



Universidad de Córdoba

Departamento de Genética

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS
INTEGRINAS BETA-1 (CD29) Y BETA-3 (CD61)
PORCINAS. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA
DOMINIOS ESPECÍFICOS DE AMBAS MOLÉCULAS.**

Ángeles María Jiménez Marín

Tesis Doctoral

Córdoba, Junio 2002

Cuando llegan estos momentos te vienen a la memoria muchas personas que han participado en la realización de esta tesis doctoral, a las cuales tengo que agradecer su granito de arena aportado.

En primer lugar, a mi padre, que con la educación, firmeza y valor que me ha transmitido, he aprendido a luchar siempre en los momentos más difíciles, y con sus palabras de ánimo siempre hacía surgir en mi una sonrisa.

A Manolo Barbancho Medina, a través del cual entré a formar parte de este Departamento y, que a pesar de su nuevo cargo en el Rectorado, siempre ha estado disponible y me ha ayudado cuando lo he necesitado.

A Juan José Garrido Pavón, sin el cual no hubiera finalizado esta tesis doctoral, por su ayuda constante, sus buenos consejos y por “aguantarme y escucharme” más que como un director, como un amigo.

Por supuesto, a ambos, por su labor de dirección con dedicación y trabajo a largo de estos cuatro años y por haber tenido la suerte de haber trabajado junto a ellos.

A Diego Llanes Ruiz, por haber permitido que formara parte de su grupo de investigación, por el apoyo recibido para la consecución de la beca asociada a uno de sus proyectos y por su optimismo hasta en los peores momentos.

A Ángela Moreno López, por transmitirme sus conocimientos de Inmunología, estar siempre que la he necesitado y por sus palabras de aliento en más de un momento difícil.

A Luis Morena Sanz, por estar dispuesto a ayudarme en todo momento y en especial por enseñarme la técnica de los microsátélites.

A Reyes Álvarez, por ayudarme en muchas ocasiones con el trabajo experimental y pasarme las recetas de los reactivos. También por el interés mostrado en mi trabajo de investigación y poder contar con ella en todos los aspectos.

A María Friend, por transmitirme todo lo relacionado con el cultivo celular y por su cuidado y mimo en las ocasiones que más los necesitabas.

A Cristina Arce, por sus consejos e interés en todo lo relacionado con esta tesis, por su ayuda en la estructuración de la tesis, por su amistad y los buenos ratos compartidos.

A Gonzalo Paños, por ayudarme con las citometrías, el interés mostrado, en especial por una de las moléculas caracterizadas, y hacer los viajes en el autobús más amenos, al igual que las comidas.

A Yasser Ezzart por ayudarme siempre que se lo he pedido y entender la monopolización del ordenador durante estos últimos meses.

A Noemí Yubero, que aunque lleva poco tiempo entre nosotros ya hemos compartido algunos buenos momentos.

A Damián de Andrés, por ayudarme siempre que pudo, tener respuesta a cualquier duda y prestarme todo el tiempo necesario en mis primeros momentos en el Departamento.

A José Pérez de la Lastra, que a pesar de no haber compartido mucho tiempo juntos en el laboratorio, he podido siempre contar con su ayuda.

A Lola Galiani, Alicia Márquez y Eva Sarrión, que a pesar de no encontrarse ya entre nosotros, siempre estuvieron interesadas y me prestaron su ayuda siempre que la necesité. En especial, a Alicia por los buenos momentos vividos y sus consejos tanto en el trabajo experimental como en otros temas; y a Lola, por ayudarme en los momentos tan difíciles que ella y yo sabemos.

A Juana Martín de la Mulas, por transmitirme las técnicas de inmunohistoquímica, por su paciencia e interés mostrado, al igual que por ayudarme en la elaboración de las fotos y su interpretación.

A Yolanda Millán, por compartir poyata en más de una ocasión y enseñarme todo lo relacionado con la inmunohistoquímica.

A Librado Carrasco, por su inestimable ayuda a la hora de la interpretación de algunos resultados de inmunohistoquímica.

A Antonio Di Pietro, por iniciarme en el trabajo experimental, contar con su apoyo y prestarme su ayuda.

Como también a Isabel Roncero, por permitirme formar parte de su grupo durante algunos años como alumna interna; y a Encarnación Alejandre, ya que gracias a su motivación en las clases de Genética despertó en mi el interés por la investigación.

A Maite Roldán por su ayuda en algunos temas informáticos y cedernos el sistema de expresión pET.

A todos mis compañeros del ala este del edificio C-5, con los que comparto todos los días la comida, gracias por el apoyo recibido y los temas de sobremesa.

A mi familia, por entender y comprender mi ausencia durante la elaboración de la tesis, sobretodo en los últimos meses, y sobretodo a mi madre, por no estar a su lado en estos momentos, que quizá sean, en los que más me necesita.

Finalmente, a Andrés por sus consejos, por la paciencia que ha mostrado en todos los momentos, sobretodo en los más difíciles, y saber entenderme, escucharme y aguantarme cuando ni siquiera yo era capaz.

A la memoria de mi padre, Ángel

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	
1. RECEPTORES DE ADHESIÓN	1
1.1. La superfamilia de las inmunoglobulinas	2
1.2. Las cadherinas	3
1.3. Las selectinas	3
1.4. Las integrinas	4
2. ESTRUCTURA DE LAS INTEGRINAS	4
2.1. Subunidades α	7
2.2. Subunidades β	7
3. EL LIGANDO	9
4. LOS CATIONES DIVALENTES	10
5. LA UNIÓN AL LIGANDO	11
6. LAS INTEGRINAS COMO RECEPTORES DE SEÑALIZACIÓN	13
7. CD29 O β_1 INTEGRINA	14
7.1. La familia de las β_1 integrinas	14
7.2. Funciones de la familia β_1 integrina	15
7.3. $\alpha_1\beta_1$ (VLA-1, CD49a/CD29)	15
7.4. $\alpha_2\beta_1$ (VLA-2, CD49b/CD29)	16
7.5. $\alpha_3\beta_1$ (VLA-3, CD49c/CD29)	16
7.6. $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4, CD49d/CD29)	17
7.7. $\alpha_5\beta_1$ (VLA-5, CD49e/CD29)	17
7.8. $\alpha_6\beta_1$ (VLA-6, CD49f/CD29)	18
7.9. $\alpha_7\beta_1$ (VLA-7, CD49g/CD29)	18
7.10. $\alpha_8\beta_1$ (VLA-8, CD49h/CD29)	18
7.11. $\alpha_9\beta_1$ (VLA-9, CD49i/CD29)	19
7.12. $\alpha_{10}\beta_1$ (VLA-10, CD49j/CD29)	19
7.13. $\alpha_{11}\beta_1$ (VLA-11, CD49k/CD29)	19
7.14. $\alpha_v\beta_1$ (VLA-v, CD49v/CD29)	20
8. CD61 O β_3 INTEGRINA	20
8.1. La familia de las β_3 integrinas	20
8.2. $\alpha_{IIb}\beta_3$	21
8.3. $\alpha_v\beta_3$	22
9. EL PAPEL DE LAS INTEGRINAS β_1 Y β_3 EN EL XENOTRANSPLANTE	23
10. EL PAPEL DE LAS INTEGRINAS β_1 Y β_3 EN EL CÁNCER	24
11. EL PAPEL DE LAS INTEGRINAS β_1 Y β_3 EN LA TERAPIA GÉNICA	26
12. LAS β_1 Y β_3 INTEGRINAS EN LOS ANIMALES DOMÉSTICOS	27
13. EL CERDO COMO ANIMAL DE ESTUDIO	30
OBJETIVOS	33
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. ANIMALES, TEJIDOS Y CÉLULAS	35
1.1. Aislamiento de células mononucleadas (PBMC) y plaquetas de sangre periférica	35
1.2. Esplenocitos de ratón	35
1.3. Células de mieloma	36

1.4. Descongelación de células y congelación de células	36
1.5. Estirpes de <i>E.Coli</i>	36
2. OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO	36
3. AISLAMIENTO DE ARN EUCARIÓTICO	37
4. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	37
5. RT-PCR	38
5.1. Síntesis de la primera cadena (RT)	38
5.2. Síntesis de la segunda cadena (PCR)	38
6. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN DE GELES DE AGAROSA	39
7. LIGACIÓN	39
8. OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	39
9. TRANSFORMACIÓN	40
10. MINIPREPS	40
11. MAXIPREPS	41
12. DIGESTIÓN POR ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN	41
13. SECUENCIACIÓN	42
13.1. Preparación del gel de secuenciación	42
13.2. Reacción de secuenciación	42
13.3. Purificación mediante precipitación con etanol	42
13.4. Electroforesis y análisis automático de la secuencia	43
14. OBTENCIÓN DE LA SONDA ESPECÍFICA	43
15. RASTREO DE GENOTECAS	44
15.1. Cultivo de la genoteca	44
15.2. Transferencia a membrana de nylon	44
15.3. Hibridación	45
15.4. Detección de placas positivas	45
15.5. Identificación de clones positivos mediante PCR	45
15.6. Procedimiento de escisión	46
16. SOUTHERN BLOTTING	46
17. PANEL DE HÍBRIDOS CELULARES SOMÁTICOS	47
18. EXPRESIÓN DE LOS GENES EN <i>E.coli</i>	49
18.1. Construcción de un vector para la expresión	49
18.2. Transformación bacteriana	49
18.3. Expresión en <i>E.coli</i> y purificación	50
19. ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA	50
20. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS	51
21. PRODUCCIÓN DE HIBRIDOMAS	51
21.1. Inmunización de los ratones	51
21.2. Fusión celular	51
22. INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO (ELISA)	52
23. CLONACIÓN DE HIBRIDOMAS	52
24. PRODUCCIÓN DE ASCITIS	53
25. PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS EN COLUMNA DE PROTEÍNA A	53
26. PURIFICACIÓN DEL ANTÍGENO	54

27. INMUNOBLOTTING	54
28. INMUNOPRECIPITACIÓN	56
28.1. Marcaje con biotina de las proteínas de membrana	56
28.2. Inmunoprecipitación	56
28.3. Electroforesis, transferencia y revelado	57
29. TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS	57
29.1. Muestras de tejidos	57
29.1.1. Procedencia de las muestras	57
29.1.2. Tipo de muestras	57
29.1.3. Procesado de las muestras	57
29.1.4. Preparación de los cortes de tejido	58
29.2. Desarrollo de las técnicas inmunohistoquímicas	58
29.2.1. Preparación de los cortes de tejido	58
29.2.2. Desarrollo de la reacción antígeno-anticuerpo (incubación con los anticuerpos específicos)	59
29.2.3. Coloreado de la reacción antígeno-anticuerpo para su visualización en microscopia óptica	59
RESULTADOS	
1. CARACTERIZACIÓN DE LA SUBUNIDAD β_1 DE LAS INTEGRINAS PORCINAS (CD29)	61
1.1. Obtención de la sonda CD29	61
1.2. Rastreo de la genoteca	62
1.3. Secuencia completa del gen CD29 porcino	63
1.4. Comparación de la secuencia CD29 porcina con otras moléculas CD29	66
1.5. Localización cromosómica del gen porcino CD29	69
1.6. Análisis de la expresión de CD29 de cerdo a nivel de ARNm	69
1.7. Análisis de la expresión de la proteína CD29 en tejidos porcinos	70
2. CARACTERIZACIÓN DE LA SUBUNIDAD β_3 DE LAS INTEGRINAS PORCINAS (CD61)	79
2.1. Purificación de CD61 porcino	79
2.2. Obtención de la sonda CD61	80
2.3. Rastreo de la genoteca	80
2.4. Secuencia porcina de CD61	82
2.5. Comparación de la secuencia CD61 porcina con otras moléculas CD61	85
2.6. Localización cromosómica del gen porcino CD61	88
2.7. Análisis de la expresión de CD61 de cerdo a nivel de ARNm	88
2.8. Análisis de la expresión de la proteína CD61 en tejidos porcinos	89
DISCUSIÓN	
1. ESTRUCTURA DE LAS INTEGRINAS β_1 Y β_3 PORCINAS	101
1.1. CD29	101
1.2. CD61	104
1.3. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN EN LAS SUBUNIDADES β INTEGRINAS	109
1.3.1. Motivos funcionales de la región extracelular	110
1.3.1.1. Unión al ligando	110
1.3.1.2. Activación	111
1.3.2. Motivos funcionales de la región citoplasmática	112

2. LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA	113
3. EXPRESIÓN DE LAS INTEGRINAS β_1 Y β_3 PORCINAS	115
CONCLUSIONES	121
ANEXOS	
ANEXO 1: REACTIVOS	123
ANEXO 2: APARATOS Y MATERIAL	127
BIBLIOGRAFÍA	129

INTRODUCCIÓN

El funcionamiento de los organismos multicelulares pone de manifiesto la integración de sus elementos -incluyendo células y matriz extracelular (ECMs)-, mediante la adecuada adhesión y comunicación entre ellos (Hynes y Zhao, 2000).

Sin embargo, a pesar de la importancia de las interacciones adhesivas, hasta recientemente no se ha conocido cómo estas interacciones intervienen en los diferentes procesos fisiológicos.

Hoy se sabe que las células del organismo se adhieren unas a otras reuniendo matriz extracelular alrededor de ellas y que la matriz extracelular consiste fundamentalmente en una estructura altamente ordenada de cadenas de azúcares y proteínas fibrosas interconectadas, que son segregadas y ordenadas por las células, que, a su vez, ejerce un control remarcable sobre ellas (Aplin et al., 1998).

Así pues, la respuesta específica de la célula depende del tipo celular involucrado, de su estado y de la composición de la matriz en ese momento, y viene determinada por un acontecimiento particular (Horwitz, 1997). De esta manera, algunas células responden cambiando su conformación, otras veces migrando, proliferando, diferenciándose o cambiando sus actividades.

Para entender cómo la matriz permite estos cambios celulares y estas distintas respuestas, se han identificado los receptores en las células, ya que éstos sirven de sitios de anclaje para las proteínas de la matriz, gobiernan las interacciones y la comunicación célula-matriz y célula-célula. En líneas generales, se puede concluir que la calidad de la respuesta viene determinada por el tipo de receptor estimulado y su preponderancia, en tanto que la intensidad de la misma está más bien relacionada con el número de receptores y con la cantidad de agentes estimulantes. A su vez, la especificidad de la adhesión celular viene determinada por la expresión combinada y su interacción con un determinado número de receptores de adhesión (Hynes, 1999).

1. LOS RECEPTORES DE ADHESIÓN

Las moléculas o receptores de adhesión están ampliamente expresadas en la superficie celular. A su papel de adhesión se suma su función de transducción de señales, a través de proteínas-G, fosfolípidos y proteínquinasas, para regular varias funciones celulares, relacionadas con el comportamiento celular: forma y polarización celular, organización del citoesqueleto, motilidad celular, proliferación, supervivencia y diferenciación (Ruoslahti, 1995). Por lo tanto, al mediar las interacciones célula-célula y célula-matriz, los receptores de adhesión se ven involucrados en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos.

Las moléculas de adhesión se agrupan en cuatro importantes familias: las cadherinas, la superfamilia de las inmunoglobulinas, las selectinas y las integrinas. Otras familias de receptores de adhesión como los sindecanos y los proteoglicanos unidos a membrana, las disintegrinas y otros, son menos conocidos por el momento (Hynes, 1999).

En las interacciones célula-célula, un receptor se encuentra en la superficie de una célula mientras que su ligando específico se encuentra en la superficie de la célula adyacente. Algunas interacciones receptor-ligando son homotípicas (entre moléculas parecidas) mientras que otras son heterotípicas (entre diferentes tipos de moléculas). La adhesión homotípica se presenta en las cadherinas y algunas inmunoglobulinas; sin embargo, la adhesión heterotípica se presenta entre integrinas-inmunoglobulinas y selectinas-glicoproteínas (Humphries, 2000).

En la adhesión célula-matriz, los receptores de la superficie celular son casi siempre miembros de la familia de las integrinas, reconociendo ligandos que son componentes de algunos tipos de matriz (matriz del tejido conectivo, membranas basales y matrices mineralizadas) (Humphries, 2000). A esta familia de receptores de adhesión celular pertenecen las dos moléculas caracterizadas en este estudio.

1.1. La superfamilia de las inmunoglobulinas

La superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig-SF), caracterizada por la presencia de un número variado de dominios relacionados con las inmunoglobulinas (Walsh et al., 1997) fue la primera familia de moléculas de adhesión descubierta (Williams y Barclay, 1998). Se caracterizan por ser largas glicoproteínas de la membrana plasmática cuya principal función es la adhesión célula-célula, estando además implicadas en diferentes procesos biológicos y siendo expresadas por numerosos tipos celulares. La estructura molecular típica de esta familia consta de un dominio extracelular largo, un único segmento transmembranario helicoidal y un dominio citoplasmático (Aplin et al., 1998).

Se trata de una familia de moléculas de adhesión celular (CAM) constituida por alrededor de cien miembros en vertebrados, siendo el más representativo la neural-CAM o N-CAM, presente en la superficie de células nerviosas y en las células de glía (Rutishauser y Goidid, 1986). Un cierto número de moléculas responsables de la adhesión de las células circulantes de la sangre (neutrófilos, linfocitos, eosinófilos) con el endotelio de los vasos sanguíneos también están encuadradas en este grupo, por ejemplo ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 y LFA3. Finalmente, otras moléculas de relevante importancia dentro de la superfamilia de las inmunoglobulinas son las de

clase I y II del complejo principal de histocompatibilidad, así como sus ligandos respectivos: de una parte CD8, expresado por los linfocitos T₈ citotóxicos, y de otra CD4, presente en los linfocitos T₄ auxiliares.

1.2. Las cadherinas

Las cadherinas constituyen una familia de glucoproteínas de la superficie celular involucrada principalmente en la adhesión célula-célula mediante un sistema dependiente de calcio (Takeichi, 1988). Atendiendo al tipo celular en el que con mayor abundancia se expresan, las cadherinas han sido clasificadas en cuatro subfamilias: cadherina E (epitelial), cadherina N (neuronas), cadherina P (placenta) y cadherina V (tejido vascular) (Yap et al., 1997). La homología entre las cadherinas de diversos tejidos es elevada, siendo la región citoplasmática la zona mejor conservada, fenómeno sin duda ligado al importante papel que este dominio representa en el mantenimiento de la morfología celular.

Las cadherinas intervienen de manera fundamental en el reconocimiento celular durante la embriogénesis, regulando la compleja cascada de sucesos que tienen como resultado la cohesión celular, de tal manera que una anomalía en su expresión puede conducir al desarrollo de tumores y a la formación de metástasis.

1.3. Las selectinas

Son las moléculas que intervienen en la adhesión de los linfocitos al endotelio vascular, desencadenando el fenómeno conocido como *rolling* linfocitario. Las selectinas determinan el establecimiento de interacciones heterotípicas débiles en una etapa transitoria indispensable para la formación de uniones más fuertes determinadas por las integrinas. La consecuencia última es la fijación de los leucocitos a un punto determinado del endotelio vascular y la extravasación o diapédesis.

Hasta el momento han sido caracterizados tres tipos de selectinas designadas por la inicial del tipo celular en el que fueron descubiertas (Bevilacqua et al., 1993)). La selectina E interviene esencialmente en la adhesión y la migración de los neutrófilos a las células endoteliales y su expresión en este último tipo celular es mediada por citoquinas. La selectina P, inicialmente localizada en plaquetas (Bofanti et al., 1989) presenta una función, mal definida hasta el momento, relacionada con la trombosis y la hemostasis. Finalmente, la selectina L es una proteína relacionada con el reconocimiento de los linfocitos por los ganglio linfáticos periféricos y que interviene igualmente en la adhesión de los monocitos y los neutrófilos a las células endoteliales.

1.4. Las integrinas

El término “integrina” fue aplicado por primera vez en un artículo de revisión para describir la mayor familia de receptores transmembranarios heterodiméricos de la superficie celular, relacionados estructural y funcionalmente, y cuya función es la de integrar la matriz extracelular con el citoesqueleto intracelular para mediar la migración celular y la adhesión (Hynes, 1987). Excepto los eritrocitos maduros, todos los tipos celulares expresan en su superficie una o más integrinas (Hemler, 1990), y únicamente en mamíferos pueden ser encontradas más de 20 integrinas distintas (Kreidberg y Symons, 2000). En algunos tipos celulares los receptores expresados en la membrana son mayoritariamente integrinas; como es el caso de las plaquetas que presentan unas 80.000 copias del receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ en su superficie celular (Shattil et al., 1998).

