar que este procedimiento de obtención de PRP ya ha sido publicado anteriormente en otros estudios científicos (35).

4. ENSAYO DE TRANSMIGRACIÓN DE MONOCITOS Y PLAQUETAS

4.1. ACONDICIONAMIENTO DE LA MEMBRANA TRANSWELL

En una placa de 24 pocillos (Pocillos Transwell, Corning (USA). 24 pocillos 6,5 mm, poro de 3 μm), se agregó a cada uno 1000 μL de MCDB131 sin suplementos, sobre el pocillo se colocó la membrana Transwell. Para hidratar la membrana, se incubó por 30 minutos a 37°C con 5% CO_2 . Transcurrido el tiempo, sobre cada membrana se añadieron 50 μl de fibronectina 20 ng/mL, y se incubó la placa por 24 horas a 4°C, manteniendo la esterilidad.

4.2. FORMACIÓN DE LA MONOCAPA ENDOTELIAL

En el compartimento superior de una placa para trans migración con fibronectina 20 ng/mL, se agregaron células HMEC-1 (250.000 células en 200 μl de medio de cultivo MCDB131 FULL, post tripsinización de las células). Se incubó la placa con las membranas por 24 horas a 37°C para permitir así que esta línea celular formara una monocapa sobre la membrana de tereftalato de polietileno.

4.3. DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA MONOCAPA ENDOTELIAL

Se determinó la integridad de membrana usando la capacidad de permeabilidad de la albúmina, probada y utilizada ya por otros estudios (36). En 100 mL de solución HBSS (HyClone. (Utah, USA)) se disolvieron 36 mg de azul tripano (Azul tripano. Merck (NY, USA)) y 800 mg de albúmina de suero bovino (Albúmina Bovina Sérica. Rockland (Philadelphia, USA)), esta solución se incubó durante 10 minutos para formar un complejo estable con absorción a 590 nm, donde el azul tripano se une casi totalmente con la albúmina. En el compartimiento inferior se colocó 1 ml de HBSS mientras en el compartimiento superior se agregaron 300 μ L del complejo azul tripano/albúmina, incubando la placa a 37°C con 5% de CO² por 10 minutos. La difusión de albúmina fue cuantificada midiendo espectrofotométricamente el líquido del compartimiento inferior a 590 nm y comparándolo con la absorbancia del complejo azul tripano/albúmina. La membrana fue considerada íntegra o confluyente cuando la absorbancia de la solución del compartimiento inferior fue menor al 1% de la absorbancia del complejo. Las membranas no confluentes fueron descartadas.

4.4. MIGRACIÓN CELULAR Y OBTENCIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS

La monocapa endotelial se activó con TNF- α (Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)). Enzo Life Sciences (NY, USA)), a una concentración de 10 ng/mL durante 4 horas. En el compartimiento inferior, para estimular la migración, se agregó una solución 1 μ M de N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanina (fMLP, Sigma (Missouri, USA)) disuelto en MCDB131 sin suplementos (este quimioattractante es de origen bacteriano y favorece el movimiento de células mieloides, como los monocitos y granulocitos). Posteriormente, la línea celular que se depositó en los compartimentos A de cada una de las membranas para realizar la migración, se distribuyó de la siguiente manera: 3 membranas con plaquetas suspendidas (1x10⁷ por pocillo) en el compartimiento superior, 3 membranas con monocitos THP-1 (1x10⁵ por pocillo), y 6 membranas con ambas líneas celulares en el compartimiento A (figura 7). Las células se dejaron migrar durante 2 horas a 37°C con 5% CO₂. Posterior a la migración celular, se extrajo el sobrenadante de cada uno de los compartimentos “A” (figura

8) y se agruparon en tubos Eppendorf según las condiciones de migración, obteniendo 3 tubos distintos. Esos tubos se centrifugaron a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C, se tomó cuidadosamente el sobrenadante y se vertió en tubos nuevos, obteniendo finalmente, 3 tubos con medios condicionados distintos: uno producto de la migración de plaquetas solas (medio condicionado A), otro a partir de células THP-1 solas (medio condicionado B), y el otro, obtenido por la migración e interacción de THP-1 junto a las plaquetas (medio condicionado C).

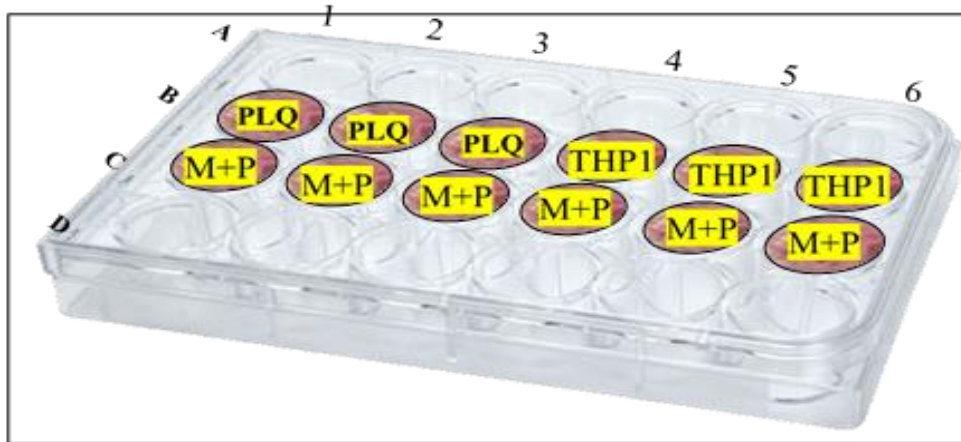


Figura 7: Distribución de líneas celulares en las membranas de Transwell. Se puede observar que células fueron puestas en cada una de las membranas para realizar la migración. B1, B2 y B3 corresponden a PLQ (plaquetas); B4, B5 y B6 corresponden a THP-1 (monocitos THP-1); y de C1 a C6 M+P (Monocitos THP-1 y plaquetas)

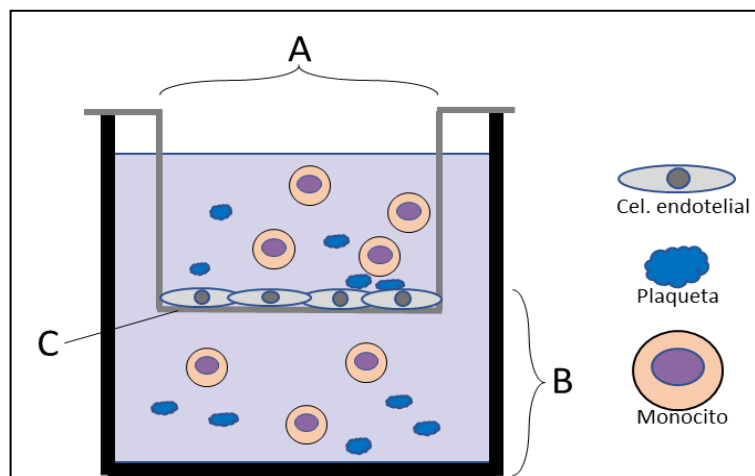


Figura 8: Esquema de pocillo de trans migración celular o cámara de Boyden. Se representa el modelo de trans migración celular *in vitro*, donde A: compartimiento superior; B: compartimiento inferior. C: membrana con poros de 3 μ m. Elaboración propia.

