

Estudio de la expresión del receptor LAIR-1 en macrófagos humanos. Posible implicación en el desarrollo de cirrosis hepática

María Dolores Fernández-Fernández, Ana Tapia-Abellán, Juan Francisco Rodríguez-Alcázar, Antonio José Ruíz-Alcaraz, Pilar García-Peñarrubia* y María Martínez-Esparza*

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100, Murcia.

* correspondencia: pigarcia@um.es, maria@um.es

Resumen

El primer objetivo de este trabajo fue el estudio bibliográfico del gen *LAIR-1*, que codifica un receptor inhibitorio descrito en fagocitos. Para ello se revisó la bibliografía publicada en revistas de investigación científica, así como las secuencias depositadas en las principales bases de datos biológicos disponibles en la red hasta el momento. Los resultados encontrados revelaron que la información depositada en las bases de datos por los diferentes autores era redundante y presentaba una nomenclatura diferente. Tras estudios de alineamiento con diferentes herramientas informáticas, pudimos establecer las equivalencias entre los datos publicados. De las 4 isoformas descritas, generadas por maduración alternativa del ARN, sólo LAIR-1a y LAIR-1b coincidieron completamente en las bases de datos consultadas.

El siguiente objetivo fue el estudio de la expresión del gen *LAIR-1* mediante qRT-PCR en macrófagos peritoneales obtenidos del líquido ascítico de pacientes con cirrosis hepática, y su comparación con los obtenidos para macrófagos de sangre periférica de donantes sanos, como población de referencia. Esta patología se asocia a un incremento de mediadores inflamatorios y podría estar relacionada con la desregulación de algunos de los mecanismos de control del sistema inmunitario. La qRT-PCR realizada con los cebadores diseñados para estudiar las isoformas LAIR-1a y -1b, reveló que éstas se expresan en ambas poblaciones de macrófagos. Además, los resultados mostraron que los niveles de expresión para los transcritos que codifican ambas isoformas son menores en la población de macrófagos de pacientes con cirrosis, en comparación con los macrófagos de donantes sanos. Se encontraron además diferencias significativas entre ambas poblaciones de macrófagos en la capacidad de respuesta a estímulos activadores como LPS y *C. albicans*. Estos resultados podrían contribuir a identificar nuevas dianas terapéuticas o diagnósticas para prevenir el daño hepático.

Abstract

Our first goal in this work was the bibliographic study of the gene *LAIR-1*, which encodes an inhibitory receptor described on phagocytes. To do this, we reviewed the current bibliography from several scientific journals, as well as the sequences that so far now we can find in the main biological databases on the internet. Our results showed that the information available in the different databases was redundant and a different nomenclature was used for unique sequences. Using alignment studies with different bioinformatic tools, we established equivalences between the published data. Taking into account the 4 isoforms described, generated by alternative splicing of the RNA, only LAIR-1a and LAIR-1b matched in the databases reviewed.

Our next objective was to study the expression profile of the gene *LAIR-1*, using qRT-PCR, on peritoneal macrophages obtained from ascitic fluid from patients with hepatic cirrhosis, and compared it with the expression on peripheral blood macrophages from healthy donors, which we used as a referential population. This pathology is related to an increase of inflammatory mediators that could be produced by a dysregulation of some control mechanisms involved in immune response. qRT-PCR performance using specific primers designed for LAIR-1a and -1b, showed that these isoforms were expressed on both macrophage populations. Results also showed significant differences between both macrophage populations in responsiveness to LPS and *C. albicans* activators. These results may help to identify new prognostic or therapeutic targets to prevent hepatic damage.

Palabras clave: receptores inhibitorios, qRT-PCR, líquido ascítico

Introducción

La cirrosis hepática es una patología asociada al incremento de mediadores inflamatorios, tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina 6 (IL-6) y la IL-8 (Dasarathy 2008). La inflamación hepática crónica y la fibrosis son las características claves asociadas con la acumulación de macrófagos en el hígado (Ramachandran & Iredale 2012). Estas células pueden ser la causa de muchos de los eventos fisiopatológicos asociados con la cirrosis (Heymann et al. 2009), por lo que son buenos candidatos para ser las dianas actuales en la terapia anti-inflamatoria destinada a evitar la progresión del daño hepático.

Los macrófagos o fagocitos mononucleares son células del sistema inmunitario que residen en el tejido y proceden de la maduración continua de los monocitos circulantes, los cuales abandonan la circulación y migran al interior de los tejidos. Estas células inmunitarias tienen la capacidad de reconocer, fagocitar y eliminar los microorganismos invasores que atraviesan la barrera epitelial, teniendo así un papel crucial en la defensa del huésped. Los macrófagos producen especies reactivas de oxígeno (ROS), citocinas inflamatorias y quimiocinas, provocando la muerte del microorganismo invasor y el reclutamiento y activación de células inmunitarias. Sin embargo, estos mediadores inflamatorios son potencialmente dañinos para el huésped y su producción debe estar controlada por diversos mecanismos reguladores. Las enfermedades que se caracterizan por una inflamación persistente, como la aterosclerosis o la cirrosis hepática (Tapia-Abellán et al. 2012), son un claro ejemplo de la importancia que tiene la regulación de la síntesis de mediadores inflamatorios.

Uno de los mecanismos de regulación de la respuesta inmunitaria es la supresión de la misma por receptores inhibidores, los cuales han sido establecidos como potentes reguladores negativos de la respuesta inmunitaria. Los receptores inhibidores se caracterizan por poseer en sus dominios intracitoplasmáticos la secuencia consenso V/L/I/SxYxxV/L, denominada motivo ITIM (*Motivo Inhibitorio de Inmunoreceptores basado en Tirosina*) (Vivier & Daeron 1997). En general, los receptores inhibidores requieren la interacción con un ligando antes de llevar a cabo su función inhibidora. A través de la unión al ligando, los motivos ITIM del dominio intracitoplasmático son fosforilados por tirosina quinasas de la familia Src, las cuales también fosforilan y activan proteínas fosfatasa con dominio SH2 (SHP-1, SHP-2 o SHIP). Estas fosfatasas son reclutadas por los motivos ITIM, uniéndose a las tirosinas fosforiladas de dichos motivos. El reclutamiento de las proteínas SHP-1, SHP-2 o SHIP provoca la inhibición de la activación celular a través de la desfosforilación de las cascadas de señalización positiva (Long 2008). No obstante, el reclutamiento de las fosfatasas por los receptores inhibidores no es siempre un prerrequisito para mediar la inhibición celular (Verbrugge et al. 2006).