Muchas integrinas son predominantemente o exclusivamente receptores para proteínas de la ECM tales como, fibronectinas, lamininas y colágenos, pero otras también juegan un papel importante en la adhesión celular heterofílica, más notablemente en leucocitos, donde las integrinas se unen a receptores de la Ig-SF (ICAMs, VCAM-1, MAdCAM-1) o a una cadherina ($\alpha_E\beta_7$ -E-caherina).

Las integrinas juegan un papel central en la adhesión celular a la membrana basal, en la polarización de las células inducidas por esta adhesión y en la migración celular a través de la ECM y sobre ella. Además, las integrinas, como receptores de adhesión celular, transducen señales. Así pues, las integrinas son moléculas de adhesión responsables de fenómenos de interacción de unas células con otras y con la matriz extracelular que son cruciales, tanto para la diferenciación de las células animales en órganos y tejidos, la regulación de los linfocitos, como para todo el proceso del desarrollo, teniendo igualmente un papel central en las funciones del sistema inmune (Springer, 1990). Todo ello implica que las integrinas tienen importantes implicaciones en los procesos biológicos y patológicos, entre los que se incluyen: hemostasis, inflamación, coagulación sanguínea, cicatrización de heridas, respuesta inmune, maduración celular, crecimiento, metástasis tumorales, trasplante y desarrollo embriológico (Hynes, 1992; Horwitz, 1997; Holzknecht y Platt, 1995).

2. ESTRUCTURA DE LAS INTEGRINAS

La primera integrina descrita fue el receptor de la fibronectina (Pytela et al., 1985) que, junto con los demás miembros de esta familia descubiertos posteriormente, muestran la misma estructura básica: glucoproteínas transmembranarias constituidas

por dos cadenas protéicas, o subunidades, una α y una β (**Figura 1**). De la subunidad α se conocen hasta el momento 17 variantes y 8 de la subunidad β (**Figura 2**). Estas cadenas, que se nombran generalmente con un número o una letra, interactúan de una forma no covalente para formar heterodímeros diferentes. Actualmente son conocidos 24 dímeros diferentes resultantes de la combinación de las subunidades α y β identificadas.

Si subunidades α se asociaran libremente con subunidades β , un largo repertorio de integrinas se generaría en cada tipo celular. En realidad, la diversidad está restringida, al asociarse muchas subunidades α (excepto α_4 α_6 y α_V que se asocian aleatoriamente) con un solo tipo de subunidad β , generando las distintas subfamilias β integrinas, de las que las más importantes son las β_1 , β_2 y β_3 integrinas (Green et al., 1998) (**Figura 2**).

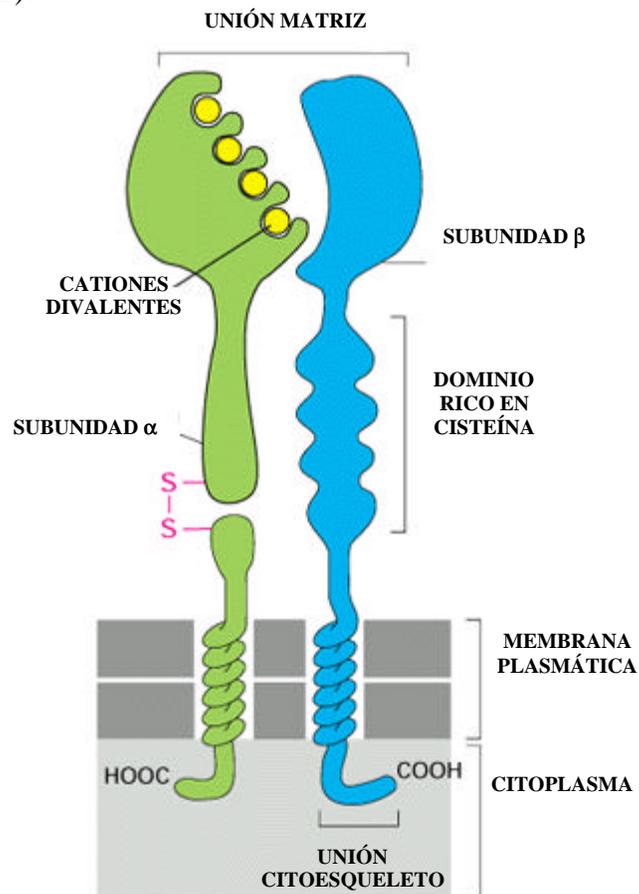


Figura 1: Esquema de la estructura de las subunidades de una integrina. La subunidad α está constituida por dos cadenas unidas mediante un puente disulfuro y en su dominio extracelular se localizan 4 dominios de unión a cationes divalentes. El dominio extracelular de la subunidad β contiene una región rica en repeticiones de cisteínas y el dominio citoplasmático es el responsable de las fijación del dímero al citoplasma celular.

La nomenclatura más usada para denominarlas es α ó β seguida de un número, aunque algunos nombres usados en un principio persisten aún en la bibliografía. Así pues, uno de los miembros de la β_3 integrinas, $\alpha_{IIb}\beta_3$, específica de plaquetas es, a menudo, denominada como GPIIb-IIIa, al igual que otras integrinas expresadas en el mismo tipo celular (GPIaIIa= $\alpha_2\beta_1$, GPIcIIa= $\alpha_5\beta_1$) (Kieffer y Phillips, 1990; Phillips et al., 1991). Las integrinas β_2 , específicas de leucocitos, son referidas también con el primer nombre ($\alpha_L\beta_2$ =LFA-1; $\alpha_M\beta_2$ =Mac-1, Mo-1 o CR3; $\alpha_X\beta_2$ =p150, 95) y con nomenclatura CD (cluster de diferenciación) (β_2 =CD18; subunidades α asociadas=CD11a,b,c), que para otras integrinas es raramente usada (Hemler, 1990; Springer, 1990). Finalmente, muchas β_1 integrinas, a veces, son referidas como antígenos VLA (very late after activation), un nombre que surge al mismo tiempo que la descripción de $\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_2\beta_1$ en linfocitos (Hemler, 1990). Sin embargo, después de saber que muchas células expresan una o más β_1 integrina constitutivamente y que algunas subunidades α se asocian a otras subunidades β , la nomenclatura $\alpha\beta$ es la más aplicada (Hynes et al., 1992).

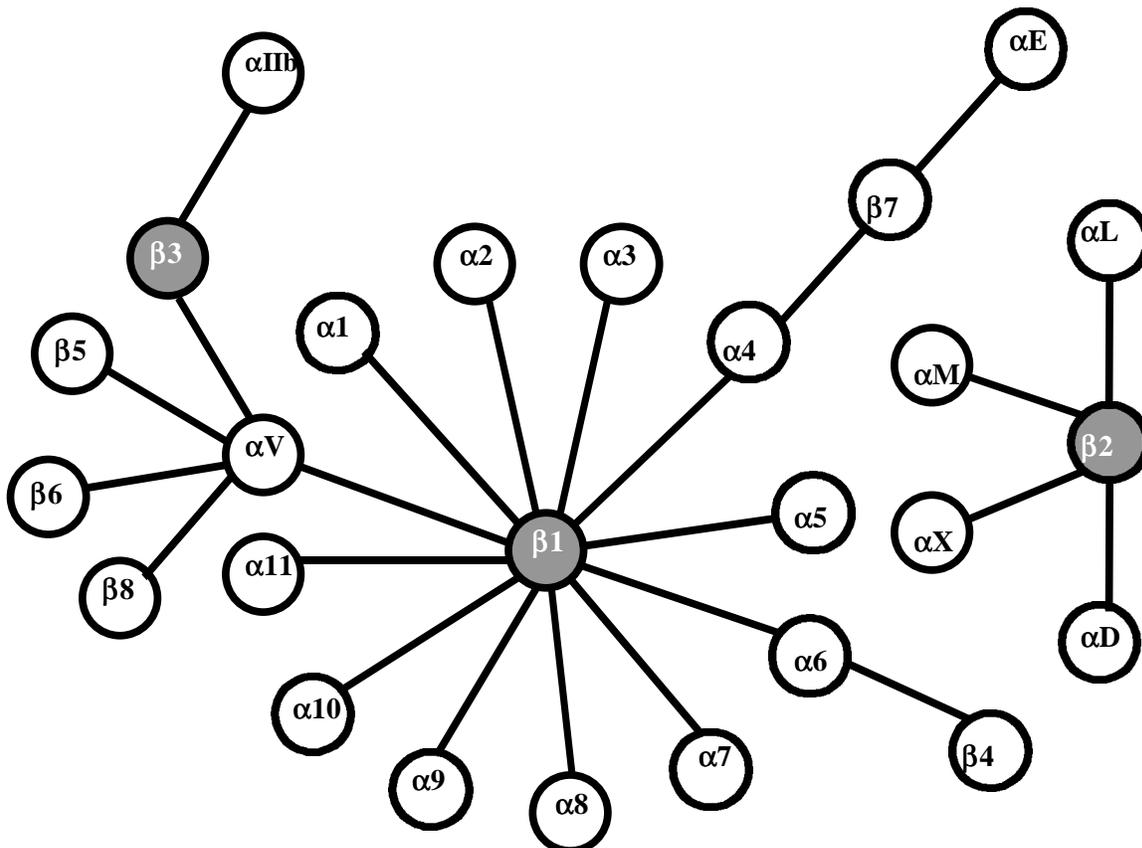


Figura 2: La familia de las integrinas. Todas las subunidades α y β conocidas se representan como círculos, mientras que las líneas muestran las asociaciones conocidas entre ellas. Se resaltan las subunidades β más importantes.

2.1. Subunidades α

Las subunidades α de las integrinas son homólogas entre ellas, pero no aparentemente con las subunidades β , como ponen de manifiesto los estudios de análisis de secuencia de distintas subunidades. Estas homologías afectan al dominio transmembranario, al dominio citoplasmático y a determinadas regiones del dominio extracelular (Takada et al., 1989).

En función de los motivos estructurales presentes en el dominio extracelular, las subunidades α de las integrinas se clasifican en tres categorías (**Figura 3**). Los miembros del primer grupo- α_{IIb} , α_5 , α_6 , α_7 y α_3 -tienen cuatro sitios probables de unión a cationes divalentes, cada uno de aproximadamente 60 aminoácidos de largo, y un sitio de corte de una proteasa. Los miembros del segundo grupo- α_{M} , α_{L} , α_{X} , α_1 , α_2 , α_{E} y α_{D} -tienen tres sitios probables de unión a cationes divalentes, pérdida del sitio de corte para la proteasa y una secuencia adicional de 180-200 aminoácidos correspondiente al denominado dominio I (de “inserto” o “interactivo”) en el extremo amino terminal, que no se encuentra en otras subunidades α de las integrinas. Dicho dominio I es homólogo, entre otros, al dominio A encontrado en el factor von Willebrand y es crítico para la unión del ligando (Harris et al., 2000). La subunidad α_4 es el único miembro del tercer grupo de las subunidades α integrinas y consta de tres sitios de unión a cationes divalentes y un sitio distinto de corte para una proteasa (Diamond et al., 1994).

Los dominios citoplasmáticos de las subunidades α son cortos, entre 15 y 77 aminoácidos y, en general, no están muy relacionados por su secuencia, aunque están bien conservados entre las especies (Diamond et al., 1994). Sin embargo, un motivo de secuencia próximo a la membrana, GFFKR, es conservado entre todos los dominios citoplasmáticos y participa en la regulación del reconocimiento del ligando y en la asociación entre las subunidades α y β (Harris et al., 2000).

2.2. Subunidades β

La primera subunidad β secuenciada fue la de la β_1 integrina de pollo, deducida de estudios del ADNc clonado (Tamkum et al., 1986). La comparación entre secuencias de subunidades β en distintas especies (Lipscomb et al., 1999; Malek-Hedayat y Rome, 1995) pone de manifiesto que se trata de estructuras protéicas altamente conservadas que comparten una estructura básica: un dominio extracelular largo, de 675-700

aminoácidos, un único dominio transmembranario hidrofóbico y un corto dominio citoplasmático variable en longitud. Éste suele ser relativamente corto, 40-60 aminoácidos, excepto para la cadena o subunidad β_4 que tiene un dominio citoplasmático inusualmente largo de 1.000 residuos de aminoácidos (Hogervorst et al., 1990). El largo dominio extracelular de la subunidad β contiene una región altamente conservada cerca del extremo amino terminal con afinidad por el dominio I de las subunidades α , que es crítico para el reconocimiento del ligando, un dominio rico en cisteínas en el extremo carboxilo terminal y puentes disulfuro internos que contribuyen al mantenimiento de la estructura de la molécula (**Figura 3**).

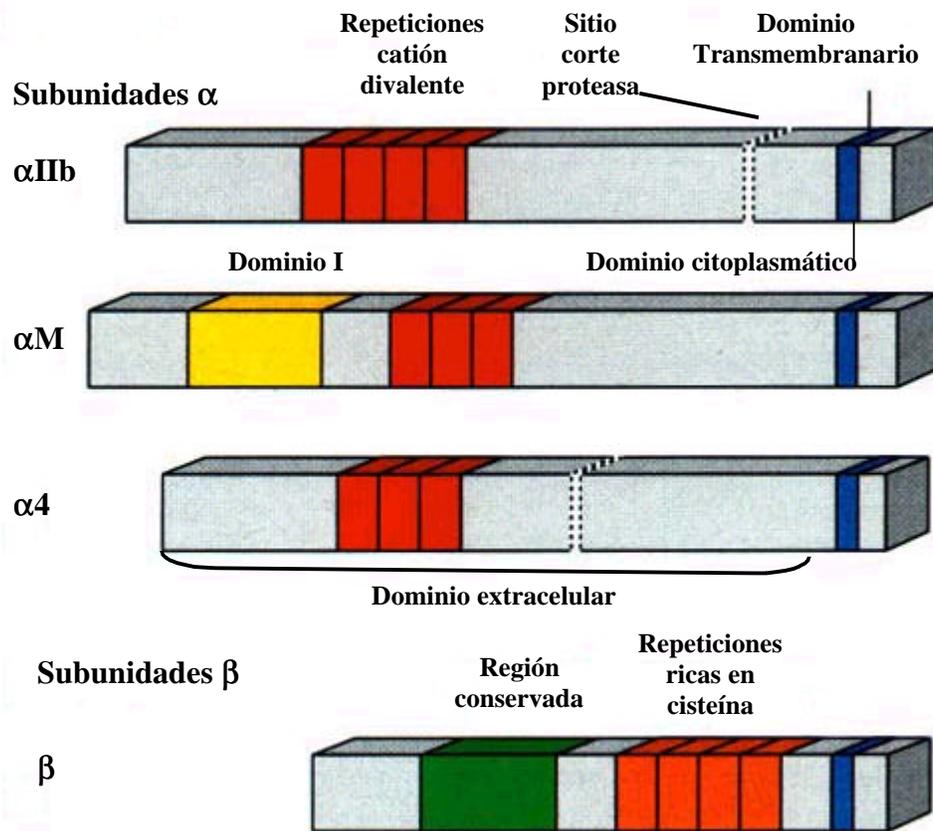


Figura 3: Representación esquemática de las subunidades α y β . Se muestran las estructuras de los ejemplos más representativos de las subunidades α y β .

Una característica específica de la subunidad β es que una parte del dominio intracelular o citoplasmático establece el anclaje de la integrina en la célula a través de la interacción con proteínas citoplasmáticas como la vinculina y la talina (BurrIDGE et al., 1988). Por consiguiente, el dominio citoplasmático de las subunidades β contiene

las secuencias implicadas en la señalización intracelular y las asociaciones con el citoesqueleto.

3. EL LIGANDO

Las integrinas se unen a diversos tipos de ligandos, incluyendo proteínas de la matriz celular, proteínas del plasma que son depositadas en sitios de heridas en la hemostasis (fibrinógeno) y la activación del complemento, y proteínas de membrana integrales. Muchas integrinas se unen a más de un ligando y más de uno de estos ligando se une a más de una integrina, usando el mismo o distinto sitio de reconocimiento (Hynes et al., 1992). La **Tabla I** resume los principales ligandos extracelulares de las integrinas, que incluyen un gran número de proteínas extracelulares de la matriz (proteínas de la matriz del hueso, colágenos, fibronectinas, fibrinógeno, lamininas, trombospondina, vitronectina y el factor de von Willebrand), lo que refleja la función primera de las integrinas en la adhesión celular a la matriz extracelular (Plow et al., 2000).

Otros muchos ligandos reflejan el papel de las integrinas en la mediación de las interacciones célula-célula (Ruoslahti y Pierschbacher, 1987). En este sentido, existen numerosos microorganismos que utilizan las integrinas para poder entrar dentro de las células. Por otro lado, hay conexiones múltiples y directas entre las integrinas y los sistemas de defensa, creadas por el reconocimiento de los factores hemostáticos y del complemento.

La preferencia de las integrinas por un ligando en concreto viene determinada por una afinidad relativa, la disponibilidad en un microambiente específico y el estado conformacional del ligando (Plow et al., 2000).

Los primeros análisis funcionales y estructurales de las integrinas han permitido definir las secuencias de reconocimiento del ligando mediante el empleo de péptidos deducidos de las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la matriz extracelular (Ruoslahti, 1996). Un ejemplo prototípico es la secuencia RGD (tripéptido formado por arginina-glicina-ácido aspártico-Arg-Gly-Asp-), identificada originalmente como el motivo aminoacídico de la fibronectina y que ahora se conoce como zona de reconocimiento de múltiples ligandos.

Otros estudios han demostrado que la especificidad en el reconocimiento del ligando por parte de la integrina está reducida a pequeñas secuencias pépticas que son determinantes para que las interacciones tengan lugar o no. Así, tan importante como la secuencia RGD es el contexto estructural en el que se encuentra y el tipo de residuos aminoacídicos que la flanquean (Haas y Plow, 1994). Finalmente, es necesario señalar

que los estudios de inhibición por péptidos han sido fundamentales para conocer el papel de las secuencias específicas en el reconocimiento del ligando por las integrinas (Plow et al., 2000).

Ligandos	Integrinas
Sialoproteína del hueso	$\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$
Molécula de adhesión L-1	$\alpha_v\beta_3$
<i>Candida albicans</i>	$\alpha_M\beta_2$
Colágenos	$\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_{11}\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_{10}\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$
Condroadherina	$\alpha_{10}\beta_1$
Citotactina/tenascina-C	$\alpha_8\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_6$
E cadherina	$\alpha_E\beta_7$
Factor X	$\alpha_M\beta_2$
Fibronectina	$\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$, $\alpha_{IIb}\beta_3$
Fibrinógeno	$\alpha_5\beta_1$, $\alpha_M\beta_2$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_X\beta_2$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_1$
iC3b	$\alpha_M\beta_2$, $\alpha_X\beta_2$
ICAM-1	$\alpha_L\beta_2$, $\alpha_M\beta_2$
ICAM-2,3,4,5	$\alpha_L\beta_2$, $\alpha_D\beta_2$
Invasina	$\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$.
Laminina	$\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_{10}\beta_1$
Metaloproteinasa-2	$\alpha_v\beta_3$
Factor inhibidor neutrófilo	$\alpha_M\beta_2$
Osteopontina	$\alpha_v\beta_3$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$
Factor +/- Plasminógeno	$\alpha_v\beta_3$
Fertilina	$\alpha_6\beta_1$
Trombospondina	$\alpha_3\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_4\beta_1$
VCAM-1	$\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$
Vinculina	$\alpha_{11}\beta_1$
Vitronectina	$\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_8\beta_1$
Factor von Willebrand	$\alpha_v\beta_3$, $\alpha_{IIb}\beta_3$

Tabla 1: Ligandos de las integrinas

4. LOS CATIONES DIVALENTES

Las integrinas son metaloproteínas y contienen de 3 a 5 sitios de unión para cationes divalentes de relativa baja afinidad. Entre las integrinas hay al menos dos clases de motivos, distintos estructuralmente, para la unión iónica. En las subunidades α están presentes los motivos homólogos a la estructura *EF-hand*, serie de cuatro

dominios de secuencias repetidas (Tuckwell et al., 1992) y los motivos de adhesión dependiente de un metal iónico (MIDAS) (Michishita et al., 1993). Por su parte, las subunidades β pueden contener un sitio de unión iónico homólogo al motivo MIDAS (Loftus et al., 1990).