5. DETERMINACIÓN DE CONDICIONES IDEALES PARA qPCR

5.1 DISEÑO DE PRIMERS

Para el diseño de los primers, primero se buscaron las secuencias de mRNA de cada proteína que se quiso evaluar la expresión génica (Ocludina, Claudina-5 y ZO-1), ingresando a la base de datos de la página web “National Center for Biotechnology Information” (NCBI). Una vez encontrada la secuencia FASTA, esta fue utilizada e ingresada en los programas de página web Primer-BLAST y Primer3. Con estos programas se diseñaron los primers con las siguientes características: Tm: 60-65°C; longitud de primers: 20-25pb; producto: 100-200pb y %GC: 45-40. Seguido de esto, todos los pares de primers obtenidos fueron analizados en las distintas opciones de *OligoAnalyzer* (Integrated DNA technologies: IDT), evaluando las estructuras secundarias (como horquillas o “loops”) que podría formar cada primer consigo mismo, la formación de homodímeros de cada secuencia y la formación de heterodímeros con su primer pareja, eligiendo así los pares de primers que presentaran menor posibilidad de formar estas estructuras. Finalmente, se analizó la especificidad de unión de cada primer (unión única) en la base de datos de “NCBI/PrimerBLAST”, asegurándose que solo se uniera al mRNA de las proteínas objetos de estudio en esta investigación. Una vez elegidas 2 opciones de pares de primers para cada gen de interés, estos fueron comprados a una empresa.

Debido a que los primers estaban liofilizados, estos fueron resuspendidos en agua libre de nucleasas con los volúmenes indicados por el fabricante para dejarlos a una concentración de 100 μ M. Luego, se tomó una alícuota de 10 μ L de cada primer forward y se juntó con una alícuota de 10 μ L de su primer reverse correspondiente, y se adicionaron 80 μ L de agua ultra purificada, obteniendo así 6 mix de primers diferentes,

con cada par primer a una concentración de 10 μ M. Estos mix de primers se guardaron a -20°C hasta su utilización.

5.2 EVALUACIÓN DE PRODUCTO ÚNICO

Para evaluar si los primers efectivamente podían ser utilizados en qPCR, se procedió a realizar la amplificación de producto único, para ello se usó el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, Carlsband, CA), el cual incluye la Taq ADN polimerasa Máxima® Hot Start, dNTPs, un buffer para PCR, SYBR® Green I y como referencia ROX. Las reacciones se realizaron según las indicaciones del fabricante. Cada reacción se preparó con, 10 μ L de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), 1 μ L del mix de partidores (forward y reverse), 7 μ L de agua libre de nucleasas y 2 μ L de cDNA en el caso de las pruebas, o con 2 μ L de agua libre de nucleasas en caso de los blancos. El cDNA fue obtenido y sintetizado previamente según la metodología explicada en los puntos 6 y 7. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador de tiempo real Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), utilizando el siguiente perfil térmico:

1. 95°C x 10 minutos
2. 95°C x 15 segundos
3. 60°C x 15 segundos
4. 72°C x 20 segundos
5. Repetir desde punto “2” hasta punto “4”, 40 veces
6. Curva de Melting de 60 a 95°C con lectura cada 0,5°C

*Los datos fueron obtenidos mediante el software MxPro QPCR.

5.3 EFICIENCIA DE LOS PRIMERS

Posterior a la determinación del producto único, se eligió a una de las 2 opciones de primers para cada gen de interés, a los cuales se les realizó una determinación de eficiencia. Para ello, se tomó el cDNA resultante del amplicón del proceso anterior, y fue sometido a una dilución seriada de tipo logarítmica (10 en 10) con volúmenes finales de 500 μ L. De las diluciones anteriores se tomaron los puntos desde $1/10^4$ hasta $1/10^8$ y fue realizado el mismo procedimiento que en la determinación de producto único, pero esta vez usando como cDNA, con cada una de las diluciones. Esto se realizó por replica técnica y se usó un control negativo por curva. Los resultados aberrantes fueron eliminados, y los otros valores fueron usados en el cálculo de eficiencia. Se utilizó como rango aceptable una eficiencia de 90-110%

6. EXPOSICIÓN DE LA MONOCAPA ENDOTELIAL A MEDIOS CONDICIONADOS

Se dispone de placas de 6 pocillos Multiwell de 3,5 cm de diámetro aproximadamente, en las cuales se cultivan las células de la línea HMEC-1 en las mismas condiciones anteriormente nombradas. Una vez las monocapas están confluentes, son expuestas a distintos medios: medio control (medio RPMI sin las células), medio condicionado A, medio condicionado B y medio condicionado C (punto 4.4), luego se deja actuar este por 4 horas, y finalmente este medio es eliminado para someter a las células a una extracción de ARN. Esto es realizado en triplicado para cada uno de los medios condicionados.

7. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

Las células fueron lisadas con 1 mL de solución de TRIzol® Reagent (Ambion® by life technologies™, Carlsband, CA) y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 200 µL de cloroformo por cada 1 mL de TRIzol® Reagent utilizado. La mezcla fue agitada vigorosamente e incubada por 3 minutos a temperatura ambiente para luego centrifugarla a 12.000 g (Microcentrífuga D3024R, SCIOLOGEX, USA) por 15 minutos a 4°C. El ARN presente en la fase acuosa fue precipitado con 500 µL de isopropanol (por 1 mL de TRIzol® Reagent inicial). Las muestras se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugaron a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue removido, mientras que el precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 75% y se procedió a centrifugar a 7.500 g por 5 minutos a 4°C. Se descartó nuevamente el sobrenadante y el pellet se secó a 50°C para luego ser resuspendido en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

8. TRATAMIENTO CON DNASA Y GENERACIÓN DE ADN COMPLEMENTARIO

Las muestras de ARN obtenidas fueron tratadas utilizando el Kit TURBO DNA-free™ (Ambion® life technologies™, Carlsband, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, para 10 µg de ARN se agregó 1 µL de TURBO DNase (2 Units/µL), 5 µL de 10×TURBO DNase Buffer, y se completó la reacción hasta un volumen de 50 µl con Nucleasefree Water. Las muestras fueron incubadas 30 minutos a 37°C, luego de lo cual se les agregaron 5 µL de DNase Inactivation Reagent, seguido de una incubación por 5 minutos a temperatura ambiente y una centrifugación por 2 minutos a 10.000 g (Microcentrífuga D3024R, SCIOLOGEX, EEUU). El sobrenadante que se obtuvo fue almacenado a -80°C o fue inmediatamente utilizado en la síntesis de ADN complementario (ADNc).

Para generar ADNc se utilizó el Kit First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific, Carlsband, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. A 1 µg de ARN libre de DNasa se le agregó 1 µL de Oligo (dT)18 Primer (100 µM), y Nuclease-free Water hasta completar un volumen de 11 µL. Luego de incubar por 5 minutos a 65°C, se adicionaron 4 µL de 5x Reaction Buffer, 1 µL de RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL), 2 µL de dNTP Mix (10 mM) y 2 µL de MMuLV Reverse Transcriptase (20 U/µL), completando un volumen final de 20 µL. Finalmente las muestras se incubaron durante 60 minutos a 42°C, 5 minutos a 70°C y 5 minutos a 4°C utilizando un termociclador (Veriti-96, Applied Biosystems, Foster City, CA). Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos de la expresión génica por triplicado son expresados como medias \pm SD y luego analizados usando el programa SPSS de Windows versión 15.0.. La comparación entre grupos se realiza usando el test de ANOVA.

RESULTADOS

1. SELECCIÓN DE PRIMERS

Como se mencionó anteriormente, para seleccionar las secuencias de primers a utilizar para la qPCR, estas fueron elegidas en base a ciertas características evaluadas en programas online que simulan digitalmente las interacciones que tendrán estas secuencias en el momento de hacer la reacción, la cual es expresada como ΔG en la formación de homodímeros, heterodímeros y estructuras secundarias. Para elegir los primers se seleccionaron los que tuviesen sus ΔG de menor magnitud en la mayoría de los parámetros a evaluar. Los datos de las secuencias elegidas y sus características se encuentran expresados en la tabla 1.