Incluido dentro del grupo de receptores inhibidores, se encuentra LAIR-1 (*Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1* o *CD305*). El gen que codifica la proteína LAIR-1, está incluido dentro de la superfamilia de las inmunoglobulinas y de la familia de receptores inhibidores asociados a leucocitos. La expresión del gen ha sido estudiada y establecida en casi todas las células humanas del sistema inmunitario, incluyendo linfocitos T y B, células NK, monocitos, eosinófilos y células dendríticas. Dentro del grupo de las células fagocíticas humanas, ha sido determinada la expresión de la proteína LAIR-1 en monocitos y neutrófilos de médula ósea, no habiéndose determinado la expresión en macrófagos humanos (Meyaard 2008, Steevels & Meyaard 2011).

Tradicionalmente, la investigación se ha centrado en el estudio de los receptores inhibidores en células NK, linfocitos B y linfocitos T, mientras que los estudios de investigación acerca de la expresión de estos receptores en células fagocíticas tales como neutrófilos, monocitos y macrófagos son escasos.

Por todo ello, este trabajo se centra en el estudio de la expresión del receptor inhibidor LAIR-1 en macrófagos, y en el análisis de la posible implicación de este receptor en el desarrollo de cirrosis hepática, patología asociada a un incremento de mediadores inflamatorios (Ruiz-Alcaraz et al. 2011) que podría estar relacionada con la desregulación de alguno de sus mecanismos de control.

Material y métodos

Bases de datos y herramientas bioinformáticas

Para la realización de este trabajo se han empleado las siguientes bases de datos y herramientas bioinformáticas: PubMed (NCBI), GenBank (NCBI), Ensemble (EMBL-EBI), GenPept (NCBI), UniProtKB (EBI), BLASTnucleotide y BLASTprotein (NCBI), Primer-BLAST (NCBI), Oligocalc y PerlPrimer.

Pacientes

Los pacientes admitidos en el estudio proceden de la Unidad de Trasplante Hepático del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia (España). La cirrosis fue diagnosticada por hallazgos histológicos, clínicos, de laboratorio y/o ultrasonográficos. Estos pacientes presentan cirrosis hepática descompensada. El protocolo de estudio fue aprobado por los comités éticos pertinentes y todos los pacientes dieron informe consentido para ser incluidos en el estudio.

Obtención de macrófagos derivados de monocitos (M-DM) peritoneales de líquido ascítico

El líquido ascítico (LA) se obtuvo en condiciones asépticas mediante paracentesis evacuadora siempre y cuando estuviera clínicamente indicado y en ningún caso para obtener muestras de estudio (Runyon 1986). El contenido celular del mismo se obtuvo mediante centrifugación del LA a 1500 rpm durante 10 min en botes de capacidad de 600 ml cada uno.

Las células obtenidas del LA fueron lavadas en tampón fosfato salino (PBS) y resuspendidas en DMEM +glutaMAX (GIBCO Invitrogen, Paisley, UK), suplementado con un 10% de suero de ternera fetal (STF) previamente descomplementado por calentamiento a 56° C durante 30 minutos y con 50 U/ml de penicilina y 50 g/ml de estreptomina. Este medio será denominado posteriormente como MCC.

Se realizó conteo celular y previamente al cultivo de la muestra, se determinó la proporción de los macrófagos en ascitis mediante criterios de tamaño, morfología y expresión de marcadores de superficie específicos por citometría de flujo. Una vez conocido el porcentaje de macrófagos peritoneales presentes en la muestra, éstos fueron sembrados a una concentración de $1-2 \times 10^6$ M-DM/pocillo en placas de 6 pocillos. Tras incubación durante la noche a 37°C, las células fueron lavadas con MCC para eliminar aquellas células no adherentes, quedándonos así sólo con la fracción de macrófagos que han quedado adheridos al fondo del pocillo. La pureza de M-DM en los cultivos celulares fue mayor al 95%.

Obtención de macrófagos derivados de monocitos (M-DM) de sangre periférica

Los macrófagos procedentes de sangre periférica de donantes sanos se usaron como patrón de referencia con el que comparar los resultados obtenidos en macrófagos de líquido ascítico. Las muestras de sangre de voluntarios sanos se obtuvieron del Centro de Hemodonación de la Región de Murcia. Estas muestras fueron donadas previo descarte por el Centro al no alcanzar el peso óptimo necesario para su uso, y su extracción no se realizó en ningún caso para obtener muestras de estudio.

La sangre obtenida fue diluida con PBS estéril, en proporción 1:1 y se depositaron 35 ml de la mezcla sobre 15 ml de Ficoll (Axis-Shield PoC As Oslo, Norway) en tubos Falcon para llevar a cabo la separación de la porción linfo-monocítica. Ésta se realizó mediante centrifugación a temperatura ambiente a 2000 rpm durante 20 minutos sin freno, y posteriormente se lavaron y contaron las células obtenidas. Se empleó una alícuota de esta suspensión celular para determinar la pureza de los macrófagos de la muestra por citometría de flujo mediante criterios de tamaño, morfología y expresión de marcadores de superficie celular de monocitos, al igual que en el apartado anterior. Una vez conocido el porcentaje de macrófagos presentes en la muestra, las células fueron sembradas a una concentración $1-2 \times 10^6$ M-DM/pocillo en placa de 6 pocillos para obtención de ARN. Tras incubación durante 24h, las células fueron lavadas con MCC como en el apartado anterior.