La unión de los cationes ejerce efectos transcendentales en la función de la integrina. Los cationes divalentes unidos pueden actuar como efectores, promocionando la unión al ligando, como antagonistas, inhibiendo la unión, y como selectores, modificando la especificidad de dicha unión. La influencia de los cationes divalentes en la función de la integrina se explica por el hecho de que tanto el ligando como los iones comparten una región de unión común en la integrina (D'Souza et al., 1994).

Sin embargo, a pesar de la importancia de los iones divalentes en la adhesión celular y en la unión del ligando, en la actualidad se dispone de una limitada información acerca del papel fisiológico que representan y ello, a pesar de que su participación en procesos tan importantes como la reabsorción de los osteoclastos por el hueso (Ross et al., 1993) y la cicatrización de las (Grzesiak et al., 1995) ha sido claramente evidenciada.

5. LA UNIÓN AL LIGANDO

Dentro de las integrinas, la unión al ligando se puede establecer de dos formas distintas: mediante el dominio I, como en las β_2 integrinas o sin él, como en las β_3 integrinas.

El dominio I consta de cinco zonas de plegamiento β rodeadas por 5-6 α hélices interconectadas por lazos flexibles (Emsley et al., 1997), que contienen el motivo de unión catiónica MIDAS (**Figura 4**). El dominio I está altamente conservado en todas las subunidades α de las integrinas (Dickeson et al., 1998), si bien los distintos dominios I, a pesar de este grado de conservación, son altamente selectivos para grupos particulares de ligandos: un solo dominio I puede reconocer múltiples ligandos sin relación estructural.

Aunque los dominios I rigen las funciones de unión al ligando de las integrinas, otras regiones de las subunidades α influyen en su reconocimiento, como la secuencias GFFKR que participan en la regulación de la interacción (Harris et al., 2000) (**Figura 4**) y las regiones *EF-hand* que contribuyen al reconocimiento del ligando (Dickeson et al., 1997). También existen otros dominios en algunas subunidades α involucrados en la

unión de ligandos no proteicos cuya ocupación puede modular la función del dominio I (Vetvicka et al., 1996).

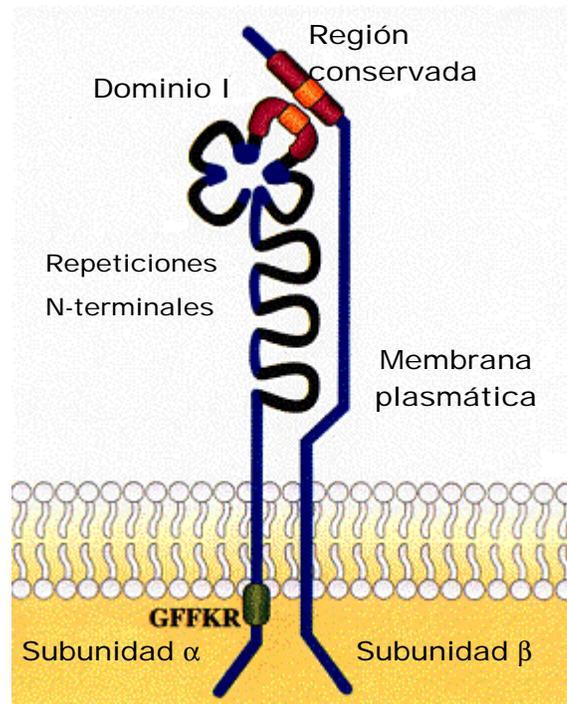


Figura 4: Estructura del heterodímero $\alpha\beta$ con los dominios y regiones más significativos involucrados en la unión al ligando. Los motivos MIDAS se señalan en naranja.

La unión del ligando entre integrinas sin el dominio I se ha estudiado en la $\alpha_{IIb}\beta_3$ y muchos de los avances obtenidos han sido extrapolados a otras integrinas, como las β_1 integrinas.

De esta manera, estudios de mapeo epitópico con anticuerpos monoclonales inhibidores, las digestiones enzimáticas de $\alpha_{IIb}\beta_3$, la expresión de sus formas recombinantes, así como los estudios de reactividad cruzada han demostrado la existencia de puntos de contacto del ligando con segmentos del extremo N-terminal de la subunidades α_{IIb} (D'Souza et al., 1990) y β_3 (Santoro et al., 1987), evidenciando que ambas subunidades participan en la interacción. Los residuos esenciales identificados en ambas subunidades se agrupan en dos regiones. La primera es un segmento altamente conservado en todas las subunidades β , que participa en la formación de motivo MIDAS (Lee et al., 1995), que está constituido por unos 300 aminoácidos y que engloba la región específica a ligandos RGD y la región de unión a la cadena γ del fibrinógeno en la β_3 . La segunda región está representada por las 7 repeticiones del extremo N-terminal que forman el dominio β -hélice de α_{IIb} (**Figura 4**).

La implicación en la unión del ligando de ambos tipos de dominios plantea dos cuestiones importantes. Por una parte, cómo los cambios conformacionales que sufre la integrina durante la activación y la unión al ligando afectan a dichos dominios y, por otra, la forma en que las subunidades α_{IIb} y β_3 se unen para establecer una base estructural para la unión del ligando al receptor $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$.

6. LAS INTEGRINAS COMO RECEPTORES DE SEÑALIZACIÓN

Las integrinas fueron identificadas originalmente por sus propiedades adhesivas, sin embargo, múltiples evidencias han puesto de manifiesto que también actúan como receptores de señalización, entendido el término señalización como la capacidad de estos receptores de transmitir información en ambas direcciones a través de la membrana plasmática (Shattil et al., 1997). De esta manera, es conocido que las células regulan la unión de la integrina a su ligando a través de un proceso conocido como señalización intracelular (*inside-out signaling*) o activación de la integrina, mientras que como señalización extracelular (*outside-in signaling*) se conoce a la cascada de reacciones que se generan hacia el interior de la célula como consecuencia de la unión del ligando a la integrina (**Figura 5**).

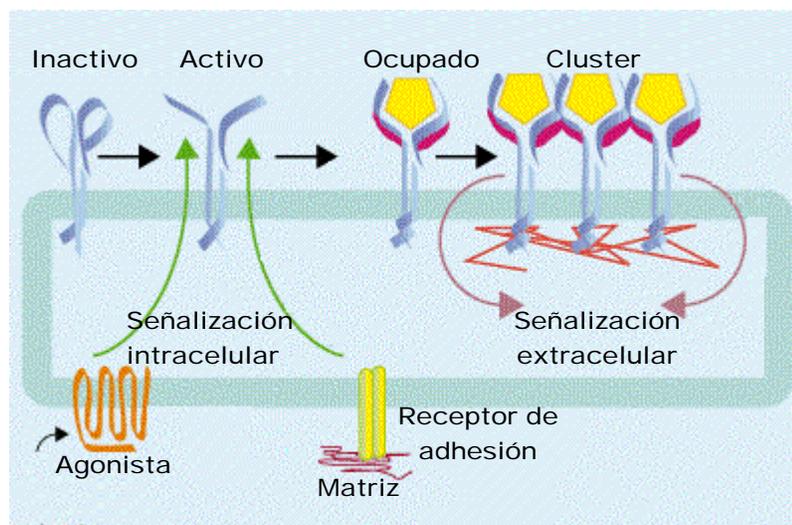


Figura 5: Señalización de las integrinas.

Las integrinas se constituyen por tanto en los puentes de unión entre el interior y el exterior celular, siendo una de sus funciones la adaptación de las células al ambiente que las rodea (por ejemplo, el mantenimiento de la integridad espacial y la organización de la monocapa del endotelio) (Humphries, 2000) y el movimiento celular

conseguido por la transducción de la señal a través de la integrina desde el ligando al citoesqueleto, generando así tracción entre la célula y sus alrededores (Schoenwaelder et al, 1999). Por otro lado, la acumulación en el citoplasma de moléculas de señalización dependientes de integrinas y los cambios en el flujo de la señal al parecer podrían estar relacionados con modificaciones en los patrones de expresión de los genes (Yamada et al., 1995). Actualmente, los mecanismos moleculares involucrados en este proceso son desconocidos, aunque se supone que es el dominio citoplasmático de la integrina, inducido por la interacción del ligando el que inicia esta respuesta de señalización.

En las células estacionarias, muchos de estos procesos pueden estar en estado inactivo, mientras que en las células migratorias, las interacciones adhesivas son altamente dinámicas y los mecanismos para la desorganización de los contactos adhesivos y el reciclado de las integrinas previstas están en uso constante (Sheetz et al., 1998).

Una cuestión clave es qué moléculas se unen a las integrinas como iniciadores críticos de la señalización y cómo determinan la eficacia de unión. Diferentes estudios, que incluyen cromatografía de afinidad, inmunoprecipitación, unión de péptidos sintéticos y análisis de hibridación, han sido llevados a cabo para identificar las moléculas que se unen a las integrinas, pero queda sin esclarecer cuales de estas moléculas participan inicialmente en la respuesta de señalización. Actualmente, algunos estudios han puesto de manifiesto que muchas de las rutas de señalización mejor caracterizadas incluyen las quinasas proteicas, quinasas lipídicas, tirosinas quinasas, los nucleótidos cíclicos y el flujo de iones (Dedhar, 1999). También se ha demostrado que los componentes del citoesqueleto (incluyendo talina, α -actinina y laminina), los adaptadores de señalización (paxilina, β_3 -endonexina, calreticulina y citoadhesina-1) y las quinasas (integrina quinasa y quinasa de la adhesión focal) unidas a los dominios citoplasmáticos de la integrinas, así como otras moléculas (como CD9, CD47 y CD98) interactúan en la señalización (Humphries, 2000).

7. CD 29 O β_1 INTEGRINA

7.1. La familia de las β_1 integrinas

Esta familia de integrinas está constituida por doce heterodímeros $\alpha\beta$ que comparten CD29 o β_1 como subunidad β . Sin embargo, constituyen moléculas distintas y presentan diferentes propiedades y características.

Las β_1 integrinas están ampliamente distribuidas, siendo predominantemente receptores de moléculas de la matriz extracelular como fibronectina, colágeno, vitronectina y laminina, si bien $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4, CD49d/CD29) es también receptor para VCAM-1 o CD (Tabla 1).

La familia de las β_1 integrinas también es conocida como familia VLA (Very Late Antigens), debido a que sus primeros miembros fueron originalmente definidos como heterodímeros que aparecían 2-4 semanas después de la activación *in vitro* de las células T (Hemler, 1988). Sin embargo, la expresión de estas estructuras no está restringida a los linfocitos, ya que casi todos los tipos celulares, a excepción de los glóbulos rojos y granulocitos, expresan uno o más de un miembro de las β_1 integrinas.

A pesar de que las moléculas de la familia de las β_1 integrinas son reconocidas con diferentes nomenclaturas (CD/CD29; VLA; $\alpha\beta_1$), la nomenclatura $\alpha\beta$ es la más aplicada. Por otro lado, debido a su amplia distribución en diferentes tipos celulares, las funciones de estas moléculas son claramente no específicas del sistema inmune.

7.2. Funciones de la familia β_1 integrina

Al igual que el resto de integrinas, la familia β_1 integrina está involucrada en procesos de adhesión y migración celular, siendo también responsable de la transducción de señales (Cervella, 1993). En muchos tipos celulares la expresión del gen β_1 es constitutiva, reflejando las múltiples funciones mediadas por estos receptores.

A continuación se detallan las funciones fisiológicas y patológicas específicas más relevantes de cada uno de los miembros de esta familia.

7.3. $\alpha_1\beta_1$ (VLA-1, CD49a/CD29)

Fue uno de los primeros miembros de la familia β_1 identificado. Dicha integrina es receptor de la laminina y los colágenos I, II y IV (Tabla 1), mediando la unión celular a dichos ligandos (Senger et al., 1997).

Su expresión no está restringida a células del sistema inmune ya que se expresa abundantemente en líneas celulares de neuroblastoma (Li et al., 2000), en fibroblastos de la piel, en células mesangiales y endoteliales de los riñones, en células sinusoides del hígado y en algunos otros tipos celulares, entre los que podemos incluir los condrocitos (Ohno et al., 1999), las células del músculo liso (Wang et al., 1998), hepatocitos (Kocken et al., 1997) y células neuronales (Li et al., 2000).

La presencia en estos tipos celulares y tejidos demuestra la función de adhesión de esta integrina; sin embargo, las moléculas de la matriz extracelular que interactúan con este receptor no han sido completamente identificadas (Ohno et al., 1999).

7.4. $\alpha_2\beta_1$ (VLA-2, CD49b/CD29)

La integrina $\alpha_2\beta_1$ es un receptor para el colágeno I y la laminina (**Tabla 1**), reconociendo sitios distintos del colágeno que la integrina $\alpha_1\beta_1$ (Wang et al., 1998). Originalmente fue caracterizado como un antígeno tardío en las células T activadas, sin embargo, hoy día es reconocido como un importante receptor del colágeno en plaquetas (Kunicki et al., 1993). También conocida como GPIa/IIa, esta integrina está presente en muchas de las células en las que se expresa $\alpha_1\beta_1$ (células T inactivadas, células de leucemia T, fibroblastos, células del neuroblastoma, etc). Sin embargo, ambas integrinas presentan una expresión independiente, ya que en muchos tipos celulares en los que se expresa $\alpha_2\beta_1$ no lo hace $\alpha_1\beta_1$ (plaquetas, por ejemplo) y a la inversa. En el riñón se localiza en el endotelio glomerular, túbulos distales y colectores (Kreidberg y Symons, 2000) y también se ha localizado en tumores primarios de pulmón humano (Senger et al., 1997).

7.5. $\alpha_3\beta_1$ (VLA-3, CD49c/CD29)

La $\alpha_3\beta_1$ es un miembro enigmático de la familia de las integrinas, por atribuírsele desde ligandos restrictivos a una gran variedad de ellos. Fue originalmente identificado como receptor para el colágeno (tipos I y VI), laminina-1 y fibronectina (**Tabla 1**), basándose en ensayos de adhesión celular y unión en columnas de afinidad de extractos de proteínas de membrana (Dedhar, 1992). Estudios recientes muestran, sin embargo, que los ligandos preferidos por dicha integrina son las lamininas 5, 10 y 11 (Delwel, 1994), y que en ciertos tipos celulares puede serlo la trombospondina-1 (Guo et al., 2000).

Esta integrina tiene un papel vital en la formación de varios órganos. En la epidermis está presente en la membrana basal de los queratinocitos y las funciones de $\alpha_3\beta_1$ en la piel son vitales para el desarrollo de la epidermis y la cicatrización de heridas, estando ambos procesos involucrados en la migración y diferenciación de los queratinocitos basales en contacto con la ECM (Goldfinger et al., 1999). En el riñón presenta una expresión abundante, siendo posiblemente la única integrina que se expresa en los podocitos glomerulares, expresándose con $\alpha_2\beta_1$ y $\alpha_6\beta_1$ en los conductos

colectores (Kreidberg et al., 1996). Esta integrina también se expresa en el desarrollo del sistema nervioso, encontrándose en las neuronas, representado también una función importante en la organización de la lámina propia del córtex (Anton et al., 1999).

7.6. $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4, CD49d/CD29)

Este miembro de la familia β_1 integrina ha sido involucrado en la adhesión de linfocitos (van Kooyk et al., 1993), monocitos (Jonjic et al., 1992), eosinófilos, basófilos (Schleimer et al., 1992) y células NK (Allavena et al., 1991) adheridas a células endoteliales activadas por las citoquinas.

La expresión de $\alpha_4\beta_1$ es alta en las células del sistema hematopoyético, siendo baja o ausente en muchas células adherentes (Hemler, 1990). Entre los leucocitos hay una expresión diferenciada de esta integrina siendo mayor su expresión en los linfocitos B y T en reposo.

Los ligandos para $\alpha_4\beta_1$ incluyen las proteínas de la matriz extracelular VCAM-1 (Elices, 1990), fibronectina (Sánchez-Aparicio, 1993) y trombospondina (Yabkowitz et al., 1993) (**Tabla 1**), y la invasina, una proteína involucrada en la entrada de bacterias dentro de células eucarióticas (Ennis et al., 1993).

7.7. $\alpha_5\beta_1$ (VLA-5, CD49e/CD29)

La integrina $\alpha_5\beta_1$ es el mayor receptor de la fibronectina, siendo este reconocimiento importante para el control de la morfogénesis y la organogénesis (Darribère et al., 1990). Además, también reconoce a la invasina (como $\alpha_4\beta_1$) y al fibrinógeno (**Tabla 1**).

Su expresión en células endoteliales permite la adhesión de sus ligandos a las proteínas de la ECM. En los leucocitos polimorfonucleares media los mecanismos de migración a través de los fibroblastos del pulmón (Shang et al., 1997) y en los linfocitos-T está involucrada en la migración al sistema extravascular a través de la fibronectina (Hauzenberger et al., 1994). La expresión de esta integrina está también descrita en el páncreas de distintas especies (hámster, canina, porcina y humana) (Wang et al., 1999).

7.8. $\alpha_6\beta_1$ (VLA-6, CD49f/CD29)

La integrina $\alpha_6\beta_1$ es un receptor bien conocido de la laminina-1. Además, se une también a la invasina y la fertilina, una proteína de la superficie del espermatozoide (Tabla 1). Como se ha observado en las especies humana y murina, la unión de este último ligando con la integrina $\alpha_6\beta_1$ en la superficie del huevo es directa y media la fusión del espermatozoide con el huevo (Chen et al., 1998; Chen et al., 2000).

Se han descrito dos isoformas de integrina $\alpha_6\beta_1$ en el sistema embrionario murino, $\alpha_6\beta_1$ A y $\alpha_6\beta_1$ B. Ambas isoformas tienen una expresión diferente: la integrina $\alpha_6\beta_1$ A se encuentra en líneas diferenciadas mientras que la integrina $\alpha_6\beta_1$ B en células no diferenciadas, totipotentes.

Dicha integrina se expresa en las células nerviosas, linfocitos, macrófagos, fibroblastos, plaquetas y otros tipos celulares (Cooper et al., 1991), como por ejemplo en los podocitos y células epiteliales tubulares del riñón (Kreidberg y Symons, 2000), y en muchas células epiteliales embrionarias (Ekblom, 1996).

7.9. $\alpha_7\beta_1$ (VLA-7, CD49g/CD29)

Dentro de la familia de las integrinas, hay dos grupos de receptores que se unen a la laminina. Esta integrina, junto con los heterodímeros $\alpha_3\beta_1$ y $\alpha_6\beta_1$ forma uno de estos grupos (Collo et al., 1993) (Tabla 1).

El receptor $\alpha_7\beta_1$ fue descrito por estar involucrado en la diferenciación miogénica. Esta integrina presenta dos isoformas (A y B) con una expresión diferente: la isoforma B se localiza en todos los tipos de tejidos y células analizados, incluyendo músculo esquelético y miocardio, mientras que la isoforma A se detecta exclusivamente en músculo esquelético (Collo et al., 1993). También ha sido descrito dicho receptor en células de melanoma y no en melanocitos normales, sugiriendo que de esta integrina puede estar asociada con transformaciones malignas (Kramer et al., 1991).

7.10. $\alpha_8\beta_1$ (VLA-8, CD49h/CD29)

La subunidad α_8 de la integrina fue originalmente identificada por Bossy et al (1991) en el sistema nervioso embrionario de pollo, junto con la subunidad β_1 . También se ha clonado e identificado en humano, determinando su distribución tisular en tejidos adultos de mamíferos (Schnapp et al., 1995), expresándose predominantemente en

células vasculares y viscerales del músculo liso, otras células contráctiles, células nerviosas embrionicas, células mesangiales del riñón y miofibroblastos del pulmón.