2. DETERMINACIÓN DE PRODUCTO ÚNICO

Los resultados de qPCR del estudio de producto único para cada par de primer fueron adquiridos desde el software MxPro QPCR, y se encuentran graficados en las figuras 9, 11 y 12.

Tabla 1: Secuencias de partidores utilizados para qPCR.

mRNA		Secuencia primer	Tm	Tamaño producto	ΔG homodimeros	ΔG heterodimeros	ΔG estructuras secundarias
ZO-1: NM_001301026.1	1	FW: GGCCTAGTAGGTCGGGTTTTCTT	62.48°C	206 pb	-3.61 kcla/mol	-3.9 kcla/mol	-0.27 kcla/mol
		RV: CATTGCTGTGCTCTTACTGTGGC	62.50°C		-3.14 kcla/mol		0.01 kcla/mol
	2	FW: GGCCTAGTAGGTCGGGTTTTCTT	62.04°C	206 pb	-3.61 kcla/mol	-3.9 kcla/mol	-0.27 kcla/mol
		RV: CATTGCTGTGCTCTTACTGTGGC	62.50°C		-3.14 kcla/mol		0.01 kcla/mol
Claudina-5 NM_001363067.1	1	FW: GTCAGACTGAGGATTCGCTTCC	61.23°C	138 pb	-5.13 kcla/mol	-4.74 kcla/mol	0.13 kcla/mol
		RV: AGACCAGCTGTACACATCTTCCG	62.23°C		-10.24 kcla/mol		0.36 kcla/mol
	2	FW: GTCAGACTGAGGATTCGCTTCC	61.23°C	155 pb	-5.13 kcla/mol	-5.19 kcla/mol	0.13 kcla/mol
		RV: CCCTGCCGATGGAGTAAAGACC	62.69°C		-3.61 kcla/mol		0.01 kcla/mol
Ocludina NM_001205254.2	1	FW: GAAGCCAAACCTCTGTGAGCATC	61.97°C	106 pb	-3.17 kcla/mol	-5.02 kcla/mol	-0.03 kcla/mol
		RV: TGGAGTGTTCCAGCCCAGTTGATT	62.34°C		-5.02 kcla/mol		0.09 kcla/mol
	2	FW: TGTCATCCAGGCTCTTGAAAGT	61.84°C	107 pb	-3.54 kcla/mol	-3.3 kcla/mol	0.31 kcla/mol
		RV: TCGAACATACATCTCTCCACCAT	59.04°C		-6.76 kcla/mol		1.24 kcla/mol

En la tabla se adjuntan las secuencias utilizadas como primers para la qPCR en la determinación de mRNA de 3 proteínas de unión intercelular endotelial: ZO-1, Claudina-5 y Ocludina. Además, se puede ver sus respectivas Tm y los distintos ΔG . Si bien, había distintas magnitudes de ΔG para cada primer, el que se puso en la tabla, solo fue el más alto. Siglas: ZO-1: Zona occludens-1; FW: Forward; RV: Reverse; Tm: temperatura de melting; pb: pares de bases. Elaboración propia.

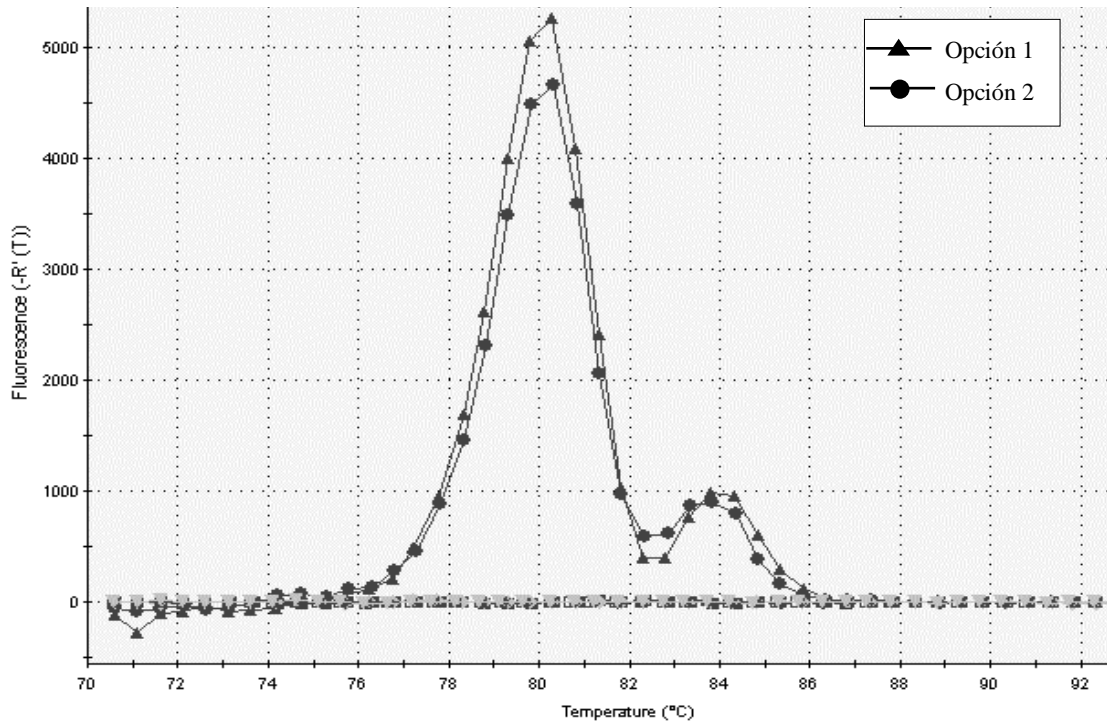


Figura 9: Curva de melting primers ZO-1. En figura se puede observar que ambos pares de primers, tanto la opción 1 como la opción 2 presentan la replicación marcada de un producto el cual presenta un peak de fluorescencia a los 80°C, sin embargo, se alcanza a ver un segundo peak a los 84°C. Ambos pares de primers son descartados para la evaluación de expresión de ZO-1.

Debido a la presencia de otro peak de fluorescencia, se procedió a realizar una electroforesis en gel de agarosa con el fin de caracterizar la amplificación que se tuvo, el resultado se presenta en la figura 10.

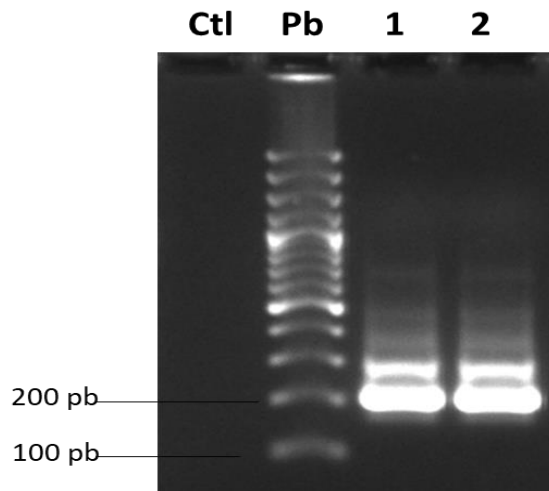


Figura 10: Electroforesis producto ZO-1. En la figura se puede observar los resultados de la electroforesis de agarosa para el DNA resultante de la prueba de qPCR para los primers de ZO-1. Ctl: se cargó la muestra tomada de uno de los blancos en la qPCR donde se usaron los primers para ZO-1; Pb: marcador de peso molecular O'GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (ThermoFisher); 1: muestra tomada del producto de la qPCR realizada con la opción 1 de primers para ZO-1; 2: muestra tomada del producto de la qPCR realizada con la opción 2 de primers para ZO-1.