Estimulación de M-DM

Para la obtención de ARN se sembraron $1-2 \times 10^6$ M-DM en placa de 6 pocillos que fueron estimulados en presencia o ausencia de LPS a concentración $0.1 \mu\text{g/ml}$ o *Candida albicans* a ratio 1:5 macrófago:levadura durante un periodo de tiempo de 24 horas con el objetivo de estudiar la regulación de la expresión del gen *LAIR-1* en respuesta a estos estímulos.

Medida de la expresión génica de LAIR-1a y LAIR-1b

El ARN total de macrófagos fue extraído usando el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) según las instrucciones del fabricante. El ADN complementario (ADNc) fue sintetizado a partir de $10 \mu\text{L}$ de ARN total usando el kit "Superscript II Reverse Transcriptase" (Invitrogen Co, Camarillo, CA, USA). La qPCR se llevó a cabo en un termociclador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) usando SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems) y parejas de cebadores específicos (Tabla 1).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 10 min 95°C , 40 ciclos de 15 seg a 95°C y 60°C durante 1 min. La reacción se realizó en un volumen final de $20 \mu\text{l}$. La especificidad de los cebadores se comprobó por análisis de las curvas de disociación. Los datos se recogieron y analizaron usando el software 7500 System SDS 1.4 (Applied Biosystems). Cada muestra se analizó por triplicado para después calcular la media de los Ct obtenidos y hacer el cálculo de la expresión génica normalizada con el control endógeno GAPDH y relativizada a la muestra calibradora mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Livak & Schmittgen 2001). Los productos de qPCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se visualizaron tras tinción con bromuro de etidio en un transiluminador de luz ultravioleta.

Tabla 1. Descripción de los cebadores utilizados para la amplificación de LAIR-1a y LAIR-1b por qRT-PCR.

Nombre	Secuencia (5'3')	Tamaño del amplicón (pb)	Número de acceso
LAIR-Fa (<i>forward</i>) LAIR-R (<i>reverse</i>)	TGCTGGTGAAAGAAACCTCT AATATACAGATGCTCAGCTTT	104	NM_002287
LAIR-Fb (<i>forward</i>) LAIR-R (<i>reverse</i>)	TGCTGGTGAAAGGACCCAC AATATACAGATGCTCAGCTTT	54	NM_021706
GAPDH-F (<i>forward</i>) GAPDH-R (<i>reverse</i>)	CATGTTCCAATATGATTCCACC CCTGGAAGATGGTATGG	100	NM_002046

Análisis estadístico

Para la representación gráfica de los resultados y el tratamiento estadístico de los datos, se empleó el programa GraphPad Prism versión 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

Los resultados se representaron mediante diagramas cajas donde la parte superior e inferior de la caja se corresponde con el percentil 25 y 75 respectivamente y la banda dentro de la caja se corresponde con el percentil 50, es decir, la mediana. Las líneas verticales que sobresalen de la caja, denominadas bigotes, se extienden respectivamente hasta el valor mínimo y máximo del conjunto de datos, siempre que estos valores no difieran en más de una vez y media del rango intercuartílico. Los datos atípicos se mostraron como círculos fuera de las cajas.

Para determinar la existencia de diferencias significativas se aplicaron los test estadísticos: U de Mann-Whitney, cuando se compararon los niveles de expresión basal de la molécula en ambas poblaciones de macrófagos, y el test de la t de student cuando se compararon los niveles de expresión de la molécula en respuesta a la activación respecto a su basal. Los valores de probabilidad (P) por debajo de 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

Información general del gen LAIR-1 y de los transcritos alternativos

LAIR-1 es un receptor inhibidor de la función inmunitaria codificado en humanos por el gen que recibe el mismo nombre. *LAIR-1* se localiza en el Complejo de Receptores Leucocitarios (LRC) en el cromosoma humano 19q13.4. El LRC comprende un número de diversos genes y grupos de genes que codifican receptores inhibidores pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF), incluyendo LILRs (*leukocyte Ig-like receptors*), KIRs (*killer Ig-like receptors*), FcαR (*Fc-alpha-receptors*) y LAIRs (*leukocyte-associated Ig-like receptors*). Es de destacar que LAIR-1 es estructuralmente similar a estos receptores (Meyaard et al. 1997), lo que sugiere que estas moléculas evolucionaron de un gen ancestral común (Barten et al. 2001; Martin et al. 2002).

El gen *LAIR-1* contiene 10 exones. La secuencia completa ha sido depositada en la base de datos GenBank bajo el código NC_000019, que se corresponde con la secuencia genómica depositada en la base de datos Ensembl bajo el código ENSG00000167613. LAIR-1 muestra una homología considerable a LAIR-2 (CD306). El gen *LAIR-2* codifica a una proteína 84% homóloga a LAIR-1 que carece de dominio transmembrana e intracelular, lo que sugiere que es una proteína secretada (Meyaard et al. 1997; Meyaard et al. 1999). Los genes *LAIR-1* y *LAIR-2* se sitúan próximos en el LCR y son transcritos en direcciones opuestas, lo que sugiere que un *locus* surgió a partir de otro por duplicación inversa genómica (Wende et al. 2000).

Se ha descrito la existencia de cuatro variantes generadas por maduración alternativa del ARN de *LAIR-1*, que dan lugar a diferentes isoformas del receptor (Xu et al. 2000). LAIR-1b, en comparación con LAIR-1a, pierde el exón interno 4. LAIR-1c es idéntico a LAIR-1b, excepto por la pérdida de un triplete de nucleótidos del exón 1. LAIR-1d pierde gran parte del exón 10.