Esta integrina se puede unir a la tenascina, fibronectina y vitronectina interaccionando con los sitios RGD de esos ligandos (**Tabla 1**). En fibroblastos y células del músculo liso se une a la fibronectina y vitronectina, involucrándose en la respuesta a la inflamación y a las heridas. Así, $\alpha_8\beta_1$ puede contribuir a los cambios funcionales que ocurren en el músculo liso durante la reparación del tejido (Schnapp et al., 1995).

7.11. $\alpha_9\beta_1$ (VLA-9, CD49i/CD29)

Esta integrina es un receptor ampliamente distribuido tanto para el colágeno y la laminina, como para la tenascina y la osteoponina (Smith et al., 1996), pudiendo tener ligandos adicionales no identificados aún (**Tabla 1**).

Gracias a la inmunoprecipitación se ha estudiado la distribución tisular de esta integrina localizándose en el epitelio, la membrana basal del epitelio escamoso, en músculo liso y esquelético, así como en hepatocitos (Palmer et al., 1993) y células cancerígenas, como carcinoma mamario y otras líneas celulares (Arihiro et al., 2000).

7.12. $\alpha_{10}\beta_1$ (VLA-10, CD49j/CD29)

Esta β_1 integrina ha sido descrita como receptor del colágeno tipo II, sin embargo la laminina y la condroadherina parecen ser también sus ligandos (Camper et al., 1998).

Se ha descrito su distribución en un gran número de tejidos, pero al parecer su expresión se localiza preferentemente en músculo y corazón (Lehnert et al., 1999).

7.13. $\alpha_{11}\beta_1$ (VLA-11, CD49k/CD29)

Se trata de un receptor del colágeno I y la vinculina, molécula relacionada con los contactos focales del colágeno tipo I (**Tabla 1**).

Su distribución tisular ha sido estudiada mediante Northern blotting, encontrándose niveles altos de expresión en útero humano y corazón, niveles intermedios en músculo liso y niveles de expresión bajos en otros tejidos no musculares, tales como el páncreas, el riñón y la placenta (Velling et al., 1999).

7.14. $\alpha_v\beta_1$ (VLA-V, CD/CD29)

Como receptores de esta integrina han sido identificados la fibronectina, la vitronectina, el fibrinógeno y la osteopontina (Vogel et al. 1990; Bodary et al. 1990) (**Tabla 1**).

En cuanto a la distribución tisular, se puede encontrar en la superficie de los oocitos de distintas especies, donde interactúan con el ligando en la membrana plasmática del espermatozoide durante la fertilización (Linfor et al., 2000), o en precursores de oligodendrocitos, jugando un papel en la migración celular (Milner et al., 1996).

8. CD61 O β_3 INTEGRINA

8.1. La familia de las β_3 integrinas

La familia de las β_3 integrinas o citoadhesinas comprende dos receptores de adhesión heterodiméricos, $\alpha_{IIb}\beta_3$ (glicoproteína IIbIIIa, CD41/CD61) y $\alpha_v\beta_3$ (CD51/CD61) (Hynes, 1992), que están implicados en una amplia variedad de funciones fisiológicas y patológicas importantes. Estas dos integrinas comparten la misma subunidad β_3 y las dos subunidades α (α_v y α_{IIb}) presentan una identidad en su secuencia aminoacídica del 36% (Suehiro et al., 1996).

$\alpha_{IIb}\beta_3$ se expresa sólo en plaquetas y megacariocitos, siendo esencial para la agregación plaquetaria, controlando la función de este tipo celular en la trombosis y la hemostasis (Kieffer y Phillips, 1990; Du y Ginsberg, 1997).

$\alpha_v\beta_3$ está expresada en muchos tipos celulares, incluyendo plaquetas, osteoclastos, fibroblastos, melanomas, células endoteliales (Hodivala-Dilke et al., 1998), astrocitos (Leyton et al., 2001), macrófagos, leucocitos polimorfonucleares (Berton y Lowell, 1999), timocitos, esplenocitos, células de la médula ósea (Gerber et al., 1996), condrocitos (Loeser, 2000) y células placentarias (Villa-García et al., 1994), donde influye en la migración celular con sus consecuencias en la angiogénesis, restenosis, invasión de células tumorales y arterioesclerosis, entre otras (Suehiro et al., 1996).

Funcionalmente, estas integrinas se diferencian en la especificidad por su ligando y por su sensibilidad a los cationes divalentes (D'Souza et al., 1994). En efecto, la unión al ligando de estas integrinas está regulada de forma diferencial por los cationes divalentes. Así pues, en presencia de Ca^{2+} , el fibrinógeno no se une al receptor

$\alpha_V\beta_3$, pero sí lo hace al receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$, mientras que ambos receptores unen a dicho ligando en presencia de Mn^{2+} . Esto sugiere que la unión al ligando está regulada también por un mecanismo con dos sitios de unión catiónica (Smith et al., 1994).

Las similitudes estructurales y funcionales entre las integrinas $\alpha_V\beta_3$ y $\alpha_{IIb}\beta_3$ sugieren que son proteínas de membrana homólogas con un origen evolutivo común (Fernández-Ruiz et al, 1993).

8.2. $\alpha_{IIb}\beta_3$

El receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$, conocido también como CD41/ CD61 o GPIIb/IIIa, es un heterodímero dependiente de Ca^{2+} . Durante mucho tiempo se consideró que esta molécula estaba expresada exclusivamente en plaquetas y sus precursores celulares, los megacariocitos. Sin embargo, recientes estudios han permitido identificar el receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ en células mieloides, así como en algunas células tumorales, como melanomas y células de adenocarcinoma de próstata (Plow y Byzova, 1999; Chen et al., 1997).

Debido a su importante papel en la agregación plaquetaria, con sus consecuencias en la trombosis y el mantenimiento de la homeostasis, $\alpha_{IIb}\beta_3$ es una de las integrinas más estudiadas, y este hecho ha permitido poner de manifiesto otras funciones en las que juega un papel importante, como por ejemplo en la progresión de tumores mediante la adhesión celular y la invasión a través del fibrinógeno (Chen et al., 1997; Wall et al., 1997) y en la regulación de la proliferación y diferenciación de las células mieloides en la médula ósea junto con otras integrinas (Wall et al., 1997)

Cada una de la subunidades que componen el heterodímero es polimórfica y altamente inmunogénica y por ello, en humano, los aloantígenos caracterizados de esta glucoproteína son clínicamente importantes en los procesos de transfusión y en el tratamiento de enfermedades coronarias (Weiss et al., 1996).

Las alteraciones a nivel molecular del receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ pueden provocar distintos desórdenes y enfermedades. El primer desorden en el que fue involucrada esta integrina fue la trombastenia de Glazmann, un raro desorden hemorrágico hereditario resultante de cambios cualitativos o cuantitativos en las subunidades α_{IIb} o β_3 (Hodivala-Dilke et al., 1999). También ha sido observada una expresión anormal de esta glucoproteína en pacientes con diabetes mellitus (Tschoepe et al., 1990), al presentarse en mayor número este receptor en las plaquetas de pacientes diabéticos que en sanos (Tschoepe et al., 1990). Otro ejemplo, de los múltiples en los que se ve involucrado este receptor, se encuentra una insuficiencia renal crónica, caracterizada por una agregación anormal de las plaquetas (Kozek-Langenecker et al., 1999). La identificación de los defectos

genéticos responsables de dichas enfermedades ha sido posible con la caracterización molecular de las subunidades α_{IIb} y β_3 .

8.3. $\alpha_V\beta_3$

El receptor $\alpha_V\beta_3$, también conocido como CD51/CD61 o receptor de la vitronectina, es el segundo miembro de las β_3 integrinas.

A pesar de que aún no se disponen de suficiente información acerca del papel fisiológico de esta integrina, los estudios llevados a cabo hasta el momento han puesto de manifiesto su gran diversidad funcional, así como sus implicaciones en varias condiciones patológicas.

Así, esta integrina interviene en el mecanismo de reabsorción del hueso al interactuar con distintos componentes de la matriz extracelular, como la vitronectina y la osteopontina (Rodan y Rodan, 1997). También está involucrada en la regulación de la homeostasis vascular, al interactuar con la protombina en células endoteliales y de músculo liso, requiriendo su activación para dicho proceso (Byzova y Plow, 1998). El receptor $\alpha_V\beta_3$ conduce a la angiogénesis en embriones y tumores de melanoma por regular la apoptosis endotelial suprimiendo la actividad p53 (Singh et al., 2001), confirmándose estos resultados mediante estudios con péptidos sintéticos y anticuerpos monoclonales específicos para esta integrina. Datos recientes indican que la unión de la vitronectina con este receptor participa en la activación de tirosina-quinasa que median la señalización celular e inducen un rápido incremento en la permeabilidad microvascular del pulmón (Singh et al., 2001).

La $\alpha_V\beta_3$ es también un receptor celular para adenovirus, hantavirus y aftovirus, como el virus de la fiebre aftosa (Neff y Baxt, 2001; Singh et al., 2001) y el virus de la fiebre vesicular del cerdo (Jiménez-Clavero et al., 2000).

Entre las patologías más significativas en las que se ve involucrada esta molécula de adhesión se encuentran el cáncer, participando principalmente en la angiogénesis y la neoplasia (Eliceiri y Cheresch, 2000; Castel et al., 2000), la psoriasis, observándose un incremento de la expresión de este receptor (Creamer et al., 1995), la artritis reumatoide, detectándose su presencia en la sinovia reumática (Furuzawa-Carballeda y Alcocer-Varela, 2000) y la infertilidad en mujeres con endometriosis (Lang, 2000), en la cual sirve como biomarcador.

9. EL PAPEL DE LAS INTEGRINAS β_1 Y β_3 EN EL XENOTRANSPLANTE

El xenotransplante consiste en el transplante de órganos o tejidos entre miembros de diferentes especies. El interés clínico y científico en este campo se ha incrementado notablemente debido, entre otras causas, al incremento en el éxito de los trasplantes alogénicos (trasplantes de órganos o tejidos entre individuos no idénticos genéticamente, pero pertenecientes a la misma especie) y al hecho de que el suministro de órganos humanos es inadecuado para el número de pacientes que se pueden beneficiar de este tipo de terapia. Esto ha motivado a la comunidad científica a buscar una alternativa en el xenotransplante (Platt y Bach, 1991).

Actualmente el cerdo se intenta emplear como donante de órganos en xenotransplantes humanos en sustitución de los primates, en los que, por su mayor semejanza con el hombre el riesgo de transmisión de enfermedades letales víricas es mayor, así como también lo son su coste económico y las consideraciones éticas que se derivan de su empleo.

Un problema asociado a los xenotransplantes cerdo-humano, que limitaría en gran medida su realización a gran escala, es el rechazo hiperagudo. Este rechazo es debido a la existencia de anticuerpos naturales en el suero humano que reaccionan con antígenos presentes en el endotelio vascular porcino, y que provocan el rechazo del órgano transplantado en un breve periodo de tiempo (Joziase y Oriol, 1999). Muchos de estos anticuerpos naturales del suero humano actúan frente al epítipo carbohidratado Gal- α -(1,3)-Gal (2 restos de galactosa unidos mediante un enlace α -1,3), presente como molécula de glucosilación en las integrinas (Richard et al., 1998).

Holzknacht y Platt (1995) han señalado que las integrinas glucoprotéicas α_1 , α_v , α_3 , α_5 , β_1 y β_3 son, junto con el factor de von Willebrand, las dianas principales de los anticuerpos humanos naturales en las células endoteliales porcinas, y ello como consecuencia de ser estructuras abundantemente N-galactosiladas, presentando epítopos en disposiciones tridimensionales especialmente favorables para la unión de los anticuerpos xenorreactivos.

Entre los distintos miembros de las integrinas, aparentemente las subunidades β_1 y β_3 porcinas son las mejor reconocidas por anticuerpos anti-Gal- α -(1,3)-Gal humanos (Holzknacht y Platt, 1995; Thibaudeau et al., 1996). Sin embargo, como consecuencia de que no todas las glucoproteínas endoteliales están igualmente α -galactosiladas, algunos autores han puesto de manifiesto mediante ensayos de Western blot a partir de lisados de células endoteliales que, entre las integrinas, es la subunidad

β_1 integrina la reconocida de manera más eficiente por los anticuerpos naturales humanos (Richard et al., 1998).

10. EL PAPEL DE LAS INTEGRINAS β_1 Y β_3 EN EL CÁNCER

La falta de adhesión entre las células puede provocar distintos desórdenes entre los que se incluye el cáncer (Horwitz, 1997). Las principales moléculas de adhesión implicadas en estos desórdenes son las integrinas, interviniendo en gran número de procesos celulares que afectan al desarrollo de los tumores: la regulación de la proliferación y apoptosis, la motilidad celular e invasión y la angiogénesis (Varner y Cheresh, 1996). Particularmente β_1 y β_3 son dos de las integrinas más involucradas en este tipo de procesos, al estar alterada su expresión en muchos tipos celulares cancerígenos: melanomas (Kramer et al., 1991; Castel et al., 2000), carcinomas pulmonares (Koukoulis et al., 1997), leucemia mielode (Käfer et al., 1999), cáncer colorectal (Fujita et al., 1995) y neuroblastoma (Bonfoco et al., 2000), entre otros.

El proceso de angiogénesis intratumoral, formación de nuevos vasos sanguíneos en el seno del tumor, se debe 1) a la secreción de factores angiogénicos que provocan cambios en el comportamiento del endotelio vascular, en el que se observa un aumento del 400% en la expresión de las integrinas $\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_2\beta_1$ en las células endoteliales, lo que favorece su migración (Senger et al., 1997) y 2) a una participación activa de la integrina $\alpha_v\beta_3$ tanto en la angiogénesis como en el crecimiento tumoral (Castel et al., 2000; Eliceiri y Cheresh, 2000).

En el proceso de la metástasis, desprendimiento y movimiento de las células tumorales a partir del tumor primario (carcinomas de pulmón, mama, colon, páncreas y piel) está involucrado un gran repertorio de integrinas. En estudios de tumores invasivos los resultados han sido heterogéneos pero, en todos los casos, se ha observado una disminución o nulidad de expresión en las integrinas que se unen al colágeno o laminina, entre ellas $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ y $\alpha_3\beta_1$ (Huang et al., 1997; Koukoulis et al., 1997); mientras que, $\alpha_v\beta_3$, que se expresa pobremente en tumores benignos, tiene una alta expresión en la metástasis (Castel et al., 2000).

Por otra parte, la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ está involucrada en la interacción de las células tumorales con las plaquetas al favorecer la unión heterotípica entre ambos tipos celulares, observándose además que la adhesión de células tumorales a la matriz extracelular es estimulada por la presencia de estas células sanguíneas (Velasco-Velázquez et al., 1999).

La adhesión de la célula tumoral al endotelio vascular está mediada por moléculas con la suficiente afinidad como para permitir una adhesión fuerte y una posterior extravasación. Entre estas moléculas está la integrina $\alpha_v\beta_3$ con una expresión muy alta en tumores malignos (Varner y Cheresch, 1996). Otra molécula implicada es la integrina $\alpha_4\beta_1$, encontrándose correlación entre el aumento en su expresión y la capacidad metastática de melanomas malignos (hasta un 40%). La última integrina involucrada, por ahora, en este proceso es $\alpha_6\beta_1$, como consecuencia de su expresión en la mayoría de los vasos sanguíneos y de que su ligando, la laminina, interacciona con células cancerígenas (Vink et al., 1993).

Etapa del proceso metastático	Cambio en la expresión de integrinas	Consecuencia del cambio en la expresión
Angiogénesis	En células del endotelio vascular: $\uparrow\alpha_1\beta_1, \alpha_2\beta_1$ y $\alpha_v\beta_3$	Aumento de la capacidad migratoria a través de tejido conectivo
Desprendimiento y movimiento a partir del tumor primario	En células tumorales: $\downarrow\alpha_2\beta_1$ y $\alpha_3\beta_1$ $\uparrow\alpha_6\beta_4$ y $\alpha_v\beta_3$	Menor afinidad por la lámina basal Aumento de la capacidad migratoria a través de tejido conectivo I
Interacción de células tumorales con plaquetas	En células tumorales: $\uparrow\alpha_{IIb}\beta_3$	Se facilita la formación de microtrombos alrededor de la célula tumoral
Adhesión al endotelio vascular	En células tumorales: $\uparrow\alpha_4\beta_1, \alpha_6\beta_1$ y $\alpha_v\beta_3$	Se favorece la extravasación
Crecimiento tumoral y supresión de la apoptosis	En células tumorales: $\downarrow\alpha_5\beta_1$ $\uparrow\alpha_v\beta_3$	Supresión de la apoptosis dependiente de adhesión

Simbología: \uparrow = Aumento en la expresión. \downarrow = Disminución en la expresión

Tabla 2. Consecuencias de los cambios en la expresión de las integrinas durante el proceso de metástasis

Debe por último señalarse que modificaciones en la expresión de las integrinas pueden alterar la proliferación celular y suprimir la apoptosis favoreciendo, en ambos casos, el crecimiento tumoral. En este sentido la expresión del receptor de la fibronectina ($\alpha_5\beta_1$) está disminuida en células tumorales, lo que favorece la proliferación celular (Varner y Cheresch, 1996). Por otro lado, la disrupción de las interacciones de la integrina $\alpha_v\beta_3$ promueve la apoptosis de células de carcinoma de colon y de melanoma (Velasco-Velázquez et al., 1999).

En la **Tabla 2** se resume la participación de las integrinas en la formación de metástasis, al igual que algunas de las posibles consecuencias conocidas por el momento del cambio en su expresión.

11. EL PAPEL DE LAS INTEGRINAS β_1 Y β_3 EN LA TERAPIA GÉNICA

Las subunidades β_1 y β_3 además de su función celular, son utilizados como vectores de entrada por muchos microorganismos patógenos, al igual que, en general, todas las moléculas de adhesión celular. Entre los organismos que utilizan a las integrinas como mediadores para su entrada, se encuentran *Yersinia pseudotuberculosis*, adenovirus, hantavirus y aftovirus, entre otros. El descubrimiento del uso de las moléculas de adhesión para la unión y la internalización de patógenos de forma natural ha sido estudiado con el fin de estimar su empleo como vectores de transferencia de sistemas génicos y medicamentos. El desarrollo de la efectividad clínica de esta terapia génica dependerá de la utilización de los vectores adecuados capaces de conducir genes terapéuticos a tejidos enfermos de una forma eficiente y controlada (Parkes y Hart, 2000).

Estos nuevos sistemas terapéuticos han sido aplicados a distintos desórdenes y patologías, entre ellos, cáncer (Velasco-Velázquez et al., 1999; Castel et al., 2000; Bonfoco et al., 2000), lesiones coronarias (Castaño, 1999) y rechazo hiperagudo en el xenotransplante (Platt y Bach, 1991).

En cuanto al cáncer, la caracterización de moléculas de adhesión como las integrinas β_1 y β_3 , que regulan la capacidad adhesiva de las células tumorales ha permitido el desarrollo de terapias antimetastásicas, al ser consideradas como importantes dianas farmacológicas (Velasco-Velázquez et al., 1999). Así pues, muchos antagonistas para el receptor $\alpha_v\beta_3$ han sido usados para el desarrollo de métodos terapéuticos para el tratamiento de la neoplasia en la piel (Castel et al., 2000). Otros estudios sobre las integrinas β_1 muestran que su antagonismo en células humanas de neuroblastoma desencadena una señalización apoptótica, lo que representa, además de un modelo neuronal ampliamente usado en diferentes estudios, una posible vía para desarrollar métodos terapéuticos contra este tipo de cáncer (Bonfoco et al., 2000).

El estudio de las lesiones coronarias, centrados en la actividad plaquetaria del receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$, ha permitido diseñar alguna estrategia terapéutica antitrombótica puesto que este receptor inicia la vía de la agregación plaquetaria, su inhibición selectiva se considera una potente estrategia en la supresión de la respuesta fisiológica al daño tisular y la subsecuente formación del trombo (Plow y Byzova, 1999). Los resultados de diversos estudios basados en los antagonistas de este receptor indican que estos agentes son efectivos al disminuir las complicaciones trombóticas, tanto en procedimientos percutáneos de intervención coronaria, como en síndromes coronarios agudos (Castaño, 1999). Los antagonistas de $\alpha_{IIb}\beta_3$ actualmente disponibles se

diferencian en inhibidores competitivoS no específicoS y específicoS, aunque tienen un mecanismo de acción similar (Topol et al., 1999).