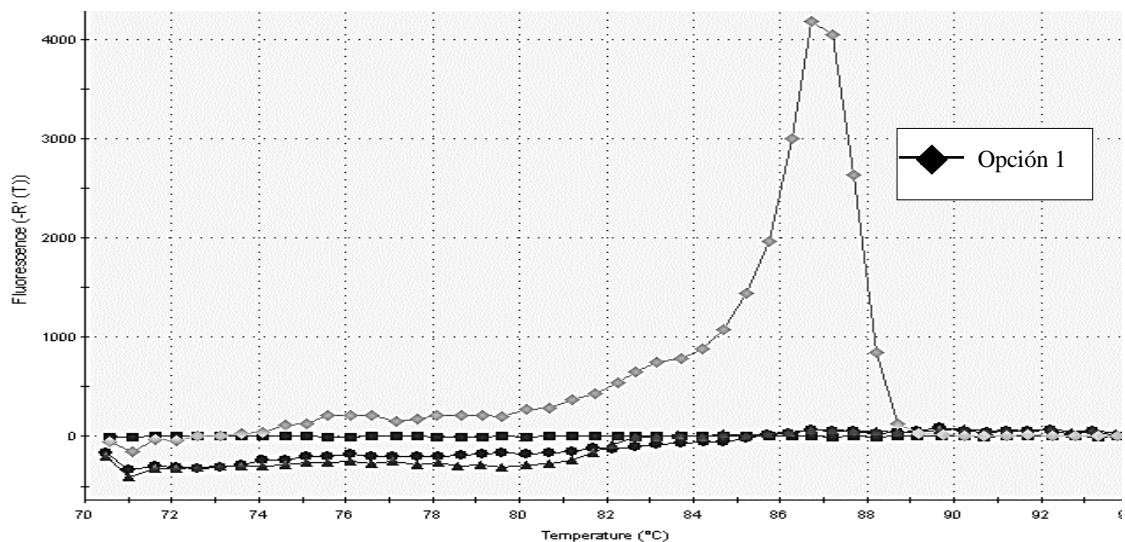


Figura 11: Curva de melting primers Claudina-5. En figura se puede observar que la opción 1 presenta la replicación de un producto único, presentando un peak de fluorescencia a los 87°C.

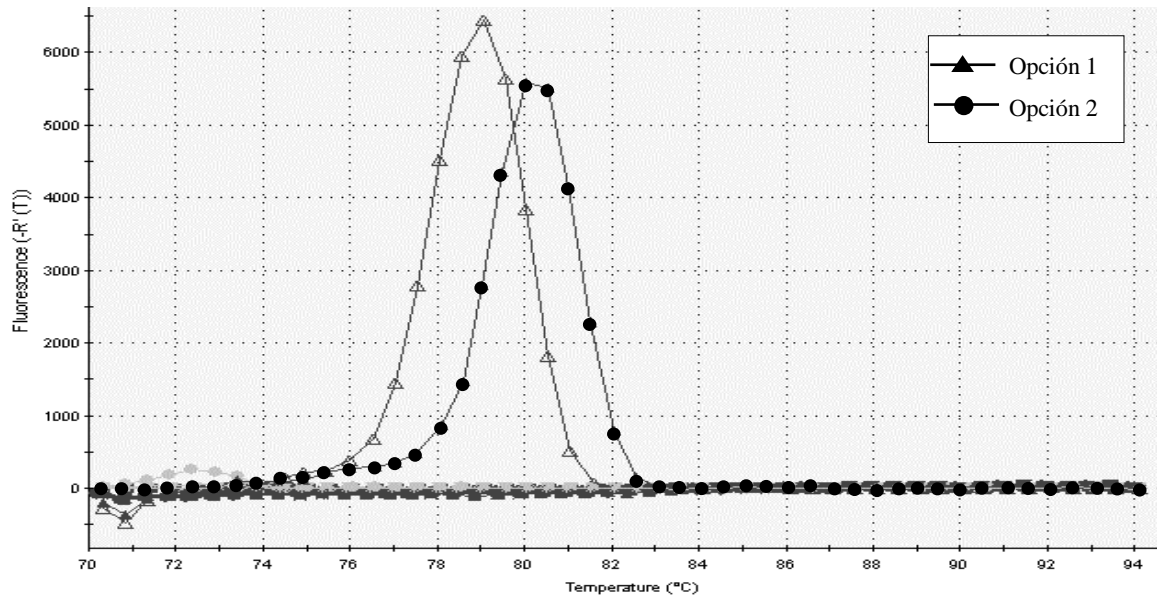


Figura 12: Curva de melting primers Ocludina. En figura se puede observar que ambos pares de primers, tanto la opción 1 como la opción 2, presentan la replicación de un producto único, los cuales presenta un peak de fluorescencia a los 79°C para la opción 1 y un peak a los 80°C para la opción 2.

Una vez analizada la curva de melting, y luego de haber descartado los primers que no amplificaron un producto único o simplemente no amplificaron en lo absoluto, se eligió uno de los dos pares de oligonucleótidos para cada proteína a estudiar, en base a su ciclo de cuantificación.

Tabla 2: Selección de primers según Ct y amplificación de producto único.

Par de primers	Ct
ZO-1 opción 1	SIN PRODUCTO ÚNICO
ZO-1 opción 2	SIN PRODUCTO ÚNICO
Claudina-5 opción 1	33.37
Claudina-5 opción 2	33.37
Ocludina opción 1	24.65
Ocludina opción 2	27.64

En la tabla se ve cual fue el número de ciclos necesarios para que la replicación alcanzara una forma exponencial (Ct). Elaboración propia.

A partir de la tabla 2, el par de primers seleccionado en el caso de la Claudina-5 y la Ocludina es la opción 1, mientras que, como se dijo anteriormente, los pares de primer para ZO-1 fueron descartados para este ensayo.

3. DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LOS PRIMERS

Una vez seleccionados los primers, el siguiente paso fue medir la eficiencia de cada uno de estos, según el protocolo que se mencionó anteriormente, los resultados obtenidos fueron graficados automáticamente por el software MxPro QPCR, los cuales estan representados por las figuras 13, 14 y 15.

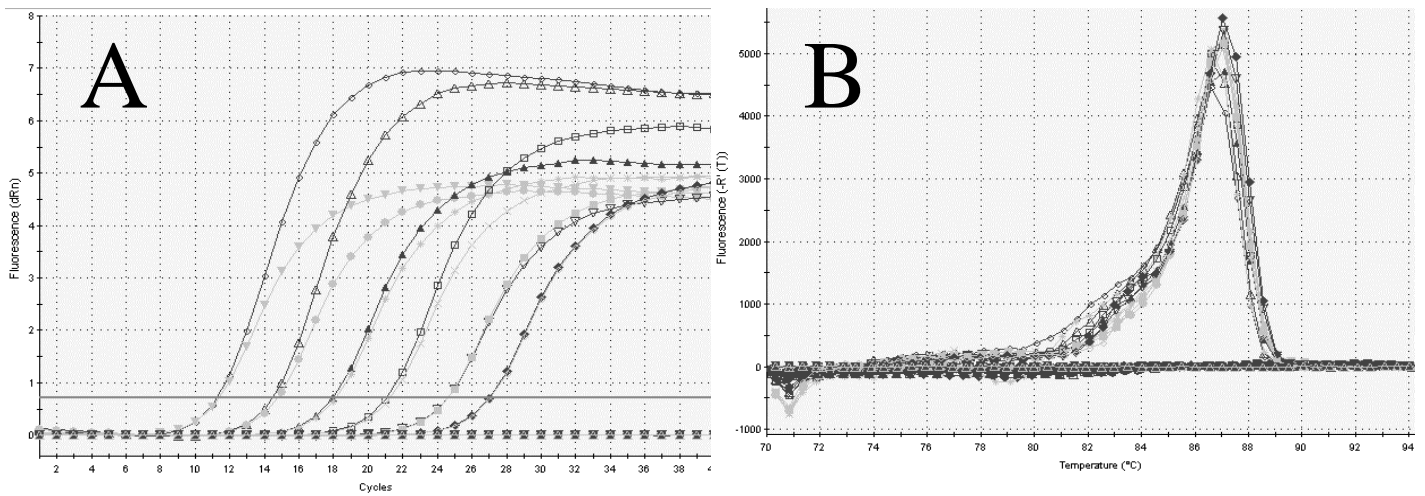


Figura 13: Gráficos eficiencia primers de Claudina 5 opción uno. **A:** Representación gráfica de la amplificación en tiempo real usando la opción 1 de primers de Claudina 5; se puede ver que a medida que el cDNA inicial está más diluido, presenta un mayor Ct. **B:** Representación gráfica de la curva de melting generada en la prueba para medir eficiencia de la opción 1 de primers para Claudina 5.