En la Tabla 2 aparecen los códigos de las secuencias de los transcritos alternativos de *LAIR-1* depositados en las bases de datos de GenBank y Ensembl. Es de destacar que, el motivo de elección del estudio de los transcritos alternativos LAIR-1a y LAIR-1b se debe a la existencia de un consenso entre las secuencias depositadas en ambas bases de datos para ambos transcritos. Esto se refleja en la existencia de identificadores CCDS (*Consensus Coding Sequences*).

Tabla 2. Códigos de secuencia de los transcritos alternativos de LAIR-1 depositados en las bases de datos de GenBank y Ensembl.

	GenBank (NCBI)	Ensembl (EMBL-EBI)	CCDS
ARNm LAIR-1a	NM_002287	ENST00000391742	CCDS12891
ARNm LAIR-1b	NM_021706	ENST00000348231	CCDS12892
ARNm LAIR-1c	AF251509	ENST00000391743	-
ARNm LAIR-1d	AF251510	-	-

Información general de la proteína LAIR-1. Estructura, señalización celular y función

LAIR-1 es una glicoproteína transmembrana tipo I de 287 aminoácidos que contiene un único dominio Ig extracelular tipo C2 y dos motivos ITIM en su dominio citoplasmático.

Como ya se ha mencionado, se han descrito varias isoformas de LAIR-1 (Fig. 1). LAIR-1b pierde, con respecto a LAIR-1a, 17 aminoácidos en la región comprendida entre el dominio extracelular tipo Ig y el dominio transmembrana (región señalada en rojo en la Fig. 1). Esto puede afectar a su glicosilación, así como a la afinidad de la isoforma por su ligando. La expresión de la isoforma LAIR-1c ha sido descrita en células T (Jurkat) y difiere de LAIR-1b por la pérdida del aminoácido en posición 23. LAIR-1d pierde gran parte del dominio intracelular, incluidos los motivos ITIM y su expresión no ha sido determinada.

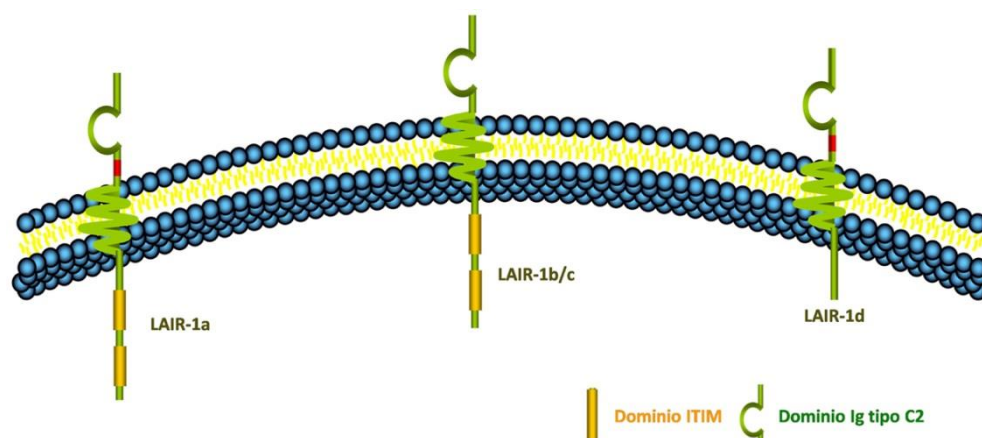


Figura 1. Isoformas de LAIR-1. Los 17 aminoácidos que pierde LAIR-1b se representan en rojo. Como LAIR-1b y LAIR-1c difieren únicamente en un aminoácido, éstos se han representado en conjunto.

Tabla 3. Códigos de secuencia de las isoformas proteicas de LAIR-1 depositados en las bases de datos de GenPept, Ensembl y UniProtKB.

	GenPept (NCBI)	Ensembl (EMBL-EBI)	UniProtKB
LAIR-1a	NP_002278	ENSP00000375622	Q6GTX8
LAIR-1b	NP_068352	ENSP00000301193	Q6GTX8-2
LAIR-1c	AAF71274	ENSP00000418998	Q6GTX8-3
LAIR-1d	AAF1275	-	Q6GTX8-4

En la Tabla 3 aparecen los códigos de las secuencias de las isoformas proteicas de LAIR-1 que han sido depositadas en las bases de datos GenPept (NCBI), Ensembl y UniProtKB. Los alineamientos de las secuencias proteicas, realizados mediante la herramienta del NCBI BLASTprotein, revelaron una equivalencia entre las secuencias depositadas en las tres bases de datos.

LAIR-1 se expresa en la mayoría de leucocitos de sangre periférica, incluyendo células NK, linfocitos T y B, monocitos, eosinófilos y células dendríticas, así como en la mayoría de timocitos y células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ (Meyaard et al. 1997, Ouyang et al. 2003, Poggi et al. 1995, Verbrugge et al. 2003). Además, el receptor se expresa de manera inducible en neutrófilos de sangre periférica y de manera diferencial respecto al grado de maduración en linfocitos B (Van der Vuurst de Vries et al. 1999) y linfocitos T (Jansen et al. 2007; Maasho et al. 2005). La expresión del receptor es nula en neutrófilos maduros en estado de reposo, plaquetas o células no hematopoyéticas (Meyaard et al. 1997).

De acuerdo con la presencia de dos motivos ITIM, LAIR-1 funciona como un receptor inhibitorio. El entrecruzamiento del receptor resulta en la fosforilación de los motivos ITIM por quinasas de la familia Scr (SFK) y en el posterior reclutamiento de fostasas con dominio SH2 (SHP-1 y SHP-2) y Csk. El reclutamiento de Csk para inhibir la respuesta inmunitaria se realiza cuando la actividad fosfatasa es limitada (Verbrugge et al. 2006).