Como se ha puesto de manifiesto anteriormente, las integrinas β_1 y β_3 al estar involucradas en las primeras etapas del rechazo hiperagudo están implicadas significativamente en el xenotransplante y su caracterización en la especie porcina probablemente, permita una posible utilización en el desarrollo de estrategias adecuadas para su empleo en terapias de xenotransplante. El desarrollo de ligandos específicos, el reconocimiento del epítipo Gal- α -(1,3)-Gal mediante anticuerpos naturales humanos xenorreactivos o la posible obtención de proteínas recombinantes con la secuencia nativa o bien una secuencia de aminoácidos modificada con expresión igual, reducida o nula del epítipo Gal- α -(1,3)-Gal, entre otras, son posibles herramientas para la terapia del xenotransplante. Recientemente, han sido obtenidos cinco cerdos clónicos knockout para el gen de la enzima α -(1,3)-galactosiltransferasa que podrán ser utilizados para la prevención del rechazo hiperagudo. Sin embargo, el éxito del xenotrasplante dependerá del riesgo de la transmisión de enfermedades por retrovirus endógenos porcinos y el desarrollo de estrategias que conduzcan a un rechazo mediado por una vascularización y por la células-T retardadas (Dai, 2002). Existe, por lo tanto, la necesidad de seguir profundizando en el conocimiento de los factores y proteínas implicadas en el rechazo hiperagudo en terapia de xenotrasplante con el fin de desarrollar estrategias encaminadas a reducirlo o evitarlo.

12. LAS β_1 Y β_3 INTEGRINAS EN LOS ANIMALES DOMÉSTICOS

Las subunidades β integrinas han sido clonadas y caracterizadas en distintas especies, sin embargo el número de subunidades pertenecientes a la especie humana es más elevado que el existente actualmente en animales domésticos. El reducido número de secuencias descritas en estos animales engloba a distintas subunidades de las integrinas, tanto β como α integrinas. Entre los animales domésticos con alguna subunidad clonada solamente se encuentran el cerdo, el pollo, el conejo, el gato, el perro y la vaca.

Así pues, la poca información disponible referente a estas especies domésticas justifica el interés a la hora de caracterizar nuevas integrinas.

La primera estructura de la integrina descrita correspondió a subunidad β_1 de pollo (Tamkum et al., 1986). La caracterización de la secuencia de ADNc que codificaba para esta subunidad puso de manifiesto no sólo la estructura molecular

descrita con posterioridad para el resto de las subunidades β integrinas, sino también una de sus funciones principales como glucoproteína membranaria, la conexión entre la matriz extracelular y el citoesqueleto.

Años después, el aislamiento y caracterización de la subunidad β_3 en esta misma especie (Mimura et al., 1994) se realizó para explorar los mecanismos moleculares de expresión de la subunidad β_3 , al estar involucrada en el proceso de reabsorción del hueso a través del heterodímero $\alpha_v\beta_3$ de la superficie del osteoclasto.

Por otro lado, el estudio de la subunidad β_1 bovina se llevó a cabo por la importancia de su papel en el desarrollo de la preimplantación embrionaria, que incluye la migración de las células endodérmicas y mesodérmicas durante la formación de la placenta, entre otros (MacLaren y Wildeman, 1995).

Otros estudios, como el trabajo de la clonación y caracterización de la subunidad β_3 canina, se basaron en la comparación de su secuencia de ADNc con otras especies. Así, la subunidad β_3 canina fue comparada con sus homólogas en ratón y humano, manifestando una alta homología en las secuencias correspondientes a importantes dominios funcionales del heterodímero $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Lipscomb et al., 1999).

Esta alta homología está presente en todas las secuencias aminoacídicas de las subunidades β de las especies descritas a lo largo de la evolución, como lo evidencia el estudio con un anticuerpo anti- β_1 de pollo, que reacciona con algunos vertebrados, invertebrados y hongos (Marcantonio et al., 1988), como también con la alta conservación estructural al compartir una misma estructura básica: dominio extracelular, dominio transmembranario y dominio citoplasmático (Tamkum et al., 1986; DeSimone et al., 1988).

Así pues, basándose en la alta similitud manifestada, los estudios de las integrinas β_1 y β_3 previamente descritos son aplicables al resto de especies, presentando análogas funciones en todas ellas.

Además, el conocimiento de la secuencia nucleotídica de los genes de las subunidades β_1 y β_3 en diferentes especies podría aportar información adicional sobre los dominios estructurales y funcionales de los diferentes heterodímeros de los que son constituyentes, al igual que un mejor entendimiento de las variaciones entre especies en las interacciones receptor-ligando (Lipscomb et al., 1999).

Como también podría ser útil la información de las secuencias aminoacídicas y nucleotídicas de estas subunidades de las diferentes especies para futuros estudios mutacionales asociados con distintos desórdenes, como por ejemplo la trombastenia de Glazmann y desórdenes inmunopatológicos provocados por el polimorfismo asociado a la subunidad β_3 (Lipscomb et al., 1999; Llanes et al., 2001).

Las integrinas descritas en la especie porcina engloban a distintas subunidades β entre las que se encuentran la β_2 integrina (Lee et al., 1996), al igual que las dos integrinas descritas en el presente trabajo, β_1 y β_3 , mientras que entre las subunidades α sólo están clonadas CD11b o α_M integrina (*GeneBank Accession*: U40072) y CD41 o α_{IIb} integrina (*GeneBank Accession*: AF170527).

A pesar de que existen pocos estudios previos referentes a estas integrinas en cerdo, constituyen indudablemente dos de las moléculas de adhesión implicadas en numerosos procesos fisiológicamente importantes, justificando así el interés de la caracterización molecular de ambos genes.

Estudios con anticuerpos monoclonales han demostrado ser una herramienta útil a la hora de caracterizar a las integrinas funcional y estructuralmente. Así pues, el anticuerpo monoclonal JM2E5 (Pérez de la Lastra et al., 1997) frente a la subunidad β_3 porcina ha puesto de manifiesto, con los experimentos bioquímicos y la distribución tisular del antígeno porcino que reconoce, un peso molecular alrededor de 140 y 105 kDa en condiciones no reductoras y una alta expresión en plaquetas y granulocitos, datos muy similares a los descritos previamente para CD41/CD61 humana y bovina (Phillips et al., 1988; Mateo et al., 1996).

En general, poco se conoce de la distribución inmunohistoquímica de la subunidad β_3 . Un reciente trabajo realizado con el mismo anticuerpo monoclonal (Pérez de la Lastra et al., 1997) proporciona un análisis de la distribución de CD61 en el cerdo estando reducida su expresión a células de origen epitelial. De la misma forma se analiza en tumores humanos al ser este anticuerpo monoclonal coorreactivo con el receptor humano CD41/CD61 observándose una distribución heterogénea en tumores con metástasis (Moreno et al., 2002). Otro estudio de expresión, para analizar el otro heterodímero que puede constituir la subunidad β_3 , se realizó con un anticuerpo anti- $\alpha_V\beta_3$ (Singh et al., 2001). Los resultados mostrados con este anticuerpo concluyen que esta integrina se expresa en el epitelio pero no en la vasculatura, sin embargo se ha observado su expresión en otra especie, como es el caso de la rata (Singh et al., 2000).

Por otro lado, la información disponible para la subunidad β_1 porcina es aún más reducida. Todos los trabajos que hacen referencia a esta integrina están relacionados con el xenotransplante, ya que, como se ha dicho con anterioridad se trata de la molécula más reconocida por los anticuerpos xenorreactivos (Holzknecht y Platt, 1995).

Así pues, el único estudio que caracteriza un anticuerpo monoclonal específico para la integrina β_1 porcina (1A3) ha sido realizado por Richard y colaboradores (1998). El anticuerpo monoclonal 1A3 inmunoprecipita una molécula, acorde con los

resultados de Holzknacht y Platt (1995), identificada como β_1 integrina con un peso molecular aparente de 118 kDa en SDS-PAGE. De la misma forma, este anticuerpo monoclonal reconocía a la β_1 integrina y una proteína de 95 kDa en un lisado de células endoteliales mediante un inmunoblotting, sospechándose que esta proteína de menor peso molecular correspondía a la β_1 integrina sin madurar (Akiyama et al., 1989). Además, estudios inmunohistoquímicos con este anticuerpo presentó inmunorreactividad en las células endoteliales en capilares del glómerulo del riñón, órgano donde esta integrina en humano está altamente expresada (Kreidberg y Symons, 2000).

Por lo tanto, con la caracterización de las subunidades β_1 y β_3 porcinas se profundiza un poco más en el conocimiento de esta especie que constituye una de las especies domésticas más importantes por sus aplicaciones biomédicas y su interés económico en ganadería.

13. EL CERDO COMO ANIMAL DE ESTUDIO

El cerdo es un excelente modelo experimental al ser empleado en muchos trabajos de investigación como animal de estudio por compartir gran número de características (talla, anatomía, conducta alimentaria, sistema inmune, estructura de la piel y fisiología pulmonar, cardíaca y renal) con la especie humana. También su disponibilidad y las consideraciones éticas manifestadas con otros tipos de animales (primates, principalmente) le hacen ser el modelo idóneo. Son muchas sus posibles aplicaciones en los diferentes campos de investigación, como por ejemplo, el empleo de los órganos del cerdo en numerosos estudios cardiovasculares, de piel, nutrición y de transplantes, los injertos de válvulas de corazón de cerdo y el uso de sustancias procedentes del cerdo, como la insulina del páncreas, o la heparina, extraída de los pulmones (Pastoret et al., 1998).

El cerdo, por lo tanto, es usado como modelo en diferentes patologías y ensayos, tales como alcoholismo, alotransplante, diabetes, melanoma, hipertensión y xenotransplante, por nombrar algunos, siendo de gran repercusión en medicina, aportando también estos estudios, sobre todo a nivel del sistema inmune, información para prevenir y controlar enfermedades propias de esta especie, con sus consecuentes beneficios económicos.

A pesar de ser el cerdo un modelo excelente para su aplicación en humanos, son especies diferentes como se observa en muchos aspectos, reflejando una divergencia evolutiva. Estas diferencias son anatómicas (la inusual estructura del ganglio linfático porcino), fisiológicas (el gran número de linfocitos T) y genéticas (gran diversidad

dentro del complejo génico del receptor de las células T). El análisis de estas diferencias proporcionará nuevos campos para futuras investigaciones.

Por lo tanto, la caracterización de las integrinas β_1 y β_3 porcinas llevado a cabo en este trabajo proporcionaría, no sólo información sobre la estructura y funciones de estas moléculas, sino también las posibles aplicaciones en los distintos campos de investigación, al estar involucradas en el importante proceso del xenotransplante así como en distintos desórdenes hereditarios y enfermedades.

Así pues, el posible desarrollo de estrategias alternativas para el xenotrasplante, como la potencial información sobre las estructuras polimórficas de la subunidad β_3 y otros desórdenes inmunopatológicos, como la trombastenia de Glanzmann, son algunas de las posibles aplicaciones con la caracterización de ambas integrinas.

Sin embargo, la efectividad clínica comprobada de la terapia génica en algunas patologías supondría una de las aplicaciones con más repercusión de la caracterización de estas integrinas, entre las que nos encontramos al cáncer, el rechazo hiperagudo del xenotransplante y las lesiones coronarias.

Por todo ello, el cerdo constituye al animal de estudio ideal al englobar no sólo las características morfo-funcionales más semejantes a la especie humana, sino también por todas las aplicaciones biomédicas en las que se ve involucrado.

OBJETIVOS

La mayor parte de las células que constituyen un organismo pluricelular se encuentran en permanente contacto con la superficie de otras células próximas o con una compleja red de macromoléculas que recibe el nombre de matriz extracelular. Dos claros ejemplos serían, por un lado, las células endoteliales que, unidas unas a otras, tapizan el interior de los vasos sanguíneos constituyendo una estructura en barrera anclada a una membrana basal, y por otro, los fibroblastos, que son células que se encuentran totalmente rodeadas de una matriz de tejido conectivo. Dentro del sistema inmune, los linfocitos no sólo emplean una gran parte de su vida en permanecer en contacto con otras células en los nódulos linfáticos, sino que, además, se relacionan con la matriz extracelular mediante los movimientos migratorios que llevan a cabo a través del estroma de los órganos linfoides.

En los animales superiores, estos fenómenos de interacción de las células con su entorno más inmediato son cruciales en el mantenimiento de la integridad de los tejidos y en la hemostasis y juegan un papel fundamental en procesos fisiológicos tan importantes como la división, diferenciación y movilidad celular, el desarrollo embriológico, la reparación tisular y el funcionamiento del sistema inmune.

La importante aportación de los trabajos realizados principalmente en la especie humana han generado una visión más detallada de la participación de las integrinas en el proceso de adhesión celular, junto a otros miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, las cadherinas y las selectinas. Así, en la actualidad se dispone de suficientes evidencias que ponen de manifiesto que la adhesión celular está mediada por interacciones receptor-ligando en los que las integrinas juegan un papel preponderante. De este modo, y considerando únicamente las tres principales subfamilias, se conoce que las integrinas β_1 y β_3 , expresadas en la mayoría de los tipos celulares, son las responsables de las interacciones célula-matriz extracelular, mientras que las integrinas β_2 , restringidas en su expresión a los leucocitos, están implicadas en las interacciones celulares homotípicas y en la adhesión leucocitos-células endoteliales.

Gracias al desarrollo de la tecnología de los anticuerpos monoclonales y la técnicas de clonación molecular, un reducido número de receptores de adhesión ha podido ser caracterizado en algunas especies de animales domésticos. El conocimiento de la estructura y función de estas moléculas ha permitido poner de relieve la existencia de notables diferencias entre los sistemas inmunitarios del cerdo o de los rumiantes con los del hombre y ratón, resaltando la necesidad de estudios más detallados en estas especies de interés y obliga a ser cautos a la hora de generalizar esquemas sobre el funcionamiento del sistema inmunitario a partir de datos obtenidos en una especie determinada.

Por todo ello, la idea directriz que ha motivado el presente trabajo de tesis doctoral ha sido el estudio de las subunidades β_1 y β_3 de las integrinas porcinas, con el fin de contribuir al conocimiento de los mecanismos que regulan la adhesión celular dentro del sistema inmune del cerdo, una de las especies animales de mayor interés económico, y que, por la semejanza anatómica y morfo-funcional que comparte con el hombre, se ha convertido en los últimos años en un excelente modelo experimental en gran número de estudios de relevancia fisiológica. Este hecho aporta mayor interés si cabe a los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que se estima que los procesos de adhesión juegan un papel importante en la progresión de determinados procesos patológicos (tumores, inflamatorios, traumáticos e infecciosos), por lo que la naturaleza específica de las integrinas que participan en ellos hacen de ellas un importante foco de estudio.

Nuestro trabajo por tanto, contempla los siguientes objetivos:

1. Caracterización de los genes que codifican para las subunidades β_1 y β_3 de las integrinas porcinas. Aproximación al estudio de su estructura molecular y función.
2. Determinación del lugar físico que ocupan ambos genes en el genoma porcino mediante localización cromosómica en un panel de células híbridas somáticas.
3. Estudio de la distribución tisular de ambas subunidades y análisis del nivel de su expresión mediante técnicas moleculares e inmunohistoquímicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES, TEJIDOS Y CÉLULAS

La sangre y demás muestras de tejidos porcinos son extraídas de cerdos (razas Landrace e Ibérica) de 6-8 meses de edad aproximadamente, en el momento de ser sacrificados en el matadero.

Los ratones empleados para la generación de hibridomas y la producción de ascitis fueron hembras de la cepa BALB/c, de 4-6 semanas de edad, aproximadamente.

1.1. Aislamiento de células mononucleadas (PBMC) y plaquetas de sangre periférica

La sangre extraída se recoge en frascos utilizando como anticoagulante una solución de citrato trisódico al 4%. Las células se obtienen por separación en gradiente de densidad de Ficoll-Urografin mediante centrifugación a 3.000 r.p.m. durante 30 minutos r.p.m..

Las células mononucleadas (linfocitos y monocitos) localizadas en la banda de interfase se recogen con ayuda de una pipeta Pasteur, se disponen en tubos de 10 ml y se centrifugan a 1.800 r.p.m. durante 10 minutos. Posteriormente, se lavan 3 veces con PBS en las mismas condiciones. Los eritrocitos residuales se eliminan sometiendo las células a un choque hipotónico con 2 ml de agua destilada durante 10-15 segundos, restaurando inmediatamente la isotonicidad con 0,5 ml de solución salina. Las plaquetas se aíslan centrifugando los sobrenadantes obtenidos en los sucesivos lavados a 3.000 r.p.m. durante 15 minutos y a continuación se lavan 3 veces con PBS en las mismas condiciones.

Finalmente, para cuantificar ambos tipos celulares se usa una cámara de Neubauer, utilizando una solución de eosina (1/10) como colorante vital.

1.2. Esplenocitos de ratón

Los ratones son sacrificados mediante dislocación cervical y a continuación se practica una apertura en su región abdominal para extraer el bazo. El órgano se perfunde varias veces con medio HY liberando los esplenocitos y posteriormente, con un émbolo de jeringa estéril, se presiona hasta disgregarlo. Una vez retirados los restos de estroma mediante filtración, las células son obtenidas por centrifugación a 1.800 r.p.m. durante 10 minutos y a continuación se lavan dos veces en medio HY. Finalmente, son resuspendidas en 1 ml de medio HY con antibiótico y se cuentan en

una placa de Neubauer.

1.3. Células de mieloma

La línea celular utilizada para la producción de hibridomas es la Sp2/O-Ag14 (Shulman et al., 1978).

1.4. Congelación y descongelación de células

La descongelación se lleva a cabo agitando suavemente el criovial que contiene las células en un baño a 37°C. Una vez descongeladas, las células se transfieren a un tubo estéril de 10 ml al que se añade 8 ml de medio HY, y se centrifugan 5 minutos a 1.500 r.p.m.. A continuación, las células se resuspenden a la concentración deseada y se transfieren a una botella o placa de cultivo.

Para la congelación, las células se centrifugan a 1.500 r.p.m. durante 5 minutos a temperatura ambiente y el pellet celular se resuspende en medio de congelación para obtener una concentración aproximada de 2×10^6 células/ml. A continuación, se dispone 1 ml de esta suspensión por criovial y se introduce en una caja de congelación a -80°C toda la noche. Finalmente, se transfiere a nitrógeno líquido para su almacenamiento.

1.5. Estirpes de *E. Coli*

Las líneas celulares empleadas en los ensayos de biología molecular son XL1-Blue MRF', BL21 (DE3) y SOLR, todas ellas estirpes derivadas de *E. Coli*.

2. OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO

La obtención de ADN genómico porcino se lleva a cabo a partir de 3×10^8 células mononucleadas de sangre periférica obtenidas como ha sido indicado anteriormente. Para ello, las células se resuspenden en 5 ml de tampón de lisis y se incuban a 50°C durante una noche con agitación. A continuación, se realizan dos extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), y se procede a precipitar el ADN contenido en la fase acuosa añadiendo 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M pH 7,5 y 2,5 volúmenes de etanol 100% e incubando durante 1 hora a -20°C. Después de centrifugar durante 2 minutos a 12.000 r.p.m., se lava el pellet de

ADN obtenido con etanol al 70 %, se seca y se resuspende en 200µl de tampón TE (10:1). La calidad del ADN genómico obtenido se observa mediante una electroforesis en gel de agarosa a 1% y la cuantificación se realiza mediante espectrofotometría a 260 nm de densidad óptica. Finalmente, se conserva a -20°C hasta su uso.

3. AISLAMIENTO DE ARN EUCARIÓTICO

La extracción de ARN eucariótico se lleva a cabo a partir de 50-100 mg de tejido o $5-10 \times 10^6$ células empleando el sistema *TriPure Isolation Reagent* de Roche.