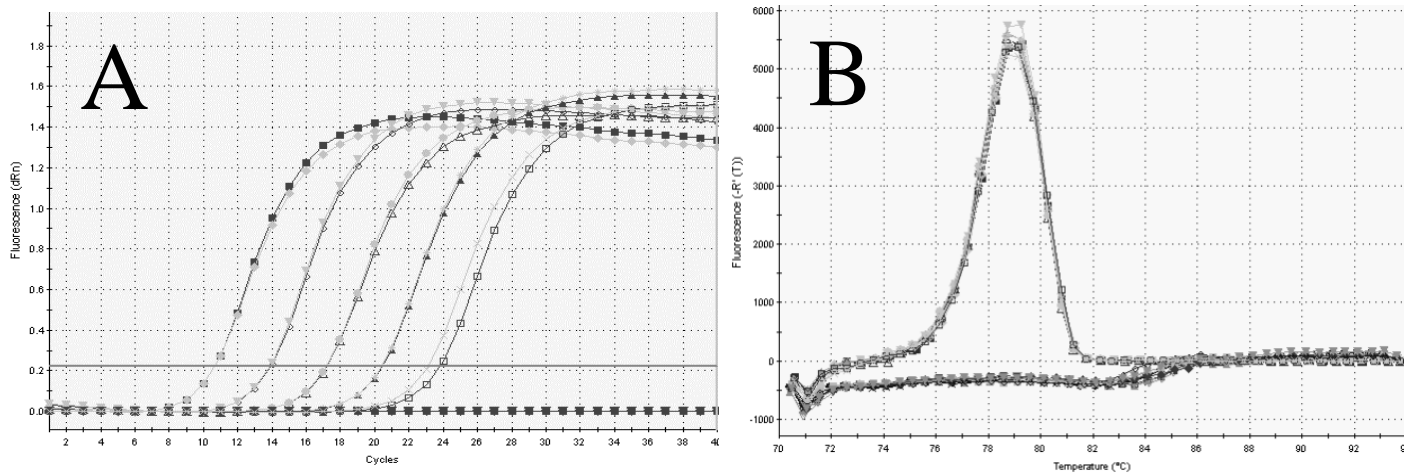


Figura 14: Gráficos eficiencia primers de Ocludina opción uno. **A:** Representación gráfica de la amplificación en tiempo real usando la opción 1 de primers de Ocludina; se puede ver que a medida que el cDNA inicial está más diluido, presenta un mayor Ct. **B:** Representación gráfica de la curva de melting generada en la prueba para medir eficiencia de la opción 1 de primers para Ocludina.

Luego de obtener las gráficas de eficiencia y sus Ct (ciclo de umbral), el cálculo de la eficiencia (tabla 3) se realizó con la siguiente fórmula:

$$Eff = 10^{-\left(\frac{1}{\text{promedio } \Delta Ct}\right)}$$

Donde: **Eff**: eficiencia; **promedio ΔCt** : promedio de las restas entre los ciclos de umbral de un punto de la curva de eficiencia con el ciclo umbral del punto 10 veces más diluido.

Tabla 3: Eficiencia de los primers de Claudina-5 y Ocludina.

DILUCIÓN	Ct		ΔCt		$\bar{x} \Delta Ct$		Eff		%Eff	
1/10 ⁴	11,39	10,69	-----	-----	-3,318	-3,189	2,00	2,05	100%	102,9%
1/10 ⁵	14,67	13,91	-3,285	-3,220						
1/10 ⁶	18,1	17,24	-3,425	-3,330						
1/10 ⁷	21,23	20,47	-3,135	-3,225						
1/10 ⁸	24,66	23,45	-3,425	-2,980						

En la tabla se expresa la eficiencia y el porcentaje de eficiencia de cada uno de los primers usados, donde las columnas grises representan a la opción 1 de primers para Claudina-5 y las columnas blancas representan a la opción 1 de primers para Ocludina, respectivamente. El Ct se representa como promedio de los valores obtenidos de 2 réplicas técnicas. El ΔCt se calculó restando el Ct de cada una de las diluciones, con el Ct de la dilución siguiente a esta (diluida 10 veces más). Abreviaciones: Ct: Ciclo de cuantificación; $\bar{x} \Delta Ct$: promedio de las diferencias de Ct o pendiente; Eff: eficiencia; %Eff: porcentaje de eficiencia. Elaboración propia.

DISCUSIÓN

Como ya se mencionó anteriormente en este documento, las proteínas de unión intercelular, específicamente las uniones de tipo Tight Junctions podrían tener un rol importante en la regulación del paso de leucocitos a través del endotelio vascular. Si bien, hay estudios que han relacionado estas proteínas con el proceso de migración transendotelial de leucocitos (37, 38), y por otro lado, hay artículos en los que evalúan la expresión de ZO-1, Ocludina y Claudina-5 mediante qPCR (39, 40), no se encontraron documentos científicos en los cuales se intentara dar una posible explicación paracrina a este proceso, y menos relacionando esto con la expresión génica de las TJ por medio de qPCR, por lo que se puede afirmar que la memoria realizada contribuiría a aumentar el conocimiento científico.

Con la intención de reproducir un microdominio endotelial, se desarrolló un modelo *in vitro* de interacción entre células endoteliales, monocitos y plaquetas, utilizando para eso una cámara de Boyden. El realizar cultivos celulares manteniendo dos líneas diferentes (HMEC-1 y THP-1), y adicionalmente, incluir células obtenidas *ex vivo* a este microambiente, complejiza el trabajo, debido a que las condiciones de cultivo para cada línea celular son distintas, desde los medios de cultivo requeridos, e incluso, el crecimiento característico que presentan (monocapa adherida al soporte de cultivo en caso de HMEC-1 y en suspensión en el caso de THP-1) es muy diferente. Además, el emplear cultivo celular, trae consigo inherentemente múltiples variables a tener en consideración, como los son: viabilidad y acoplamiento de las células al descongelar el stock celular, crecimiento celular lento o desigual, estado de los reactivos y medios de cultivo, entre otros (41). A pesar de esto, artículos científicos ya han planteado que células HMEC-1 son una alternativa confiable al utilizarlas como versión *in vitro* de endotelio, debido a que retiene características fenotípicas

como la expresión del factor de von Willebrand, la captación de LDL acetilada y expresa marcadores endoteliales y moléculas de adhesión (42), por lo que, a pesar de su complejidad a la hora de emplearlas en la formación de una monocapa confluyente en cámara de Boyden, indudablemente era una buena opción de trabajo. Por otro lado, la células THP-1 han sido utilizadas en distintos estudios como representación de monocitos (43), y si bien, su fenotipo no es totalmente idéntico al de un monocito obtenido *ex vivo*, se plantea a esta línea celular como herramienta valiosa para investigar la estructura y función de los monocitos en la salud y la enfermedad (44).