El entrecruzamiento del receptor por anticuerpos monoclonales (mAbs) puede inhibir la función de varias células inmunitarias *in vitro*. Así, el entrecruzamiento de LAIR-1 inhibe la actividad citolítica de células NK y linfocitos T, donde también interviene en la modulación de la producción de citocinas (Meyaard et al. 1999). En el caso de los linfocitos B, LAIR-1 modula la producción de inmunoglobulinas e inhibe la movilización de calcio inducida por el entrecruzamiento del receptor de células B (BCR) (Van der Vuurst de Vries et al. 1999). Además, LAIR-1 inhibe la diferenciación de monocitos a células dendríticas (Poggi et al. 1998). LAIR-1 es así un receptor inhibitorio

ampliamente expresado que modula potencialmente muchos aspectos de la función celular inmunitaria.

Con respecto al ligando de LAIR-1, recientemente se ha demostrado que algunos tipos de colágeno transmembrana y extracelular son ligandos para LAIR-1 (Lebbink et al. 2006). Esta unión es de elevada afinidad y dependiente de la repetición del tripéptido Gly-P-O (glicina-prolina-hidroxiprolina) en la molécula de colágeno. C1q, el primer componente del complemento, ha sido recientemente establecido como ligando funcional de LAIR-1. La porción fibrilar tipo colágeno de C1q se asocia con LAIR-1 en monocitos, inhibiendo la diferenciación de monocitos a células dendríticas (Son et al. 2012). La interacción de LAIR-1 con su ligando es regulada negativamente por LAIR-2 (CD306), que interacciona también con la molécula de colágeno.

En un paciente con cirrosis hepática, el contenido total de colágeno se incrementa en 8 veces lo normal, siendo los tipos de colágeno I y III los más abundantes (Arthur 2000; Wells 2000). Estos tipos de colágeno son ligandos establecidos del receptor LAIR-1, por lo que dicho receptor podría estar implicado en la patología de cirrosis hepática.

Desarrollo y optimización de la qRT-PCR

Para el estudio de la expresión génica de las isoformas LAIR-1a y LAIR-1b mediante qRT-PCR se diseñaron un total de 3 cebadores con un tamaño entre 19 y 22 nucleótidos y una temperatura de disociación de alrededor de 60°C. La selección se realizó en base a la secuencia de ADNc de LAIR-1 (Número de acceso de la base de datos GenBank BC027899), así como en base a las secuencias de ARNm de LAIR-1a (Número de acceso de la base de datos GenBank NM_002287) y LAIR-1b (Número de acceso de la base de datos GenBank NM_021706). Se verificó la especificidad de las secuencias elegidas mediante la herramienta Primer-BLAST del *National Center for Biotechnology Information (NCBI, National Library of Medicine, National Institutes of Health, EE.UU.)* A continuación se llevó a cabo una evaluación teórica de las distintas parejas, consistente en la búsqueda de de homología entre las secuencias de los cebadores diseñados y las diversas secuencias de LAIR-1, mediante el programa de libre acceso PerIprimer. Asimismo, se evaluó la capacidad de formación de estructuras secundarias de solapamiento de cada uno de estos cebadores mediante la herramienta OligoCalc (Kibbe 2007). Las secuencias de los cebadores utilizados en el presente trabajo se indicaron en la Tabla 1. La localización de los cebadores para LAIR-1a y LAIR-1b se pueden observar esquematizados en la Figura 2.

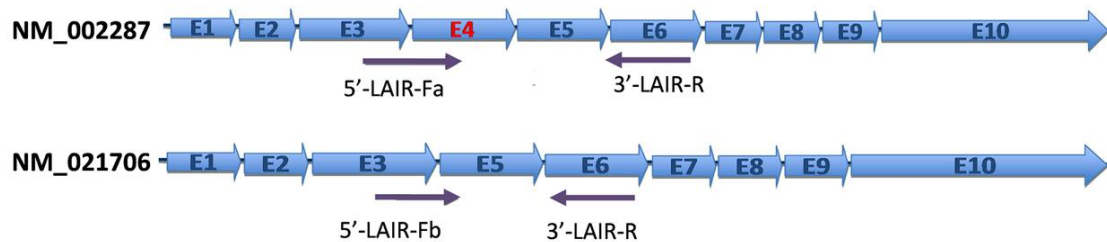


Figura 2. Mapa de localización de los cebadores en las secuencias de ARNm de LAIR-1a (NM_002287) y LAIR-1b (NM_021706). LAIR-Fa hibrida en la unión entre el exón 3 y el exón 4, no presente en LAIR-1b. LAIR-Fb hibrida en la unión entre el exón 3 y el exón 5. LAIR-R hibrida en el exón 6, presente en ambas isoformas.

La eficiencia de amplificación se evaluó empleando diluciones del ADNc obtenido a partir de 1 µg de ARN total (1:2, 1:10, 1:100 y 1:1000), obteniendo eficiencias de amplificación de 82.9 % (LAIR-1a), 86.7% (LAIR-1b) y 92.8% (GAPDH).

Para analizar cómo varía el ΔC_t con la dilución de ADNc y comprobar así la eficiencia de amplificación, se representó el log de los µg de ARN total empleados frente a ΔC_t (C_t LAIR-1a/b – C_t GAPDH) y se calculó el valor de la pendiente. El valor de la pendiente obtenido fue cercano a 0

para LAIR-1a y LAIR-1b, por lo que la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ puede ser empleada para la cuantificación de los transcritos LAIR-1a y -1b.

La expresión génica a nivel basal de LAIR-1a y LAIR-1b es menor en M-DM de ascitis de pacientes con cirrosis hepática

Mediante qRT-PCR se analizó la expresión relativa de LAIR-1a y LAIR-1b a nivel basal (sin estimulación) en M-DM de donantes sanos y en macrófagos peritoneales de pacientes con cirrosis y ascitis. Los macrófagos se cultivaron durante 24 horas antes de la extracción de ARN total y se compararon los niveles de expresión basal de LAIR-1 en ambas poblaciones de macrófagos.