Para ello, una vez que la muestra es homogenizada con 1 ml del reactivo de extracción, se añade 0,2 ml cloroformo y se agita vigorosamente durante 15 segundos. A continuación, se incuba 2-15 minutos a temperatura ambiente, se centrifuga a 12.000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C y se recoge la fase acuosa conteniendo el ARN en un tubo limpio.

Para precipitar el ARN se añade 0,5 ml de isopropanol, se incuba durante 5-10 minutos a temperatura ambiente y finalmente se centrifuga a 12.000 r.p.m durante 10 minutos a 4°C. El pellet de ARN se lava con etanol 70 %, se deja secar y se resuspende en agua tratada con DEPC (*Sigma*) incubando 10-15 minutos a 55°C-60°C para su perfecta disolución. La calidad del ARN aislado se visualiza mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturalizado, y la cuantificación se estima mediante espectrofotometría en las mismas condiciones que el ADN genómico.

4. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Para las muestras de ADN los geles se preparan en un volumen final de 50 ml de tampón TAE 1X conteniendo 1% de agarosa y 2 µl de la solución de bromuro de etidio.

Para el análisis del ARN, los geles se realizan en condiciones desnaturalizantes en un volumen final de 50 ml, conteniendo 0,5 g de agarosa en 36 ml de agua DEPC, 5 ml de tampón 10X de electroforesis, 9 ml de formaldehído 37 % (*Merck*) y 2 µl de la solución de bromuro de etidio. La cubeta de electroforesis, el peine y el soporte del gel han de tratarse previamente al menos durante 1 hora con 0,1M NaOH, para evitar la acción de las ARNasas.

En ambos casos la electroforesis se lleva a cabo durante 1 hora a voltaje constante y 80 mA de intensidad, empleándose los marcadores de peso molecular λ HindIII y ϕ x174HaeIII (*Roche*) como referencia para la estimación de los tamaños.

5. RT-PCR

5.1. Síntesis de la primera cadena (RT)

La síntesis de la primera cadena de ADNc se lleva a cabo mediante el empleo del sistema *Superscript II Rnase H Reverse Transcriptase* (GibcoBRL) y el cebador aleatorio pd(N)₆-5'-PO₃·Na⁺ Salt-(Pharmacia Biotech).

Para ello, 10 µg de ARN total se incuban con 330 ng de pd(N)₆, durante 3 minutos a 65°C y posteriormente se disponen 5 minutos en hielo. A continuación, se añade al tubo de reacción: 0,5 µl de inhibidor de ARN (50 U/µl) (Roche), 1 µl de la mezcla de los desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs, 20mM cada uno) (Pharmacia), 4 µl del tampón 5X de la transcriptasa inversa, 2 µl de 1,4-ditioltreitol (DTT) (0,1 M) y 1 µl de la enzima (200 U/µl). Se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente 1 hora a 42°C. Se desnaturaliza a 95°C durante 10 minutos y finalmente, se aumenta el volumen hasta 100µl con agua DEPC, conservándose a -20°C hasta su uso.

5.2. Síntesis de la segunda cadena (PCR)

La síntesis de la segunda cadena se realiza mediante PCR, empleando cebadores específicos del gen que se pretende caracterizar. La reacción de PCR se realiza en un volumen de 50 µl conteniendo: 5 µl tampón 10X de PCR, 2 µl MgCl₂ (50mM), 8 µl mezcla de dNTPs (1,25mM cada uno) (Biotools), 2,5 µl de cada uno de los cebadores (20µM), 1 µl Taq ADN polimerasa (Biotools) (1U/µl), la cantidad adecuada del material que se quiere amplificar y agua milli-Q estéril hasta completar el volumen final.

La pauta de reacción empleada es la estandarizada en nuestro laboratorio que contempla la realización de 35 ciclos de PCR y una temperatura de hibridación que estará en función de los cebadores empleados.

Con el fin de comprobar la calidad de ADNc producido mediante este sistema, de manera rutinaria es realizada una amplificación por PCR del material obtenido en la síntesis de la primera cadena para obtener un fragmento de 500 pb de la secuencia que codifica para la subunidad 18S de los ribosomas, cuyo ARNm se sintetiza constitutivamente en todos los tejidos. Los cebadores empleados se muestran en la **Tabla 3**.

5'GACTCAACACGGGAAACCTCAC3' (forward)	18S-1
5'GCTTATGACCCGCACTTACTGG3' (reverse)	18S-2

Tabla 3: Pareja de cebadores específicos del gen 18S porcino.

6. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

Se lleva a cabo empleando el sistema *GeneClean III (Bio101)*. Para ello, después de la electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% se escinde el fragmento a purificar, se pesa y se solubiliza con 4,5 volúmenes de NaI 6M a 55°C. A continuación, se añaden 10 µl de Ez-glassmilk, mezclando e incubando en hielo durante 15 minutos. Después de la centrifugación a 12.000 r.p.m. durante 3 minutos, se elimina el sobrenadante y se lava el pellet con new wash. Al final se deja secar y se eluye el ADN resuspendiendo en 30 µl de agua milliQ o en tampón TE, incubando 5 minutos a 55°C y centrifugando durante 1 minuto a 12.000 r.p.m..

7. LIGACIÓN

Los plásmidos utilizados en este trabajo han sido *pGEM-T (Promega)* y *pET-28b (Novagen)*, el primero para la clonación de productos de PCR y el segundo empleado en el procedimiento de expresión en bacterias. El plásmido *pET-28b* es digerido previamente con las endonucleasas de restricción adecuadas para la clonación del fragmento de ADN, mientras que *pGEM-T* no necesita digestión, por venir preparado comercialmente.

La ligación vector-inserto tiene lugar en una reacción de 10 µl de volumen final que contiene 50 ng del vector, el inserto en la cantidad correspondiente a la relación molar 1/1 (vector/inserto), el tampón de ligación 2X y 5 unidades de la ADN ligasa T4 (*Promega*). La incubación se lleva a cabo durante una noche a 16°C y finalmente, durante 10 minutos a 70°C para inactivar la enzima.

8. PRODUCCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Las células elegidas, XL1-blue MRF' o BL21(DE3), se estrían en una caja de Petri de 92 mm con medio Psi-a y se crecen una noche a 37°C.

A la mañana se inocula una de las colonias en 5 ml de medio Psi-b y se deja

crecer a 37°C hasta una densidad óptica de 0,48 a 550 nm (+/- 0.02). Se enfría el cultivo durante 5 minutos en hielo y posteriormente se centrifuga a 6.000 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C. El pellet bacteriano se resuspende cuidadosamente en 40 ml de medio TFb 1 frío y se incuba 5 minutos en hielo. Las bacterias se vuelven a centrifugar en las mismas condiciones una vez más, pero se resuspenden en 4 ml de TFb 2 frío y se mantienen en hielo durante 15 minutos.

Las células competentes se disponen en alícuotas de 150 µl en tubos de 1,5 ml previamente enfriados en hielo, almacenándose a -80°C o bien en nitrógeno líquido.

9. TRANSFORMACIÓN

Se descongelan las células competentes en hielo, se añade 1/10 de volumen de solución de β-mercaptoetanol fría y se dejan reposar durante 10 minutos en hielo. La transformación se lleva a cabo en tubos de 1,5 ml enfriados previamente, en donde se mezclan 50 µl de células competentes y 25 ng de ADN como máximo. Tras incubar en hielo durante 30 minutos, la transformación tiene lugar mediante un choque térmico a 37°C durante 3 minutos e inmediatamente después los tubos se colocan en hielo 2 minutos. Se añade 500 µl de medio LB y se incuban una hora a 37°C en agitación. El cultivo transformado se dispone en placas con medio LB-agar y el antibiótico adecuado: 50 µg/ml de ampicilina (*Roche*) para XL1-Blue MRF⁺ y 30 µg/ml kanamicina (*Sigma*) para BL21(DE3). Finalmente se incuban a 37°C durante una noche.

10. MINIPREPS

Con el fin de purificar el contenido plasmídico de las colonias transformante, se disponen en cultivos de 3 ml de LB con antibiótico y se incuban durante toda la noche a 37°C con agitación. Una réplica de cada minicultivo se conserva en glicerol al 40 % en el congelador de -80°C.

El procedimiento de purificación se lleva a cabo centrifugando los cultivo a 12.000 r.p.m. durante 2 minutos y resuspendiendo el pellet de bacterias con 200 µl del tampón de lisis STET y 4 µl de una solución de lisozima. Las muestras se hierven durante 45 segundos, se centrifugan a 12.000 r.p.m. durante 10 minutos y se retiran los restos celulares quedando en el tubo el sobrenadante conteniendo el ADN del plásmido. Este se precipita mediante la adición de 8 µl CTAB 5% mezclando por inversión y centrifugando a 12.000 r.p.m. durante 5 minutos. A continuación, el

precipitado se resuspende en 300 μ l NaCl 1,2M y después de añadir 750 μ l de etanol absoluto, se vuelve a centrifugar 10 minutos en las mismas condiciones. El pellet se lava dos veces con etanol al 70 %, se deja secar y se resuspende en 40 μ l de tampón TE. Finalmente, se añade 1 μ l de una solución de ARNasa incubando las muestras 1 hora a 37°C, quedando preparadas para la digestión con las enzimas de restricción.

11. MAXIPREPS

Un procedimiento de purificación a mayor escala se lleva a cabo disponiendo las colonias transformantes en 200 ml de LB con antibiótico e incubando durante una noche a 37°C. A la mañana siguiente, el cultivo se centrifuga a 4.000 r.p.m. durante 20 minutos y se resuspende el pellet bacteriano en 15 ml de la solución I. Se añaden 15 ml de la solución II, dejando incubar 5 minutos a temperatura ambiente y a continuación 15 ml de la solución III, agitando vigorosamente la mezcla para después incubar 5 minutos en hielo, centrifugándose finalmente a 4.000 r.p.m. durante 5 minutos para retirar los restos celulares.

Para precipitar el ADN, se filtra el sobrenadante sobre lana de vidrio, se añade un volumen de isopropanol y, después de incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente, se centrifuga 20 minutos a 4.000 r.p.m.. El pellet obtenido se lava con etanol al 70 %, se deja secar y se resuspende en 500 μ l de TE 10:1. A continuación se añaden 5 μ l de la solución de ARNasa y se deja incubar durante 1 hora a 37°C.

Después del tratamiento enzimático, se añade 1 volumen de la solución de PEG 8000, se incuba durante 5 minutos y posteriormente se centrifuga 10 minutos a 12.000 r.p.m. El pellet obtenido se lava dos veces con etanol 70 %, se deja secar y se resuspende en 300 μ l de TE 10:1 o agua milliQ estéril. La concentración de ADN purificado se estima mediante espectrofotometría y las muestras son guardadas a -20°C hasta su empleo.

12. DIGESTIÓN POR ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

La reacción de digestión está compuesta por el tampón enzimático 10X, la enzima o enzimas de restricción (*Roche*) que liberan el inserto (10 U por reacción y enzima), la cantidad necesaria de ADN a digerir (5 μ l minipreps/ 1 μ l maxipreps) y agua hasta completar el volumen de 10 μ l en las digestiones simples y 20 μ l en las dobles, durante 1 hora a 37°C. El resultado obtenido se observa en un gel de agarosa al 1%.

13. SECUENCIACIÓN

La secuenciación del ADN se realizó por el método de Sanger et al. (1977) en el *Servicio de Secuenciación de la Universidad de Córdoba*. Para la reacción de secuenciación se utiliza un secuenciador automático y el kit *ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems)*.

13.1. Preparación del gel de secuenciación

El gel WTR (well to read) “FullScan” de 48 cm en volumen final de 48 ml se prepara a partir de 22.5 g de urea (*Serva*) a la que se añade 4,5 ml de 40% de acrilamida y 21 ml de agua milli-Q. Para obtener esta disolución se añade 0.5 g de amberlita (*Sigma*), una resina de intercambio iónico, para desionizar calentando suavemente (no más de 37°C) agitando hasta su completa disolución. Se filtra a través de una membrana hidrofílica con 22 mm de diámetro de poro y se desgasifica durante 5 minutos. El siguiente paso es añadir 4,5 ml de 10×TBE, completar con agua hasta el volumen final y añadir los activadores de la polimerización de la acrilamida: 210 ml de 10% de persulfato amónico (*Amresco*) y 23 ml de TEMED (*Amresco*). Tras mezclar con agitación suave, se introduce en el espacio entre los cristales y se deja polimerizar al menos 2 horas.

13.2. Reacción de secuenciación

La reacción de secuenciación está constituida por 5 µl la mezcla *Terminator Ready Reaction* (dITP, dATP, dCTP, dTTP; terminadores marcados para adenina, timina, guanina y citosina; Tris-HCl pH 9,0; MgCl₂; pirofosfatasa termoestable y *AmpliTaqFS* ADN polimerasa), el cebador específico (3,2 pmol/µl), 200-500 ng del ADN molde y agua milli-Q estéril hasta un volumen final de 20 µl. El programa a ejecutar consta de 25 ciclos y tres rampas térmicas rápidas: la primera hasta 96°C finalizando con 10 segundos a esa temperatura; la segunda hasta 50°C permaneciendo 5 segundos y la última hasta 60°C finalizando con 4 minutos a la misma temperatura.

13.3. Purificación mediante precipitación con etanol

Los terminadores no incorporados se eliminan de las muestras por precipitación

con etanol/acetato de sodio (*Merk*). Para ello se añade a las mezclas de reacción 2 µl de acetato sódico 3M pH 4,6 y 50 µl de etanol 95 %, agitando las muestras mediante vórtex e incubando 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugan a máxima velocidad (12000 r.p.m.) durante 20 minutos, se lavan con etanol al 70 % y se deja secar el pellet.

13.4. Electroforesis y análisis automático de la secuencia

Las muestras se disuelven en 4 µl de solución de carga. A continuación se desnaturalizan y se depositan 3 µl de las muestras en los correspondientes pocillos del gel de secuenciación. La electroforesis se realiza en tampón TBE 1× a 38 vatios de potencia constante durante 18 horas. La recogida de los datos se realiza con un ordenador *PowerMac G3 (Apple Computer)* equipado con software de captura y análisis (*373 XL Data Collection v.2.0* y *Sequencing Analysis v.3.4.1*) que genera la secuencia.

14. OBTENCIÓN DE LA SONDA ESPECÍFICA

Para la caracterización de los genes porcinos de este estudio, CD29 y CD61, se partió de una sonda específica. La sonda se obtuvo a partir de ADNc de bazo de cerdo mediante PCR, utilizando las pareja de cebadores específicos que se muestran en la **Tabla 4** para cada gen a estudiar.

5'-CCAACATCTGTGCCACGCGAGG-3' (<i>forward</i>) F 101	CD61
5'-CCACTGATGCCAAGACC-3' (<i>reverse</i>) R 869	
5'-CCACAGATGCCGGGTTTCACTTTG-3' (<i>forward</i>) P1	CD29
5'-CCCTCGCTCTGGCATTACATTTCG-3' (<i>reserve</i>) P2	

Tabla 4: Cebadores generadores de la sonda específica de los genes porcinos CD61 y CD29, respectivamente.

Estos cebadores forman parte de regiones comunes, y por lo tanto conservadas de secuencias publicadas de dichos genes en otras especies. El protocolo de PCR consiste en 35 ciclos y una temperatura de hibridación de 60°C en ambos casos.

Los productos de amplificación se analizan en un gel de agarosa al 1% y las bandas de ADN del tamaño esperado se purifican, para ser clonadas en el vector *pGEM-T*, siendo posteriormente secuenciadas.

La sonda obtenida se marca usando PCR DIG Labeling Mix (*Roche*). El

nucleótido marcado de la mezcla, digoxigenina-11-dUTP, se incorpora al producto de PCR, reemplazando parcialmente al dTTP en la amplificación y generando la sonda marcada. El resto de reacción de amplificación de ADN es idéntica a cualquier reacción PCR.

15. RASTREO DE GENOTECAS

La secuencia de los genes ha sido obtenida mediante el empleo de genotecas de ADNc porcino producidas con el kit ZAP Express Vector System (Stratagene). Para el gen CD29 se empleó una genoteca construida a partir de ARNm de distintos tejidos (Nunes M. et al., 1994). El gen CD61 fue aislado a partir de una genoteca comercial de músculo liso. El vector que constituye la genoteca es el fago λ ZAP que se caracteriza por contener al plásmido *pBluescript SK⁻* en su sitio de clonación.

15.1. Cultivo de la genoteca

Se plaquean alrededor de 10^6 ufp (unidades formadoras de placas de lisis) en 20 cajas de Petri de 150 mm de diámetro a razón de 50.000 ufp por caja.

Para ello, previamente se dispone un cultivo de bacterias XL1-blue MRF['] durante una noche a 37°C en medio LB suplementado con 10 mM de MgSO₄ y 0.2 % de maltosa. La absorción fago-bacteria se lleva a cabo incubando 600 μ l del cultivo con la cantidad de fagos señalada anteriormente y dispuestos en 150 μ l de tampón SM. Después de 15-20 minutos a 37°C, se mezcla con 7 ml de agar de cobertera y se extienden sobre el medio sólido de las cajas de Petri. Finalmente, estas se incuban a 37°C hasta la aparición de placas de lisis.

15.2. Transferencia a membranas de nylon

La genoteca dispuesta en placa es transferida a membranas de nylon de 132 mm de diámetro (*Nytran N de Schleicher & Schuell*). Para ello se depositan las membranas sobre la superficie del agar de cobertera y se incuban durante 2 minutos. A continuación, y con el fin de fijar el ADN al soporte de nylon, las membranas son desnaturalizadas y posteriormente neutralizadas durante 5 minutos en las soluciones adecuadas. Finalmente, se secan en papel de filtro y se incuban a 80°C durante 2 hora.

15.3. Hibridación

La hibridación de las membranas de nylon con la sonda específica se lleva a cabo durante una noche a 42°C en horno de hibridación. Para ello, la sonda es previamente desnaturalizada a 95°C durante 5 minutos y añadida a la solución de hibridación a razón de 10 ng de sonda por cada 10 ml de solución.

15.4. Detección de placa positivas

La detección de placas positivas se lleva a cabo mediante el sistema Genius de Roche. Para ello, las membranas hibridadas son lavadas con 2XSSC-0,1%SDS dos veces durante 5 minutos a temperatura ambiente y a continuación otras dos veces con 0,5XSSC-0,1%SDS a 55°C durante 10 minutos.

Para la detección colorimétrica con NBT y BCIP, primero se equilibran las membranas durante 1 minuto en tampón de lavado GB1 a temperatura ambiente y luego son bloqueadas mediante incubación en GB2 durante 30-60 minutos. A continuación se incuban con GB2+Anticuerpo anti-DIG durante 30 minutos a temperatura ambiente, se equilibran en GB3 durante 5 minutos y se incuban con la solución de coloración en oscuridad.

Utilizando las membranas reveladas como referencia, las placas de lisis positivas son identificadas en las cajas de Petri, aisladas y dispuestas en 500 µl de tampón SM para constituir el stock de halo.

15.5. Identificación de clones positivos mediante PCR

De manera rutinaria, la especificidad de las placas de lisis aisladas en un rastreo es comprobada mediante PCR con cebadores específicos del gen que se pretende caracterizar. Para ello, y debido a la presencia de Cl₂Mg en el tampón SM, es necesario emplear un protocolo de PCR que contemple esta variante. En nuestro trabajo, hemos puesto a punto un procedimiento de PCR derivado del descrito por Languino y Ruoslahti (1992). Brevemente, el procedimiento consiste en una PCR estándar similar a la descrita anteriormente, llevada a cabo sobre 10 µl del stock de halo en SM, y sin la adición de Cl₂Mg.

15.6. Procedimiento de escisión

Una vez aislada y clonada, cada placa de lisis positiva es sometida a un procedimiento de escisión que tiene por objetivo la extracción del componente genético porcino en su forma clonada en el vector *pBluescript SK⁻* contenido en el fago λ ZAP.

Para la escisión se parte de dos cultivos de células, XL1-Blue y SOLR, que se incuban durante toda la noche a 30°C en medio LB suplementado con maltosa 0,2% (p/v) y MgSO₄ 10mM. Ambos cultivos son centrifugados a 1.000×g y se resuspenden en 10mM MgSO₄ hasta obtener una densidad óptica de 1.0 a 600 nm.