Evidentemente, un estudio de expresión génica por medio de qPCR, técnica la cual permite monitorear el progreso de una PCR a medida que se lleva a cabo, revoluciona completamente el mecanismo de la cuantificación del ADN, y en conjunto con retrotranscripción, del ARN. En este método, las reacciones se caracterizan por el ciclo de replicación en el cual se detecta por primera vez la amplificación de un target, en lugar de la cantidad acumulada de este después de un número fijo de ciclos, como lo es en la reacción de polimerasa en cadena convencional (45). Algunos de los parámetros más importantes a evaluar, son los ya desarrollados en esta investigación: diseño correcto de primers, medición de amplificación de producto único y determinación de la eficiencia de estos.

En cuanto al diseño de primers, se establece que deben ser confeccionados adecuadamente para lograr amplificar solamente el producto deseado (amplificación de producto único), sobre todo, si se utiliza SYBR Green I para la emisión de fluorescencia, ya que, este se unirá a cualquier doble hebra de DNA y no solo a la región deseada como es el caso de las sondas TaqMan. Evidentemente, el uso de sondas TaqMan aumenta la especificidad de la técnica, sin embargo, sus desventajas con respecto a SYBR green I son: principalmente su costo y la dificultad en el diseño de estas secuencias específicas (46). En los parámetros elegidos para el diseño de los primers utilizados primero se buscaron las secuencias de mRNA de cada proteína que se quiso evaluar la expresión génica (Ocludina, Claudina-5 y ZO-1), ingresando

a la base de datos de la página web “National Center for Biotechnology Information” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), esto debido a que es un *GenBank* que posee una base de datos ampliamente utilizada en el mundo científico y contiene más del 90% de la información total secuenciada de genes, RNA y proteínas. A partir de la secuencia FASTA del target deseado, se utilizó Primer-BLAST y Primer3, dos programas online para el diseño de primers. Algunas características usadas importantes de mencionar fueron las siguientes: T_m : se define como la temperatura a la cual el 50% de los primers están unidos a su secuencia target, y para determinar la temperatura de annealing, existen distintas teorías que establecen que puede ser obtenida al calcular promedio de las T_m del par de primers a utilizar, y luego disminuir ésta temperatura en 2-5°C, lo cual puede modificarse, ya que, si se quiere obtener una mayor especificidad, puede disminuirse menos la temperatura en la fase de annealing, evitando la unión de los primers a secuencias inespecíficas; longitud de primers: esta no debe exceder los 20-25 en conjunto con un %GC: 45-40, ya que, dependiendo de estas características, la T_m será mayor o menor, por lo que se necesitará una mayor temperatura para que los enlaces GC se desnaturen; el tamaño del producto: este debe ser idealmente entre 100-200pb, ya que dependiendo de la longitud de este, será el tiempo de elongación a emplear en la qPCR, pues, en el caso de Taq polimerasa, tiene una velocidad de 1000 bases/minuto. Al ver los resultados (tabla 1), los primers diseñados cumplen con los requisitos de diseño.

Posteriormente, todos los pares de primers obtenidos fueron analizados en las distintas opciones de OligoAnalyzer (Integrated DNA technologies: IDT; <https://www.idtdna.com/pages>), evaluando las estructuras secundarias (como horquillas o “loops”) que podría formar cada primer consigo mismo, la formación de homodímeros de cada secuencia y la formación de heterodímeros con su primer pareja, eligiendo así los pares de primers que presentaran menor posibilidad de formar estas estructuras, esto se evaluó observando los ΔG de cada uno, debido a que si el valor de este es negativo y de gran magnitud, al ser una reacción exérgica y espontánea, hay mayor probabilidad de formación de estas estructuras. Idealmente, se debieron elegir los que tuviesen un ΔG positivo o igual a cero, sin embargo, ninguno presentó estas características y se optó por seleccionar a los primers que presentaran un ΔG negativo, pero con el menor valor absoluto encontrado.

Finalmente se analizó la especificidad de unión de cada primer (unión única) en la base de datos de “NCBI/PrimerBLAST” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), asegurándose de la especificidad de los cebadores, para lo cual, todos los pares de primers diseñados presentaron una unión única a la secuencia target.

Cabe destacar que muchas de las características o parámetros evaluados por un sistema informático online, no son representativas experimentalmente, debido a que solo está basado en probabilidades y complementariedad. Estudios anteriores han reportado inconsistencias entre las T_m teóricas calculadas por estos softwares con respecto a las T_m empíricas en la realización de ensayos científicos.

En cuanto a los resultados de producto único, se logra ver que la mayoría de los primers diseñados presentaron correctamente la amplificación de solo un producto (Claudina-5 opción 1 y 2, y Ocludina opción 1 y 2) (figura 11 y 12), lo que indica que su confección fue exitosa respecto a la especificidad, sin embargo, ambos partidores para ZO-1 presentaron 2 peaks de fluorescencia en su curva de melting (figura 9), lo que indica que no está amplificando solo un producto. Al hacer una electroforesis del producto obtenido en la qPCR (figura 10) se observan 2 bandas distintas por pocillo, una de las cuales, concuerda con el tamaño del producto esperado de la amplificación, mientras que la otra presenta un tamaño mayor, lo que indica que efectivamente se amplificaron 2 secuencias distintas. Esto podría estar explicado por una contaminación en la reacción a partir de un DNA exógeno suspendido en forma de aerosol (47). No obstante, otra potencial causa, es la posible existencia de un splicing alternativo para este mRNA, sin embargo, se realizó un estudio para determinar la complementariedad de los primers con respecto a los splicings alternativos de este mRNA, y el resultado fue negativo. Por último, si bien NCBI tiene más del 90% de la información publicada como GenBank, el genoma humano aún sigue siendo altamente desconocido y existen muchas secuencias genéticas que aún no son informadas, por lo que podría existir un target desconocido para el cual el primer presenta complementariedad.

En cuanto a la eficiencia de los primers, es decir, la proporción del número de moléculas del gen diana al final de un ciclo de la PCR dividida por la cantidad de moléculas diana al comienzo del mismo ciclo de la PCR, es un paso fundamental para poder realizar una cuantificación de la expresión genética, ya que, dependiendo de esta, pueden variar las características de amplificación de la qPCR, lo que impediría una comparación real entre la expresión de los genes. La eficiencia de los primers debe ser calculada en la fase exponencial de la amplificación, ya que, es ahí donde los reactivos y sustratos de reacción se encuentran en concentraciones suficientemente altas para llevar a cabo una replicación de tipo similar a la teórica, que sería de forma exponencial con un 2 como base y el número de ciclos como exponente. Se plantea que una eficiencia entre un 90% a un 110% es la aceptable (48). En los resultados obtenidos (tabla 3), Claudina 5 tuvo un 100% de eficiencia y Ocludina 102,9% de eficiencia, por lo que son aceptables.

Debido a la habilidad y destreza que debe adquirirse para la formación de una monocapa de células endoteliales que sigan cumpliendo su rol fisiológico de barrera sobre una base de polietileno con poros, y al tiempo necesario para poder realizar la exposición de las células HMEC-1 a los medios condicionado, en conjunto con el proceso de cuantificación y medición de la expresión génica de las proteínas en estudio, es que el periodo para realizar a cabalidad todas estos ensayos fue insuficiente, por lo que se decidió no hacer esta parte del diseño experimental en esta oportunidad, llegando solamente hasta la etapa de evaluación de los primers confeccionados y la obtención de los medios condicionados A, B y C.