Los resultados (Fig. 3) mostraron que los M-DM de ascitis de pacientes con cirrosis tienen un menor nivel de expresión de LAIR-1a y -1b que en donantes sanos, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($0,3513 \pm 0,007099$ y $1,303 \pm 0,2572$, respectivamente; $P=0.0024$) sólo en el caso de LAIR-a.

Existen diferencias significativas entre ambas poblaciones de macrófagos en la capacidad de respuesta a estímulos activadores como LPS y C. albicans

Mediante qRT-PCR se analizó la expresión relativa de LAIR-1a y LAIR-1b en respuesta a la estimulación con LPS y *C. albicans* a ratio 1:5 macrófago:levadura. Los resultados para LAIR-1a (Fig. 4A) mostraron un incremento significativo de la expresión en repuesta a LPS en M-DM de donantes sanos ($2,097 \pm 0,2887$ frente a $1,023 \pm 0,05863$; $P= 0,0040$). La estimulación con *C. albicans* indujo un incremento no significativo de la expresión relativa de LAIR-1a ($1,053 \pm 0,1148$ frente a $1,023 \pm 0,05863$; $P= 0,824$). Los resultados mostrados en la Figura 4B, revelaron un incremento significativo de la expresión de LAIR-1b en repuesta a LPS ($1,896 \pm 0,2813$ frente a $1,022 \pm 0,06717$; $P= 0,0145$). La estimulación con *C. albicans* indujo un descenso de la expresión relativa de LAIR-1b no significativo ($0,8236 \pm 0,1030$ frente a $1,022 \pm 0,06717$; $P= 0,1484$).

Los resultados para LAIR-1a en macrófagos peritoneales de pacientes con cirrosis (Fig. 5A), no mostraron cambios significativos en respuesta a LPS y *C. albicans* durante 24 horas. En el caso de LAIR-1b (Fig.5B), los resultados mostraron un incremento significativo de la expresión al estimular los M-DM con LPS durante 24 horas ($1,407 \pm 0,07368$ frente a $1,013 \pm 0,05332$; $P=0.076$).

Al comparar la capacidad de respuesta a LPS entre ambas poblaciones, los resultados mostraron diferencias significativas para LAIR-1a, siendo este incremento menor en el caso de M-DM de ascitis de pacientes con cirrosis hepática ($1,079 \pm 0,1143$ y $2,097 \pm 0,2887$, respectivamente; $P= 0,0106$), no observándose diferencias significativas para LAIR-1b. Al comparar la capacidad de respuesta a *C. albicans* se encontraron diferencias significativas entre ambas poblaciones de macrófagos, sólo para LAIR-1b, siendo mayor el incremento registrado en M-DM de ascitis de pacientes con cirrosis hepática respecto a donantes sanos ($1,202 \pm 0,1181$ frente a $0,8236 \pm 0,1030$, respectivamente; $P= 0,0463$).

Discusión

Los macrófagos juegan un papel crucial en la patogénesis de las enfermedades crónicas del hígado (Dasarathy 2008; Heymann et al. 2009; Ramachandran & Iredale 2012). Por lo tanto, es de importancia la investigación de la regulación de los mediadores inflamatorios producidos por estas células inmunitarias en este escenario clínico.

La modulación farmacológica de la respuesta inmunitaria pro-y anti-inflamatoria tiene un gran interés como herramienta terapéutica para muchas enfermedades crónicas, tales como la artritis reumatoide, la cirrosis y la enfermedad intestinal inflamatoria crónica, entre otras.

En este trabajo nos propusimos estudiar la posible implicación de LAIR-1, un receptor inhibidor, en la regulación del proceso inflamatorio en pacientes con cirrosis hepática.

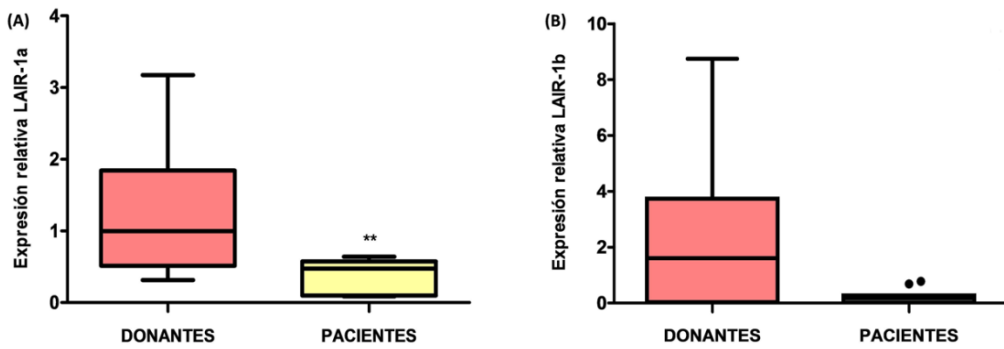


Figura 3. Expresión relativa de LAIR-1a (A) y LAIR-1b (B) en M-DM de sangre periférica de donantes sanos (N=5) frente a macrófagos peritoneales de pacientes con cirrosis y ascitis (N=4). Los resultados se expresan como niveles de expresión relativos (unidades arbitrarias). Prueba U de Mann-Whitney: ** P<0.01.

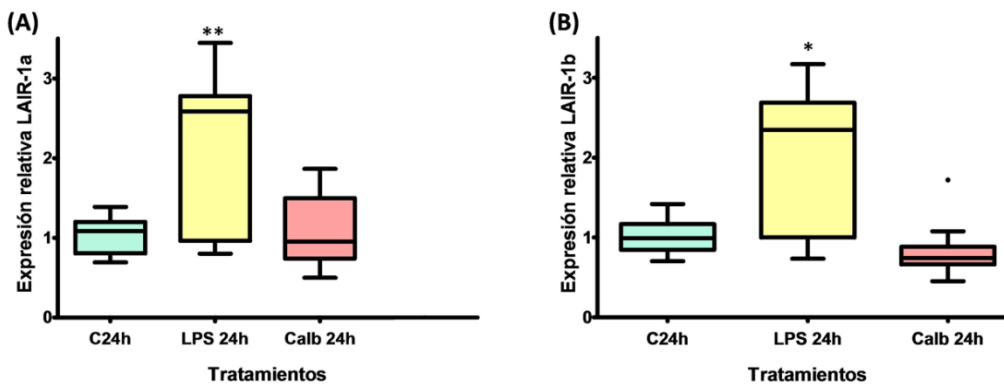


Figura 4. Expresión relativa de LAIR-1a (A) y LAIR-1b (B) en M-DM de sangre periférica de donantes sanos no estimulados (Control 24h=calibrador) frente a M-DM de sangre periférica de donantes sanos estimulados durante 24h (N=5). Los resultados se expresan como niveles de expresión relativos (unidades arbitrarias). Test de la t de student pareado: *P<0.05 y **P<0.01.