A continuación, en un tubo de 50 ml, se disponen 200 μ l del cultivo de XL1-Blue, 250 μ l del stock en SM del clon positivo y 1 μ l de fago ayudante *ExAssist* y se incuba durante 15 minutos a 37°C. A la mezcla anterior se añaden 3 ml de medio LB y se incuba de nuevo a 37°C de 2 a 3 horas con agitación. Finalmente, se incuba el tubo a 60-70°C durante 20 minutos y se centrifuga a 1.000×g durante 15 minutos. Se recupera el sobrenadante, conteniendo el vector recombinante escindido en forma de fagémido, en un tubo de 50ml estéril, pudiéndose conservar a 4°C durante 1-2 meses.

La obtención de las bacterias transformantes con el vector recombinante sobre placas de medio sólido se lleva a cabo incubando 200 μ l de células SOLR con 10-100 μ l de sobrenadante aislado anteriormente durante 15 minutos a 37°C. A continuación, se siembra la transformación en placas de medio sólido LB con ampicilina (50 μ g/ml) dejando crecer una noche a la misma temperatura. Las colonias que aparecen contienen el vector *pBluescript SK⁻* con el inserto de ADN clonado. Estas colonias pueden crecer en medio líquido y almacenarse en glicerol a -80°C.

16. SOUTHERN BLOTTING

En este trabajo, llevamos a cabo un procedimiento de Southern blotting para confirmar el análisis de expresión por RT-PCR de los genes caracterizados. Para ello, en primer lugar los amplificadores se someten a electroforesis en gel de agarosa al 1% en las condiciones ya descritas y a continuación el gel se desnaturaliza mediante tratamiento con 0,4 M de NaOH durante media hora a temperatura ambiente.

Una vez desnaturalizado, el gel se transfiere a membranas de nylon con poro de 0,45 μ m (Nytran 0.45 de *Schleicher & Schuell*) mediante un sistema de transferencia de vacío a 50 mbar durante 1 hora y 30 minutos en 20XSSC y finalmente es hibridado con una sonda específica en las condiciones de hibridación anteriormente descritas.

17. PANEL DE HÍBRIDOS CELULARES SOMÁTICOS

La localización cromosómica de los genes caracterizados se llevó a cabo en colaboración con la Dra. Martine Yerle del Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas-INRA (Departamento de Biología Celular, Centro INRA de Toulouse, Francia) mediante el empleo de un panel de híbridos celulares somáticos desarrollado en este centro (Yerle et al., 1996) en el marco del programa europeo de cartografía del genoma porcino (PiGMaP).

El panel está compuesto por 27 líneas celulares híbridas, 19 de hamster chino-cerdo (1 al 19) y 8 de ratón-cerdo (20 al 27), cada una de ellas conteniendo fragmentos identificados de distintos cromosomas porcinos. La caracterización citogenética de las 27 líneas híbridas fue determinada por Yerle y colaboradores (1996), resultando la distribución de fragmentos subcromosomales que se muestra en la **Figura 6**.

Para la asignación cromosómica, en primer lugar se lleva a cabo una PCR con cebadores específicos del gen a mapear sobre 10 ng de ADN aislado de cada una de las líneas híbridas. Los cebadores usados para la localización de CD29 y CD61 están indicados en la **Tabla 5**. Los productos de PCR se analizan mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%, observándose la presencia o no de un amplificado de la talla correcta (336 pb en el caso de CD29 y 708 pb para CD61) en cada muestra.

5'-GGCCTTGGAGTGGGATGGGTTGGA-3' (<i>forward</i>) CD61-Loc-1	CD61
5'-ATGAGAGGGTGAATAGGTAAA-3' (<i>reverse</i>) CD61-Loc-2	
5'-TGCCTTTTTGACCTTTTCCTCGTGA-3' (<i>forward</i>) CD29-Loc-1	CD29
5'-CCCCTCCCAACTGACTTTTCCTAT-3' (<i>reverse</i>) CD29-Loc-2	

Tabla 5: Cebadores utilizadas para la localización cromosómica de los genes porcinos CD61 y CD29, respectivamente.

La localización cromosómica se logra por la segregación concordante entre los resultados de PCR y los fragmentos de cromosomas que contienen las células híbridas. Cuando los 27 híbridos no permiten la discriminación entre 2 regiones subcromosomales, el orden genético se tiene en cuenta para sugerir la localización más exacta del marcador. Se considera un resultado discordante cuando un resultado de PCR es incompatible con el ADN de cerdo caracterizado contenido en el panel de híbridos. Los cálculos estadísticos para la localización cromosómica fueron realizados usando el software desarrollado por Chevalet y colaboradores (1997) y dispuesto al efecto en la página web www.inra.toulouse.fr.

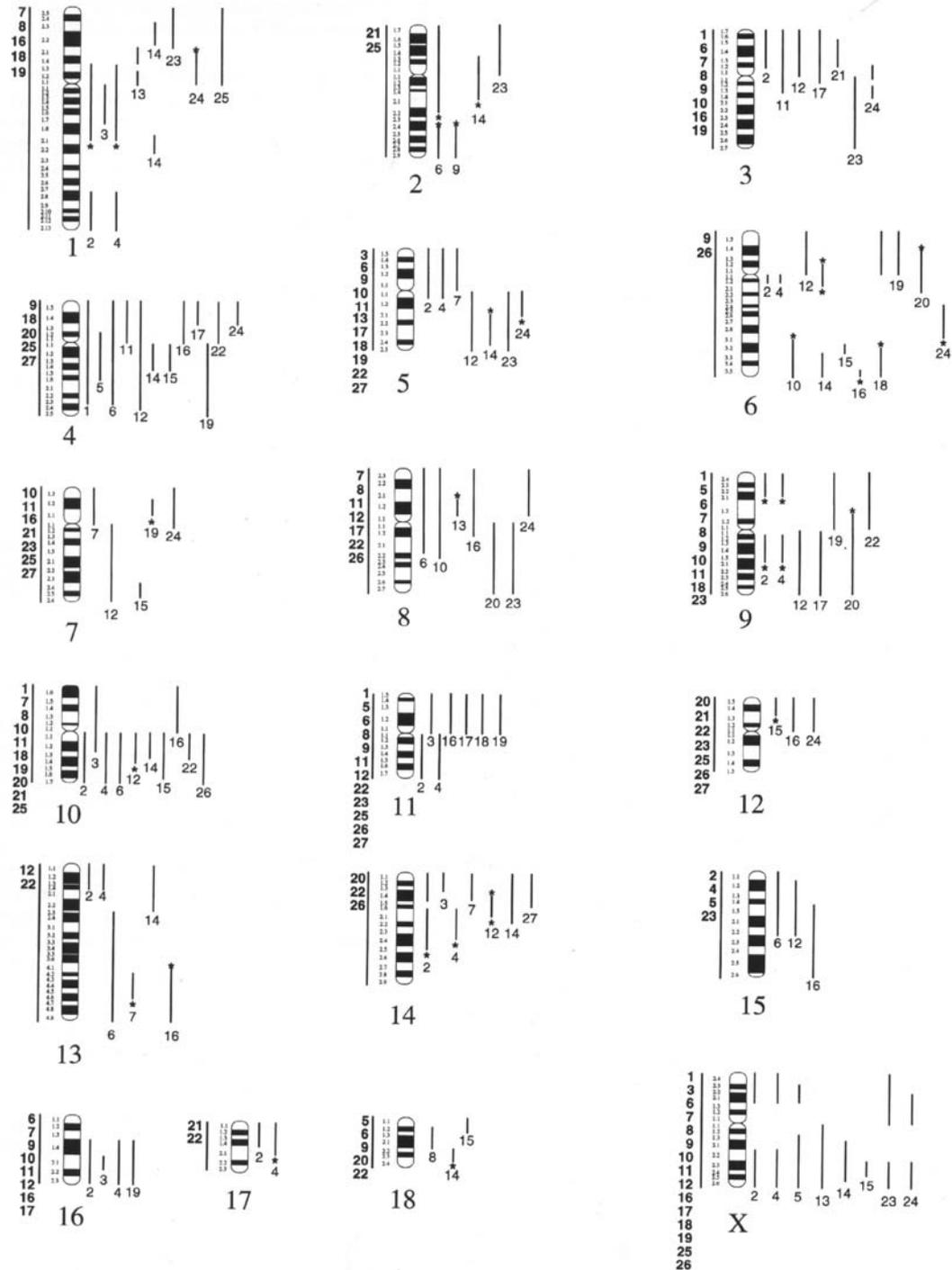


Figura 6: Caracterización citogenética del panel de híbridos celulares somáticos.

18. EXPRESIÓN DE LOS GENES EN *E. coli*

La producción de los anticuerpos en el presente trabajo ha sido llevado a cabo gracias a la producción previa de proteínas recombinantes de las integrinas caracterizadas. Para la producción de estas proteínas, secuencias parciales de los genes CD29 y CD61 fueron expresadas en la fase correcta de lectura en un sistema procariótico mediante el kit *pET* Expression System de *Novagen*.

18.1. Construcción de un vector para la expresión

Las secuencias correspondientes a los dominios de CD29 y CD61 que se pretenden expresar se amplifican mediante PCR, usando cebadores específicos conteniendo los sitios de corte de las enzimas *Bam*HI y *Hind*III (**Tabla 6**).

SITIO DE CORTE/SECUENCIA ESPECÍFICA	ENZIMA	CEBADOR
GGTCGGATCCAAGCAGATGAAAATAGATGT	<i>Bam</i> HI	CD29-F307
TCTAAGCTTAGATCCACAAACGGCAACTT	<i>Hind</i> III	CD29-R1017
GGTCGGATCCCAACATCTGTGCCACGCGAGG	<i>Bam</i> HI	CD61-F101
TCTAAGCTTCCACTGATGCCAAGACC	<i>Hind</i> III	CD61-R843

Tabla 6: Cebadores utilizados para la obtención de la secuencia parcial de CD29 y CD61 a expresar mediante el sistema procariótico elegido.

Los productos de PCR obtenidos, se analizan en un gel de agarosa al 1%, se purifican y finalmente son digeridos con el fin de preparar sus extremos para su inserción, en adecuada fase de lectura, en el vector *pET28b*. Dicho vector confiere resistencia a kanamicina, utiliza un promotor inducible con IPTG y permite la obtención de una proteína recombinante que contiene en 3' un dominio oligohistidina que favorece su purificación.

18.2. Transformación de las bacterias

La transformación de las bacterias de la estirpe BL21 (DE3) con la construcción de expresión, se lleva a cabo según el protocolo descrito anteriormente.

18.3. Expresión en E.coli y purificación

Las bacterias transformadas se cultivan a 37°C en medio LB con kamamicina hasta una densidad óptica de 0,6 a 600 nm. En este momento se añadió IPTG como inductor de la expresión de la proteína recombinante, quedando dicho producto a una concentración final de 1mM. El cultivo se mantuvo a 37°C durante 4 horas y tras ello, se centrifuga a 4°C durante 20 minutos a 4000xg, se elimina el sobrenadante y se resuspende en 5 ml/g de tampón de lisis B. La incubación se realiza mezclando cuidadosamente durante 15-60 minutos a temperatura ambiente hasta completar la lisis celular, es decir hasta que el cultivo esté traslúcido. Después, el lisado celular se pasa tres veces por una aguja fina o se sonica para terminar de romper las células. Finalmente, el lisado se centrifuga durante 20-30 minutos a 10.000xg, se eliminan los restos celulares y se conserva el sobrenadante a 4°C hasta la purificación.

La purificación se fundamenta en la afinidad de la cola de histidina presente en la proteína recombinante por los iones Ni^{2+} de la resina Ni-NTA (*Quiagen*) contenida en una columna de afinidad. Previamente, 1ml de esta resina equilibrada en tampón B, se incuba con 4 ml de sobrenadante con agitación suave durante 15-60 minutos y posteriormente es dispuesta en una columna de 1,6 cm de diámetro. Los distintos lavados de la columna se llevan a cabo con tampón de lavado C hasta conseguir una absorbancia a 280 nm menor a 0.01 y la elución de la proteína con el tampón de elución, estando su pH determinado por la naturaleza de cada proteína. Se recogen distintas fracciones de elución que son analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE.

19. ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA

Las separaciones electroforéticas se realizan según el método descrito por Laemmli (1970). Para ello, se emplean geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) con distintos porcentajes de acrilamida en condiciones reductoras o no reductoras.

Una vez polimerizados el gel separador, del 10% o con gradiente del 15%-5%, y el gel concentrador del 4%, se preparan las muestras, para lo cual se diluyen a la mitad en tampón de tratamiento de muestras y se hierven durante 5 minutos.

Después de colocar los geles en los soportes de electroforesis, se carga un volumen aproximado de 20 μ l-100 μ l por muestra junto con 10 μ l de los patrones de pesos moleculares (*Sigma*).

La electroforesis se realiza en tampón puente de electroforesis a temperatura ambiente, aplicando una intensidad constante de 20-35 mA. Una vez finalizada se retira

el gel del soporte tiñéndose o no según su tratamiento posterior. Para la tinción de proteína en gel se introduce en solución de tinción donde se mantiene un mínimo de 6 horas. Transcurrido este tiempo, el gel se destiñe con la solución decolorante y se lava con agua destilada, dejándolo secar entre láminas de film transparente.

20. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Para determinar la concentración de proteína se utiliza el kit *Protein Assay* (*Bio-Rad*), basado en el método de Bradford (Bradford, 1976), que emplea como patrón una disolución comercial y determina la absorbancia a 595 nm.

Con los valores de absorbancia obtenidos para cada concentración del patrón se elabora una recta de calibrado y en ella se determina la concentración de las muestras problemas.

21. PRODUCCIÓN DE HIBRIDOMAS

21.1. Inmunización de los ratones

Los ratones son inmunizados intraperitonealmente con 10 µg de las proteínas recombinantes en los días 0, 30 y 45.

Tres días antes de la fusión se inyecta la misma cantidad vía intravenosa. En la primera inmunización las proteínas se administran homogeneizadas en adyuvante completo de Freund (*Difco*). En las siguientes, se homogenizan en adyuvante incompleto de Freund (*Difco*).

21.2. Fusión celular

Los esplenocitos, procedentes del bazo del ratón inmunizado, se disponen junto a las células de mieloma en un tubo de centrifuga de 50 ml en una proporción de 5 esplenocitos por cada célula de mieloma. Se añade al tubo medio HY (*Sigma*) y se centrifugan las células a 1.800 r.p.m. durante 10 minutos. Seguidamente, se elimina el sobrenadante y el pellet se resuspende en 1 ml de una solución de PEG 4000 al 80% en medio HY con un 16% de DMSO, añadida gota a gota. A continuación, se añade sobre las células el medio de cultivo como sigue: 2 ml durante 2 minutos, después 8 ml durante 2 minutos y, finalmente, 40 ml durante 5 minutos. Posteriormente, las células se lavan con 50 ml de medio HY, centrifugando a 1800 r.p.m., 10 minutos. Finalmente,

las células se resuspenden en el volumen adecuado de medio HY suplementado con un 10% de suero fetal bovino (*Sigma*) para tener 150.000-200.000 células en 100 μ l de medio y se disponen en placas microtiter de 96 pocillos (*Greiner*). Después de 24 horas se añade a cada pocillo 100 μ l de medio selectivo HAT.

22. INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO (ELISA)

Se emplean placas microtiter de 96 pocillos a las que es necesario adherir el antígeno siguiendo un procedimiento que dependerá de la naturaleza del mismo.

Cuando el antígeno utilizado es una proteína, esta se añade a la placa a razón de 500 ng por pocillo diluida en PBS y dejando incubar a 4°C durante una noche.

Cuando se trata de células, los pocillos de la placa han de ser previamente tratados con 50 μ l de una solución de poli L-lisina incubando 30 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se retira esta solución y se añade 50 μ l de la suspensión celular (10^5 células). Se centrifuga la placa a 2.500 r.p.m. durante 10 minutos y, tras eliminar el sobrenadante, se añaden 50 μ l de una solución de glutaraldehído. Tras incubar 15 minutos a temperatura ambiente, las placas se lavan dos veces con PBS.

Una vez el antígeno dispuesto en la placa, esta es tratada con solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se añade el anticuerpo que se quiere analizar y se deja incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar 3 veces con PBST, se dispone en cada pocillo 50 μ l de una solución 1/300 en PBS del anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón, conjugado con peroxidasa (*Sigma*) y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente

Tras efectuar otros tres lavados con PBST, se añaden 100 μ l por pocillo de una solución reveladora de ELISA. La reacción positiva de revelado se detecta por la aparición de color verde en 5-15 minutos y se detiene añadiendo 100 μ l por pocillo de solución de detención.

Son considerados como positivos aquellos resultados con un valor doble de absorbancia a 405 nm que el obtenido para los controles negativos.

23. CLONACIÓN DE LOS HIBRIDOMAS

La clonación de los hibridomas seleccionados se realiza mediante el método de la dilución límite. Para ello, se diluyen en medio de cultivo las células de cada uno de los híbridos positivos y se disponen de nuevo en cultivo de forma a obtener una única

célula por pocillo.

24. PRODUCCIÓN DE ASCITIS

Para la producción de ascitis, se inyectan ratones hembras de aproximadamente 6 semanas de edad, con 0,5 ml de pristano (ácido 2,6,10,14-tetrametildecanoico-*Sigma*) vía intraperitoneal y, a continuación, después de 7-14 días, se inyectan de la misma manera 10^6 - 10^7 células del hibridoma seleccionado que previamente se encuentran en crecimiento exponencial. El líquido ascítico se recoge por punción peritoneal a las dos semanas, aproximadamente, y se centrifuga a 3.000 r.p.m. durante 10 minutos, recogiendo el sobrenadante, que en general presenta una concentración de 1 a 10 mg/ml del anticuerpo de interés.

25. PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS EN COLUMNA DE PROTEÍNA A

El ascitis es tratado con NaCl hasta conseguir una concentración final de 3,3 M. A continuación, se le añade 1/10 de volumen de borato sódico 1M pH 8,9 y se pasa a través de una columna de proteína A, preparada con anterioridad. A continuación, se lava con 10 volúmenes de NaCl 3,0M/borato sódico 50mM pH 8,9 y un volumen de ClNa 3M/borato sódico 10mM, desechando en ambos casos el líquido de salida.

Para eluir, se llena la columna con glicina (100mM), dejando caer muy lentamente y recogiendo 15 fracciones de un volumen aproximado de 1 ml, a las que se les ajusta el pH hasta alcanzar la neutralidad con Tris 1M pH 8,0. Finalmente, se cuantifican las fracciones obtenidas en el espectrofotómetro a una densidad óptica de 280 nm, conservando las fracciones con absorbancia.

Para terminar se lava la columna con 10 volúmenes de glicina 100mM pH 3,0 y 10 volúmenes de PBS.

A continuación, para desalinizar las fracciones con absorbancia se pasan por una columna de filtración en gel utilizando Sephadex G-25 (*Pharmacia*).

Para ello se monta la columna evitando las burbujas y se conecta a la bomba peristáltica y al colector de fracciones. Tras equilibrar con al menos 10 volúmenes de PBS, se aplica la muestra y se recogen fracciones de aproximadamente 2 ml (25-30 fracciones) que se miden en el espectrofotómetro a la misma densidad óptica.

Se vuelve a seleccionar las fracciones con absorbancia y se pasan a membranas de collodium (*Sartorius*) para concentrar por vacío. Una vez concentradas todas las fracciones en un volumen aproximado de 11 ml, se desmonta el concentrador, se

recoge el contenido y se lava la membrana con 200 μ l de PBS. Finalmente, se mide la absorbancia final y se guarda el anticuerpo purificado.

26. PURIFICACIÓN DEL ANTÍGENO

La purificación del antígeno reconocido por un anticuerpo monoclonal se realiza a través de una columna de sepharosa CL-4B (*Pharmacia*) activada con CNBr de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se parte del anticuerpo monoclonal (ligando) dializado frente al tampón de acoplamiento, que posteriormente se une a la sepharosa activada. Brevemente, la sepharosa se activa con HCl 1mM y se lava con un litro del mismo ácido con un embudo Buchner y un quitasato conectado al vacío. Se vuelve a lavar con tampón de acoplamiento y se añade a 10 ml del ligando (1mg/ml), incubándose a 4°C con agitación suave durante una noche. Al día siguiente, se deja depositar la matriz de la sepharosa y se toma una alícuota de 100 μ l de sobrenadante para cuantificar proteína y comprobar la eficacia de la unión.