No obstante de lo afirmado en el párrafo anterior, para haber realizado la determinación de la expresión génica de las proteínas estudiadas en esta investigación, luego de medir la eficiencia de los primers, lo que debió realizarse es una cuantificación relativa de los cambios

en la expresión génica de las proteínas diana en las células expuestas a los distintos medios condicionados, con respecto a la muestra de referencia, es decir, las células expuestas al medio control. Para esto, se debe utilizar el método de Ct comparativo, ya que existen ventajas de este método, en comparación a la utilización de la cuantificación absoluta, puesto que, a diferencia de este último, no es necesario hacer una curva de calibración, eliminando el efecto adverso que pudiese ocurrir en cualquier error de dilución al preparar esta. Por otro lado, lo que se pretende en este ensayo es comparar la expresión de ciertos genes con respecto a células control, por lo que el método del Ct comparativo es útil para ello (49).

Primero, lo que debe hacerse es validar un gen *housekeeping* o normalizador (GAPDH, ARN ribosomal, actina, entre otros), para ello es necesaria la obtención de una muestra de cDNA de 25-100 ng como templado y realizar una prueba de amplificación con primers diseñados para ese gen (realizar en triplicado y con un blanco), posteriormente, los Ct obtenidos no deben presentar una dispersión elevada, y además, en la curva de melting debe existir solo un producto amplificado, esto indica que es un buen gen normalizador. Subsiguientemente, hay que evaluar la eficiencia de los primers utilizados para amplificar el gen normalizador, y realizar una comparación de esta con la eficiencia de los primers para los genes de interés, las cuales deben ser aproximadamente iguales. Luego de eso, hay que realizar qPCR a los 4 grupos de células (control, con medio A, B y C) por triplicado, tanto para la expresión de los genes diana a estudiar (en este caso solo Claudina-5 y Ocludina) como para los genes *housekeeping*, de lo cual se obtendrán los Ct de cada uno (3 Ct de los genes de interés por cada grupo de células y 3 Ct de los *housekeeping* por cada grupo de células). A partir de esos resultados, se eliminan los Ct aberrantes o muy alejados del promedio, para cada grupo celular, y se calcula el promedio con desviación estándar de los Ct dejados; en esta etapa, se debería tener un Ct promedio para el gen de interés y un Ct promedio para el *housekeeping*, en cada grupo celular. Posterior a eso, se resta el promedio del Ct del gen de interés con el promedio del Ct del gen normalizado, obteniendo un ΔCt para cada grupo celular (4 ΔCt distintos). Finalmente, se compara el ΔCt de las células control, con el ΔCt de cada uno de los otros grupos celulares (ΔCt exp), con la siguiente fórmula planteada por Pfaffl (50):

$$expR = \frac{(E_{GOI}) (C_{pGOICtl} - C_{pGOIExp})}{(E_{Ref}) (C_{pRefCtl} - C_{pRefExp})}$$

Donde:

expR: expresión relativa del gen.

E_{GOI}: Eficiencia para el gen de interés.

E_{Ref}: Eficiencia para el gen de referencia.

C_{pGOICtl}: Ciclo umbral para el gen de interés en la condición control.

C_{pGOIExp}: Ciclo umbral para el gen de interés en la condición de exposición.

C_{pRefCtl}: Ciclo umbral para el gen de referencia en la condición control.

C_{pRefExp}: Ciclo umbral para el gen de referencia en la condición de exposición.

Los valores obtenidos se analizan mediante un test ANOVA, comparando los grupos. El resultado representa el número de veces que se modificó la expresión del gen en las células sometidas a los medios condicionados con respecto a las condiciones en células sin exposición a los medios condicionados.

En un futuro, lo ideal sería poder llevar a cabo este ensayo y comparar los resultados con los estudios de permeabilidad obtenidos cuando se realizó este modelo de microdominio endotelial en el Laboratorio de Medicina Molecular, Centro de Investigaciones Médicas, escuela de Medicina, Universidad de Talca, ya que, la mayor permeabilidad se obtuvo a las 4 horas, mismo tiempo de exposición a los medios condicionados planteados en este documento.

CONCLUSIÓN

Con relación a los objetivos de esta investigación, se puede concluir que la confección de primers para realizar qPCR, a pesar de ser un proceso complejo, se logró llevar a cabo de una correcta manera. Por otro lado, del estudio de la amplificación de producto único y eficiencia, se puede concluir que 4 de los 6 pares de primers confeccionados presentaron una amplificación única, y los 2 pares de primers a los que se les midió su eficiencia, presentaron un resultado aceptable, lo cual permite afirmar que estos son útiles para determinar la expresión de Claudina-5 y Ocludina en futuros ensayos.

Respecto al objetivo de la medición de la expresión génica de las proteínas diana en esta memoria, no pudo llevarse a cabo, sin embargo, esto fue debido al tiempo insuficiente para llevar a cabo el modelo científico en su totalidad.

En cuanto a la hipótesis, no fue posible responderla, sin embargo, es necesario realizar estudios posteriores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Iazzo P. Handbook of cardiac anatomy, physiology, and devices. 2° ed. USA: Springer; 2009. [Citado el 27/10/2018]. Disponible en <http://www.revespcardiol.org/es/disfuncion-endotelial/articulo/13087918/>
2. Pappano A, Wier W. Cardiovascular physiology. 10° ed. USA, Philadelphia: ELSEVIER; 2013. [Citado el 27/10/2018]. Disponible en https://books.google.cl/books?id=4Lg4jDhghIYC&printsec=frontcover&hl=es&source=gb_s_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
3. Gal B, López M, Martín A, Prieto J. Bases de la fisiología. 2° ed. España: Tébar, S. L.; 2007. p. 626. [Citado el 28/10/2018]. Disponible en <https://books.google.cl/books?id=GpNkL8SiYW8C>
4. MedlinePlus. Corte transversal de una arteria 2019 [cited 2019. 01/05]. Available from: https://medlineplus.gov/spanish/ency/esp_imagepages/19194.htm.
5. Favero G, Paganelli C, Buffoli B, Rodella LF, Rezzani R. Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: life style intervention. Biomed Res Int. 2014;2014:801896. [Citado el 27/10/2018]. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24719887>
6. Carvajal C. El endotelio: estructura, función y disfunción endotelial. Medicina legal de Costa Rica. 2017;34:90-100. [Citado el 27/10/2018]. Disponible en http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152017000200090
7. McCarron JG, Wilson C, Heathcote HR, Zhang X, Buckley C, Lee MD. Heterogeneity and emergent behaviour in the vascular endothelium. Current Opinion in Pharmacology. 2019;45:23-32. [Citado el 27/10/2018]. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471489218301541>
8. Verdejo París J. Función endotelial. Archivos de cardiología de México. 2006;76:164-9. [Citado el 27/10/2018]. Disponible en

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S140599402006000600022&nrm=iso

9. Muniyappa R, Sowers JR. Role of insulin resistance in endothelial dysfunction. *Rev Endocr Metab Disord.* 2013;14(1):5-12. [Citado el 29/10/2018]. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23306778>
10. Barac A, Campia U, Panza Julio A. Methods for Evaluating Endothelial Function in Humans. *Hypertension.* 2007;49(4):748-60. [Citado el 29/10/2018]. Disponible en <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000259601.38807.a6>
11. Bandimon L, Martínez-González J. Disfunción endotelial. 2006. [Citado el 29/10/2018]. Disponible en <http://www.revespcardiol.org/es/disfuncionendotelial/articulo/13087918/>
12. León Regal M, Alvarado Borges A, de Armas García J, Miranda Alvarado L, Varens Cedeño J, Cuesta del Sol J. Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares: cifras alarmantes. *Revista Finlay.* 2015;5:47-62. [Citado el 29/10/2018]. Disponible en http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S222124342015000100006&nrm=iso
13. Bordés R, Martínez M, García E, Guisado R. El proceso inflamatorio. 2015. [Citado el 29/10/2018]. Disponible en <https://previa.uclm.es/ab/enfermeria/revista/numero%204/pinflamatorio4.htm>
14. Barreiro O, Sánchez-Madrid F. Bases moleculares de las interacciones leucocitoendotelio durante la respuesta inflamatoria. [Citado el 29/10/2018]. Disponible en <http://www.revespcardiol.org/es/bases-moleculares-las-interacciones-leucocitoendotelio/articulo/13136000/>
15. Schnoor M. Endothelial actin-binding proteins and actin dynamics in leukocyte transendothelial migration. *J Immunol.* 2015;194(8):3535-41. [Citado el 06/06/2019]. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25848070>
16. van Gils JM, Zwaginga JJ, Hordijk PL. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J*