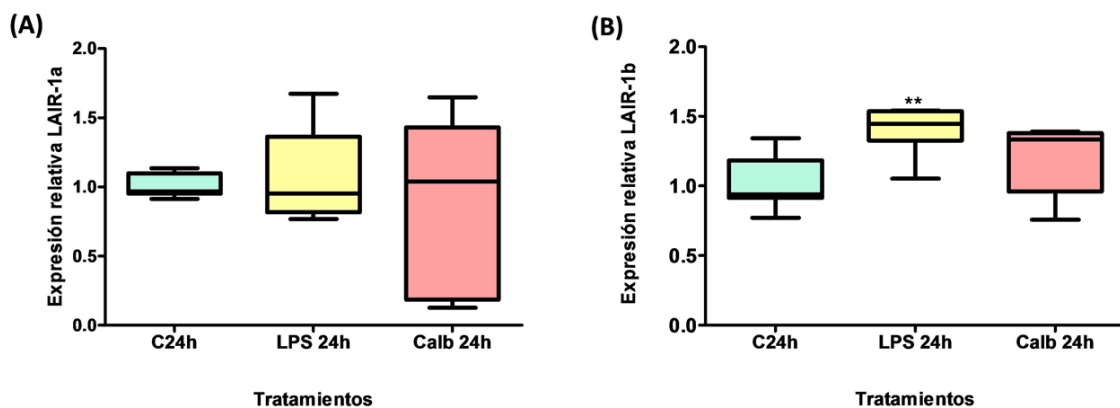


Figura 5. Expresión relativa de LAIR-1a (A) y LAIR-1b (B) en macrófagos de LA de pacientes con cirrosis no estimulados (Control 24h=calibrador) frente a macrófagos de LA de pacientes con cirrosis estimulados durante 24h (N=4). Los resultados se expresan como niveles de expresión relativos (unidades arbitrarias). Test de la t de student pareado: ** P<0.01.

Los resultados muestran una menor expresión basal de LAIR-1a y LAIR-1b en macrófagos de pacientes con cirrosis y ascitis respecto a la expresión en M-DM de donantes sanos. Además, se encontraron diferencias significativas en la capacidad de respuesta a estímulos activadores para las dos isoformas en ambas poblaciones de macrófagos. La expresión de LAIR-1a, se modula en respuesta a LPS siendo la capacidad de respuesta menor en M-DM de ascitis de pacientes con cirrosis hepática, no registrándose diferencias significativas en respuesta a *C. albicans*. Sin embargo, en el caso de LAIR-1b, la capacidad de respuesta a LPS no fue estadísticamente diferente entre ambas poblaciones, pero se registró un mayor incremento en M-DM de ascitis de pacientes con cirrosis hepática en respuesta a la estimulación con *C. albicans*. Estos datos demuestran que existe una regulación diferencial del transcrito codificado por el gen *LAIR-1*, que madura selectivamente hacia una u otra isoforma en función del estímulo recibido.

Estos resultados podrían contribuir a identificar nuevas dianas terapéuticas o diagnósticas para prevenir el daño hepático. No obstante, sería necesario ampliar el número de muestras clínicas en el estudio para comprobar que la significancia estadística es mantenida.

Agradecimientos

Agradecemos al Centro de Hemodonación de la Región de Murcia y a la Unidad de Trasplante Hepático del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia (España) por la cesión de las muestras biológicas. Este estudio ha sido financiado por el proyecto 11926/PI/09 de la Fundación Séneca. Ana Tapia-Abellán es becaria de la Fundación Séneca (12302/FPI/09), Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, y Juan Francisco Rodríguez-Alcázar becario de colaboración de la Universidad de Murcia.