- Leukoc Biol. 2009;85(2):195-204. [Citado el 06/06/2019]. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18948548>
17. Carman CV, Sage PT, Sciuto TE, de la Fuente MA, Geha RS, Ochs HD, et al. Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity*. 2007;26(6):784-97. [Citado el 15/12/2018]. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17570692>
18. Komarova YA, Kruse K, Mehta D, Malik AB. Protein Interactions at Endothelial Junctions and Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. *Circ Res*. 2017;120(1):179-206. [Citado el 01/01/2019]. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28057793>
19. Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev*. 2004;84(3):869-901. [Citado el 01/05/2019]. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15269339>
20. Wallez Y, Huber P. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2008;1778(3):794-809. [Citado el 01/05/2019]. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000527360700346X>
21. Ikeda W, Nakanishi H, Miyoshi J, Mandai K, Ishizaki H, Tanaka M, et al. Afadin: A key molecule essential for structural organization of cell-cell junctions of polarized epithelia during embryogenesis. *J Cell Biol*. 1999;146(5):1117-32. [Citado el 10/06/2019]. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15269339>
22. Campbell HK, Maiers JL, DeMali KA. Interplay between tight junctions & adherens junctions. *Exp Cell Res*. 2017;358(1):39-44. [Citado el 01/05/2019]. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28372972>
23. Yonemura S. Actin filament association at adherens junctions. *The Journal of Medical Investigation*. 2017;64(1.2):14-9. [Citado el 01/05/2019]. Disponible en https://www.jstage.jst.go.jp/article/jmi/64/1.2/64_14/article
24. Gavard J. Endothelial permeability and VE-cadherin: a wacky comradeship. *Cell Adh Migr*. 2014;8(2):158-64. [Citado el 01/05/2019]. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25422846>
25. Prandini MH, Dreher I, Bouillot S, Benkerri S, Moll T, Huber P. The human VEcadherin promoter is subjected to organ-specific regulation and is activated in tumour angiogenesis. *Oncogene*. 2005

26. Taddei A, Giampietro C, Conti A, Orsenigo F, Breviaro F, Pirazzoli V, et al. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat Cell Biol.* 2008;10(8):923-34. [Citado el 01/05/2019]. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18604199>
27. Seong E, Yuan L, Arikath J. Cadherins and catenins in dendrite and synapse morphogenesis. *Cell Adh Migr.* 2015;9(3):202-13. [Citado el 02/05/2019]. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25914083>
28. Heuberger J, Birchmeier W. Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(2):a002915. [Citado el 02/05/2019]. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20182623>
29. Maiden SL, Hardin J. The secret life of α -catenin: moonlighting in morphogenesis. *J Cell Biol.* 2011;195(4):543-52. [Citado el 02/05/2019]. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22084304>
30. Nielsen MS, Axelsen LN, Sorgen PL, Verma V, Delmar M, Holstein-Rathlou NH. Gap junctions. *Compr Physiol.* 2012;2(3):1981-2035. [Citado el 02/05/2019]. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23723031>
31. Leybaert L, Lampe PD, Dhein S, Kwak BR, Ferdinandy P, Beyer EC, et al. Connexins in Cardiovascular and Neurovascular Health and Disease: Pharmacological Implications. *Pharmacol Rev.* 2017;69(4):396-478. [Citado el 02/05/2019]. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28931622>
32. Begandt D, Good ME, Keller AS, DeLalio LJ, Rowley C, Isakson BE, et al. Pannexin channel and connexin hemichannel expression in vascular function and inflammation. *BMC Cell Biol.* 2017;18(Suppl 1):2. [Citado el 03/05/2019]. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28124621>
33. Cummins PM. Occludin: one protein, many forms. *Mol Cell Biol.* 2012;32(2):24250. [Citado el 03/05/2019]. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22083955>
34. Veliz M, Moore R. Rol paracrino de monocitos/macrófagos en la migración transendotelial de plaquetas. [Tesis de magíster]. Talca, Chile: Universidad de Talca; 2018.

35. Merhi Y, Guidoin R, Provost P, Leung TK, Lam JY. Increase of neutrophil adhesion and vasoconstriction with platelet deposition after deep arterial injury by angioplasty. *Am Heart J.* 1995;129(3):445-51. [Citado el 03/05/2019]. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7872169>
36. Fiuza C, Salcedo M, Clemente G, Tellado JM. Granulocyte colony-stimulating factor improves deficient in vitro neutrophil transendothelial migration in patients with advanced liver disease. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(2):433-9. [Citado el 03/05/2019]. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11874890>
37. Burns AR, Bowden RA, MacDonell SD, Walker DC, Odebunmi TO, Donnachie EM, et al. Analysis of tight junctions during neutrophil transendothelial migration. *J Cell Sci.* 2000;113 (Pt 1):45-57.
38. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Engelhardt B, editors. *Involvement of Tight Junctions During Transendothelial Migration of Mononuclear Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis* 2004; Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
39. Steelant B, Farré R, Wawrzyniak P, Belmans J, Dekimpe E, Vanheel H, et al. Impaired barrier function in patients with house dust mite-induced allergic rhinitis is accompanied by decreased occludin and zonula occludens-1 expression. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(4):1043-53.e5.
40. Liu W, Mi S, Ruan Z, Li J, Shu X, Yao K, et al. Dietary Tryptophan Enhanced the Expression of Tight Junction Protein ZO-1 in Intestine. *J Food Sci.* 2017;82(2):562-7.
41. Sigma-Aldrich. Problemas comunes en el cultivo celular: crecimiento celular deficiente 2019 [citado el 2019 02/07]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/cell-culture/poor-cell-growth.html>.
42. Muñoz-Vega M, Massó F, Páez A, Carreón-Torres E, Cabrera-Fuentes HA, Fragoso JM, et al. Characterization of immortalized human dermal microvascular endothelial cells (HMEC-1) for the study of HDL functionality. *Lipids Health Dis.* 2018;17(1):44.
43. Hu ZD, Wei TT, Tang QQ, Ma N, Wang LL, Qin BD, et al. Gene expression profile of THP-1 cells treated with heat-killed *Candida albicans*. *Ann Transl Med.* 2016;4(9):170.
44. Bosshart H, Heinzelmann M. THP-1 cells as a model for human monocytes. *Ann Transl Med.* 2016;4(21):438.

45. ThermoFisher. Elementos esenciales de la PCR en tiempo real 2019 [citado 2019 02/07]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/cl/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html>.
46. ThermoFisher. Química de TaqMan vs. SYBR para RT-PCR 2019 [citado el 2019 02/07]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/cl/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/taqman-vs-sybr-chemistry-real-time-pcr.html>.
47. ThermoFisher. Buenas prácticas de laboratorio para evitar la contaminación en sus experimentos de qPCR 2019 [citado 2019 03/07]. Disponible en <https://www.thermofisher.com/cl/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/good-laboratory-practice-avoid-contamination-qpcr-experiments.html>.
48. ThermoFisher. Eficiencia de PCR en tiempo real 2019 [citado 2019 02/07]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/cl/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/efficiency-real-time-pcr-qpcr.html>.
49. ThermoFisher. Cuantificación absoluta vs. relativa para qPCR 2019 [citado 2019 03/07]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/cl/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/absolute-vs-relative-quantification-real-time-pcr.html>.
50. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 2001;29(9):e45-e.