Referencias

- Albillos A, Cuervas-Mons V, Millan I, Canton T, Montes J, Barrios C, Garrido A & Escartin F. 1990. Ascitic fluid polymorphonuclear cell count and serum to ascites albumin gradient in the diagnosis of bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 98 (1): 134–140.
- Arthur MJ. 2000. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 279 (2): G245–9.
- Barten R, Torkar M, Haude A, Trowsdale J & Wilson MJ. 2001. Divergent and convergent evolution of NK-cell receptors. *Trends in Immunology* 22 (1): 52–57.
- Dasarathy S. 2008. Inflammation and liver. *Journal of parenteral and enteral nutrition* 32(6): 660–6.
- Frances R, Benlloch S, Zapater P, Gonzalez JM, Lozano B, Munoz C, Pascual S et al. (2004). A sequential study of serum bacterial DNA in patients with advanced cirrhosis and ascites. *Hepatology* 39 (2): 484–491.
- Heymann F, Trautwein C & Tacke F. 2009. Monocytes and macrophages as cellular targets in liver fibrosis. *Inflammation & allergy drug targets* 8 (4): 307–18.
- Jansen CA, Cruijisen CW, De Ruiter T, Nanlohy N, Willems N, Janssens-Korpela PL & Meyaard L. 2007. Regulated expression of the inhibitory receptor LAIR-1 on human peripheral T cells during T cell activation and differentiation. *European Journal of Immunology* 37 (4): 914–924.
- Kibbe WA. 2007. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research* 35 (2): W43–6.
- Lebbink RJ, De Ruiter T, Adelmeijer J, Brenkman AB, Van Helvoort JM, Koch M, Farndale RW et al. 2006. Collagens are functional, high affinity ligands for the inhibitory immune receptor LAIR-1. *The Journal of Experimental Medicine* 203 (6):1419–1425.
- Livak KJ & Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25 (4): 402–408.
- Long EO. 2008. Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm. *Immunological Reviews* 224: 70–84.
- Maasho K, Masilamani M, Valas R, Basu S, Coligan JE & Borrego F. 2005. The inhibitory leukocyte-associated Ig-like receptor-1 (LAIR-1) is expressed at high levels by human naive T cells and inhibits TCR mediated activation. *Molecular Immunology* 42 (12): 1521–1530
- Martin AM, Kulski JK, Witt C, Pontarotti P & Christiansen FT. 2002. Leukocyte Ig-like receptor complex (LRC) in mice and men. *Trends in Immunology* 23 (2): 81–88.
- Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, Montalto F et al. 1996. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *New England Journal of Medicine* 334 (11): 693–699.
- Meyaard L, Adema GJ, Chang C, Woollatt E, Sutherland GR, Lanier LL & Phillips JH. 1997. LAIR-1, a novel inhibitory receptor expressed on human mononuclear leukocytes. *Immunity* 7 (2): 283–290.

- Meyaard L, Hurenkamp J, Clevers H, Lanier LL & Phillips JH. 1999. Leukocyte-associated Ig-like receptor-1 functions as an inhibitory receptor on cytotoxic T cells. *Journal of Immunology* 162 (10): 5800–5804.
- Meyaard L. 2008. The inhibitory collagen receptor LAIR-1 (CD305). *Journal Leukocyte Biology* 83 (4): 799–803.
- Ouyang W, Ma D, Lin D, Sun Y, Liu X, Li Q, Jia W et al. 2003. 9.1C3 is identical to LAIR-1, which is expressed on hematopoietic progenitors. *Biochemical Biophysical Research Communication* 310 (4): 1236–1240.
- Poggi A, Pella N, Morelli L, Spada F, Revello V, Sivori S, Augugliaro R et al. 1995. p40, a novel surface molecule involved in the regulation of the non-major histocompatibility complex-restricted cytolytic activity in humans. *European Journal of Immunology* 25 (2): 369–376.
- Poggi A, Tomasello E, Ferrero E, Zocchi MR & Moretta L. 1998. p40/LAIR-1 regulates the differentiation of peripheral blood precursors to dendritic cells induced by granulocyte-monocyte colony-stimulating factor. *European Journal of Immunology* 28 (7): 2086–2091.
- Ramachandran P & Iredale JP. 2012. Macrophages: central regulators of hepatic fibrogenesis and fibrosis resolution. *Journal of hepatology* 56 (6): 1417–9.
- Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS & Wenzel RP. 1995. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *Jama* 273 (2): 117–123.
- Ruiz-Alcaraz AJ, Martinez-Esparza M, Cano R, Hernandez-Caselles T, Recarti C, Llanos L, Zapater P et al. 2011. Peritoneal macrophage priming in cirrhosis is related to ERK phosphorylation and IL-6 secretion. *European Journal of Clinical Investigation* 41 (1): 8–15.
- Runyon BA. 1986. Paracentesis of ascitic fluid. A safe procedure. *Archives of Internal Medicine* 146 (11): 2259–2261.
- Son M, Santiago-Schwarz F, Al-Abed Y & Diamond B. 2012. C1q limits dendritic cell differentiation and activation by engaging LAIR-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (46): E3160–7.
- Steevels TA & Meyaard L. 2011. Immune inhibitory receptors: essential regulators of phagocyte function. *European Journal of Immunology* 41 (3):575–587
- Such J, Frances R, Munoz C, Zapater P, Casellas JA, Cifuentes A, Rodriguez-Valera F et al. 2002. Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites. *Hepatology* 36 (1): 135–141.
- Tapia-Abellán A, Ruiz-Alcaraz AJ, Hernandez-Caselles T, Such J, Frances R, Garcia-Penarrubia P & Martinez-Esparza M. 2013. Role of MAP kinases and PI3K-Akt on the cytokine inflammatory profile of peritoneal macrophages from the ascites of cirrhotic patients. *Liver International* 33 (4), 552–560.
- Van der Vuurst de Vries AR, Clevers H, Logtenberg T & Meyaard L. 1999. Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1 (LAIR-1) is differentially expressed during human B cell differentiation and inhibits B cell receptor-mediated signaling. *European Journal of Immunology* 29 (10): 3160–3167.
- Verbrugge A, Ruiters Td T, Clevers H & Meyaard L. 2003. Differential contribution of the immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs of human leukocyte-associated Ig-like receptor-1 to inhibitory function and phosphatase recruitment. *International Immunology* 15 (11): 1349–1358.
- Verbrugge A, Rijkers ES, De RT & Meyaard L. 2006. Leukocyte-associated Ig-like receptor-1 has SH2 domain-containing phosphatase-independent function and recruits C-terminal Src kinase. *European Journal of Immunology* 36 (1): 190–198.
- Vivier E & Daron M. 1997. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunology Today* 18 (6): 286–291.
- Wells RG. 2000. Fibrogenesis. V. TGF-beta signaling pathways. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 279 (5): G845–50.
- Wende H, Volz A & Ziegler A. 2000. Extensive gene duplications and a large inversion characterize the human leukocyte receptor cluster. *Immunogenetics* 51(8-9): 703–713.
- Xu M, Zhao R & Zhao ZJ. 2000. Identification and characterization of leukocyte-associated Ig-like receptor-1 as a major anchor protein of tyrosine phosphatase SHP-1 in hematopoietic cells. *Journal of Biological Chemistry* 275 (23): 17440–17446.