La sepharosa unida al ligando se incuba con 30 ml de glicina 0,4M pH 8, en agitación suave durante 2 horas a temperatura ambiente, bloqueando así los grupos activos remanentes. La matriz de sepharosa se dispone en columna vertical de 3 cm de diámetro (*Pharmacia*) y se realizan varios lavados alternando el tampón de unión y el tampón acetato. Al final, la columna se lava con PBS/ 0.1% NP-40 (nonidet-40).

El extracto de proteína, que se trata de un lisado de celular (obtenido de igual forma que para el inmunoblotting y la inmunoprecipitación, pero sin marcar) se hace pasar por una precolumna de sepharosa CL-4B, para eliminar uniones inespecíficas, y seguidamente por la columna de inmunoafinidad con el ligando. Tras lavar la columna tres veces con 2-3 volúmenes de columna de PBS/0,1% NP-40, PBS/0,1% NaCl 1M y PBS/0,05% CHAPS (ácido 3- $\{(3\text{-colamidopropil})\text{-dimetilamonio}\}$ -1-propano-sulfonado), la proteína unida a la columna se eluye con dietilamina 20mM (*Sigma*), pH 11,5 y se recoge en fracciones, que son neutralizadas con Tris 1M, pH 7.

La eficacia de la purificación se evalúa mediante SDS-PAGE e inmunoblotting.

27. INMUNOBLOTTING

En primer lugar las muestras se someten a electroforesis SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras.

Para realizar el inmunoblotting frente a las proteínas recombinantes se carga una cantidad del orden de 1 μ g/muestra; mientras que para realizarlo frente a células se

obtiene un lisado partiendo de 100×10^6 plaquetas y 50×10^6 de PBL por muestra. Posteriormente, las células son lavadas dos veces y se solubilizan en 0,5 ml de tampón de lisis celular durante una hora a 4°C y agitación fuerte. Finalmente, se centrifuga a 12.000 r.p.m. durante 20 minutos.

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se incuba en tampón de transferencia durante 20 minutos, en agitación suave y temperatura ambiente, al igual que la membrana de PVDF (difluoruro de polivinilideno), Inmobilón P (*Millipore*), previamente activada con metanol.

La transferencia se realiza en un equipo de transferencia semiseco colocando el gel sobre la membrana de PVDF, entre tres o cuatro trozos de papel Whatman 3MM (*Whatman*) mojados en tampón de transferencia, por encima y por debajo de ellos. Se elimina las posibles burbujas y se conecta el aparato a la fuente de alimentación con un amperaje obtenido de la multiplicación de la superficie de la membrana por 2,5 durante 50 minutos.

A partir de este paso todas las incubaciones realizadas en el procesamiento de la membrana se realizan con agitación suave. Así pues después de la transferencia, se corta la tira de membrana correspondiente a los patrones de pesos moleculares no biotinilados, y tantas tiras como anticuerpos a estudiar. La tira de pesos moleculares fue contrastada con una solución negro-amido, durante 5-10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la membrana se destiñe con una solución decolorante y finalmente, se lava con agua destilada y se deja secar.

El resto de las tiras, una vez recortadas y marcadas, se incuban con solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente, se lavan tres veces con PBST durante 10 minutos.

Cada una de las tiras se introducen en tubos de ensayo con 4 ml de cada uno de los sueros o sobrenadantes de los hibridomas a testar. La reacción antígeno-anticuerpo se realiza a 4°C durante toda la noche o a temperatura ambiente durante tres horas. A continuación, se lavan las tiras con PBST tres veces y se añade una solución 1/300 de anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón, conjugado con peroxidasa (*Sigma*), diluido en PBS según las condiciones del fabricante. Después de la incubación durante una hora a temperatura ambiente, se efectúa otros tres lavados con PBST. El revelado se hace en cuarto oscuro mediante el sistema de detección ECL (Emitting Chemoluminescence) (*Amershan*), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La membrana se expuso entonces a una placa radiográfica (*Kodak*) durante un tiempo oscilable de 5 minutos a varios minutos, revelándola después.

28. INMUNOPRECIPITACIÓN

28.1. Marcaje con biotina de las proteínas de membrana

Las proteínas de superficie de leucocitos y plaquetas, resuspendidas en PBS a una concentración de 20×10^6 células/ml, se marcan con 0,4 mg/ml de Sulfo-NHS-Biotina (*Pierce*), incubándose durante 15 minutos a 4°C. Después de tres lavados con PBS se solubilizan las proteínas de membrana, resuspendiendo en la mitad de su volumen inicial de tampón de lisis celular e incubando en agitación a 4°C durante 1 hora. El lisado celular obtenido se centrifuga a 12.000 r.p.m. durante 15 minutos para retirar los restos celulares, conservándose a 4°C.

En el proceso de preinmunoprecipitación se incuba en agitación a 4°C toda la noche 50 µl de suspensión de proteína G-Sepharosa (*Pharmacia*)/ml del lisado celular, preparada según las condiciones del fabricante. Finalmente, se retira la proteína G centrifugando a 1.200 r.p.m. durante 2 minutos. Con este procedimiento se consigue eliminar del lisado las uniones no específicas a la proteína G.

28.2. Inmunoprecipitación

La reacción antígeno-anticuerpo tiene lugar mediante la incubación de 500 µl del lisado celular con 1 ml de sobrenadante de los hibridomas a testar o la dilución óptima del anticuerpo policlonal en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas.

Para aumentar la capacidad de unión de la proteína G, ésta se recubre con un suero de conejo anti-isotipo inmunoglobulinas de ratón (*Pierce*) en una dilución 1/10 de tampón de lisis celular, agitando durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la proteína G se lava tres veces con tampón de lisis, centrifugándose durante 2 minutos a 2.000 r.p.m..

A continuación, se añaden 50 µl de la Proteína G-Sepharosa recubierta a la reacción antígeno-anticuerpo y se incuba 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Los complejos antígeno-anticuerpo unidos a la proteína G se centrifugan durante 5 minutos a 2.000 r.p.m., desechando el sobrenadante y lavando tres veces en tampón de lisis.

Después del último lavado, los inmunoprecipitados se tratan para la SDS-PAGE.

28.3. Electroforesis, transferencia y revelado

Las muestras se someten a electroforesis SDS-PAGE de 5%-15% en condiciones reductoras o no reductoras. Las proteínas separadas en función de su peso molecular se transfieren a membranas de PVDF, Inmobilon P, como se ha descrito anteriormente.

La membrana con las muestras transferidas se incuba con solución de bloqueo durante 1 hora, en agitación suave y temperatura ambiente. Después se lava tres veces con PBST y se incuba con una solución de Streptavidina-HRP (*Amersham*) 1/500 en PBST durante una hora en agitación suave y oscuridad, volviendo a lavar tres veces en PBST. Finalmente se revelan empleando el sistema de detección del luminol, con las soluciones comerciales de ECL, descrito con anterioridad.

29. INMUNOHISTOQUÍMICA

29.1. Muestras de tejidos

29.1.1. Procedencia de las muestras

Las muestras de tejidos utilizadas en el estudio inmunohistoquímico proceden del archivo del *Servicio de Diagnóstico del Departamento de Anatomía y Anatomía patológica Comparadas de la Universidad de Córdoba*. Dichas muestras pertenecen a dos grupos de cerdos: cerdos de matadero y cerdos remitidos para su estudio anatomopatológico al servicio mencionado. En el primer caso, las muestras pertenecían a cerdos sanos, mientras que en el segundo, se trataba de animales remitidos para su estudio *postmortem* y diagnóstico al *Departamento*.

29.1.2. Tipo de muestras

Han sido utilizadas muestras de tejido de ganglios linfáticos, bazo, pulmón, hígado, riñón, timo, intestino, placas de Peyer, tonsilas y médula ósea.

29.1.3. Procesado de las muestras

Todas las muestras se fijaron por inmersión durante un mínimo de 24 horas, pero los fijadores utilizados fueron diferentes en los dos grupos de cerdos; así, las

muestras de los animales de matadero se fijaron en líquido de Bouin, y las muestras de los animales remitidos al *Departamento* se fijaron en formol tamponado al 10%. Después de la fijación, el procesado histológico de las muestras fue similar. Las muestras fijadas fueron talladas por el personal del *Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba* y, tras el tallado, se incluyeron en parafina en un procesador automático.

29.1.4. Preparación de los cortes de tejido

Para los estudios inmunohistoquímicos se utilizaron cortes de tejido de 4 µm de grosor montados sobre portaobjetos tratados con Vectabond (*Vector*), obtenidos por microtomo.

29.2. Desarrollo de las técnicas inmunohistoquímicas

Las dos técnicas inmunohistoquímicas utilizadas son técnicas indirectas de tipo puente basadas en la unión no inmunológica de la avidina (Técnica del ABC) o de la estreptavidina con la biotina (Palacín Forgue A., 1984). El desarrollo de ambas técnicas tiene tres partes fundamentales: la preparación de los cortes de tejido, el desarrollo de la reacción antígeno-anticuerpo y coloreado de dicha reacción.

29.2.1. Preparación de los cortes de tejido

En primer lugar, las muestras son desparafinadas mediante tres baños, de 10 minutos cada uno, en xilol (*Panreac*). Se hidratan al principio con dos baños en etanol absoluto, de 10 minutos cada uno. Después se inhibe la actividad peroxidasa endógena en los cortes analizados con la técnica del ABC, mediante la incubación de los cortes de tejido con peróxido de hidrógeno (*Merck*) al 3% en metanol durante 30 minutos, en agitación suave y a temperatura ambiente. La hidratación finaliza mediante incubaciones sucesivas en alcoholes de gradación decreciente y un lavado en agua (5 minutos en etanol de 96° y 5 minutos en etanol de 70° y, por último, agua destilada).

Tras lavar los cortes de tejidos en PBS (tres veces, 5 minutos cada una), los cortes de tejidos son incubados en suero normal de cabra (*Vector Laboratories*), diluido al 10% en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente, bloqueando así los sitios libres de unión a las muestras. Para la detección de CD3, usado como marcador de linfocitos T o pan-T, a la hora de facilitar la interpretación de los resultados

obtenidos con los anticuerpos a caracterizar, después del primer lavado de PBS se incuban durante 10 minutos con pronasa (10% (p/v) PBS) (*Sigma*) como desmascaramiento antigénico, siguiendo después el mismo protocolo que para el resto de muestras. Otro marcador que también se usa para facilitar la interpretación de los resultados es un anticuerpo que reconoce el factor VIII (anti-factor VIII-*Dako*), marcador de plaquetas y células endoteliales, sin necesitar ningún tratamiento enzimático previo para el desarrollo de la reacción antígeno-anticuerpo.

29.2.2. Desarrollo de la reacción antígeno-anticuerpo (incubación con los anticuerpos específicos)

La incubación con los sobrenadantes de los distintos anticuerpos monoclonales o con la dilución pertinente del anticuerpo policlonal, como del CD3 y del factor VIII, da como resultado la reacción antígeno-anticuerpo. Dicha reacción se lleva a cabo en incubación en cámara húmeda durante 18 horas a 4°C.

29.2.3. Coloreado de la reacción antígeno-anticuerpo para su visualización en microscopía óptica

Pasado este tiempo, se dejan los cortes de tejido atemperar durante 1 hora, tiempo tras el cual se realizan tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS. Se añade a continuación un anticuerpo anti-inmunoglobulina G de ratón, desarrollado en cabra, y conjugado con biotina (*Dako*) diluido 1/20 en PBS con 10 % de suero normal de cabra, en todas las muestras excepto para el CD3, y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente. En el caso del CD3, el anticuerpo secundario a usar es un anticuerpo anti-inmunoglobulina de conejo conjugado con biotina (*Vector*) a una dilución 1:200, en iguales condiciones que el anterior. Tras lavar de nuevo tres veces con PBS, los cortes de tejido son incubados con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) (*Sigma*) diluido 1/50 en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad, si la técnica es la del ABC. Si la técnica a utilizar es la de la estreptavidina-biotina-fosfatasa alcalina el conjugado a usar es biotina-estreptavidina-fosfatasa alcalina sin diluir (*Biogenex Super Sensitive ready-to-Use Detection Kit*), siendo las mismas condiciones de reacción que para el ABC.

Finalmente, los cortes se lavan tres veces con PBS y se exponen al cromógeno adecuado dependiendo de la enzima que cataliza el revelado. Si la enzima es la peroxidasa de rábano picante, los cortes se tratan durante 1 minuto con el cromógeno 3.

3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro (*Sigma*) diluido al 0,5% en solución Tris con 0,3 % de peróxido de hidrógeno, que actúa como substrato, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los cortes de tejido se lavan en agua corriente durante 10 minutos y el siguiente paso es la contratinción nuclear con hematoxilina de Mayer durante 1 minuto. Después de un lavado de 5 minutos en agua para eliminar los restos de colorante, se procede a deshidratar los cortes, para su conservación, en alcoholes de gradación creciente: se sumergen unos segundos en etanol de 70° y de 96°, 2 incubaciones cada una de 1 minuto en etanol absoluto y otras dos de 1 minuto en xilol. Finalmente, los cortes histológicos se montan con Eukitt (*O. Kindler GmbH & Co.*) En cambio si la enzima es la fosfatasa alcalina, el cromógeno a usar es 4-cloro-2-metil-benzenodiazonio (*Fast red*) y se utiliza a una dilución 20% (p/v) en tampón Tris-HCl con naftol (substrato del kit). Después de preparar el cromógeno y diluirlo, se filtra con filtros Millipore de 0.45 µm y se revela hasta desarrollarse el color. Los siguientes pasos después del revelado son iguales al sistema de la peroxidasa, parada de reacción y lavados. Sin embargo, en esta ocasión las muestras no se deshidratan, al desvanecerse el color de la reacción, siendo el montaje, por lo tanto, con medio acuoso de Shandon Inmuno-Mount (*Sigma*). Finalmente, los cortes histológicos montados son fotografiados en un fotomicroscopio.

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE LA SUBUNIDAD β_1 DE LAS INTEGRINAS PORCINAS (CD29)

Para la caracterización del gen que codifica la integrina β_1 porcina o CD29 se utilizó una genoteca de ADNc construida a partir de ARNm procedente de distintos tejidos porcinos (linfocitos, tiroides, hígado, glándula parótida, cerebro, riñón y glándula suprarrenal) y el sistema *ZAP Express Vector/Gigapack Cloning Kit* (*Stratagene*). Esta genoteca multi-tejido, amablemente cedida por el Dr. Patrick Chardon (*Laboratoire de Radiobiologie Appliquée et D'Etude du Genome, INRA-CEA, Jouy-en Josas, Francia*), fue rastreada con una sonda específica del gen CD29 porcino.

1.1. Obtención de la sonda CD29

La sonda CD29 específica, de una longitud 580 pb, fue producida por RT-PCR mediante empleo de cebadores (P1/P2) correspondientes a regiones comunes, y por lo tanto conservadas, de las secuencias CD29 humano (Argaves et al., 1987) y bovino (McLaren y Wildeman, 1995). La secuencia de dichos cebadores se muestran en la **Tabla 4** de Materiales y Métodos (página 43).

El procedimiento se llevó a cabo sobre ARN total procedente de distintos tejidos porcinos: bazo, timo, células mononucleadas de sangre periférica y médula ósea. En todos los tejidos analizados se obtuvo una banda de amplificación del tamaño esperado (**Figura 7**).

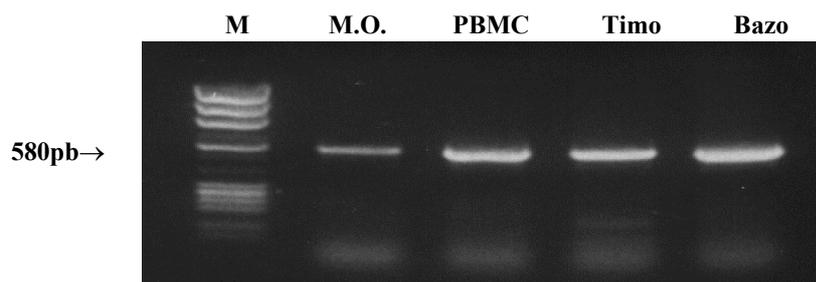


Figura 7: Obtención de la sonda CD29. Resultado de la PCR llevada a cabo sobre distintos tejidos porcinos. M: ϕ x174HaeIII; M.O.: médula ósea.

La amplificación obtenida en bazo, correspondiente a la banda de mayor intensidad, fue clonada en *pGEM-T*, secuenciada y posteriormente marcada con digoxigenina (DIG) mediante PCR. Finalmente, con objeto de conocer la naturaleza de la secuencia obtenida, fue analizado su nivel de homología frente a la base de datos de secuencias *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mediante el programa *BLAST*. El

resultado obtenido reveló un elevado grado de homología con las secuencias de los genes CD29 caracterizados en distintas especies. En la **Figura 8** se muestra sólo el resultado de la comparación con las secuencias humana y bovina, que manifiesta un nivel de homología del 91,7 % y 94,9%, respectivamente.

Humano	C T G G A G A T G G G A A A C T T G G T G G C A T T G T T T T A C C A A A T G A T G G A C A	1016
Cerdo	C T G G A G A T G G G A A A C T T G G T G G C A T T G T T T T A C C A A A T G A T G G A C A	1160
Vaca	C T G G A G A T G G G A A A C T T G G T G G C A T C T T T T A C C G A A T G A T G G A C A	845
Humano	A T A A T T G T A C A C A A A T G A G C C A T T A T T A G A T T A T C C T T C T A T T G C T C A C C T T G T C C A G A	1076
Cerdo	A T G A T G T T A C A C A A A T G A G C C A T T A T T A C G A T T A T C C T T C T A T T G C T C A C C T T G T C C A A A	1220
Vaca	A T G A T G T G T A C A C A A A T G A G C C A T T A T T A C G A T T A T C C T T C T A T T G C T C A C C T T G T C C A G A	905
Humano	A A C T A G G A A A A T A A A T T C A G A C A T T T T T G C A G T T A C T G A A G A A T T T C A G C C T G T T T	1136
Cerdo	A A C T A A G C G A A A A T A A C A T T C A G A C G A T T T T T G C A G T T A C T G A A G A A T T T C A G C C T G T T T	1280
Vaca	A A C T A A G C G A A A A T A A C A T T C A G A C G A T T T T T G C A G T T A C T G A A G A A T T T C A G C C T G T T T	965
Humano	A C A A G G A C C T G A A A A A T T T G A T C C C T A A G T C A G C A G T A G G A A C A T T A T C T G C A A A T T C T	1196
Cerdo	A C A A G G A A C T G A A A A A T T T G A T C C C A A G T C A G C A G T A G G A A C A T T A T C T G C A A A T T C C A	1340
Vaca	A C A A G G A A C T G A A A A A T T T G A T C C C T A A G T C A G C G T A G G A A C A T T A T C T G C A A A T T C C A	1025
Humano	G C A A T G T A A T T C A G T T G A T C A T T G A T G C A T A C A A T T C C C T T T C C T C A G A A G T C A T T T T G G	1256
Cerdo	G C A A T G T A A T T C A G T T G A T C A T T G A T G C A T A C A A T T C C C T T T C C T C A G A A G T C A T T T T G G	1400
Vaca	G C A A T G T G A T T C A G T T G A T C A T G A T G C A T A C A A T T C C C T T T C C T C A G A A G T C A T T T T G G	1085
Humano	A A A A C G C A A A A T T G C A G A A G G A G T A A C A A T A A T T A C A A A T C T T A C T G C A A G A A G G G G	1316
Cerdo	A A A A C A G C A A A T T C A G A A G G A G T A A C A A T A A A T T A C A A A T C T T A C T G C A A A A A T G G G G	1460
Vaca	A A A A C A G C A A A T T G C G A A G G A G T A A C A A T A A A T T A C A A A T C T T A C T G C A A G A A T G G G G	1145
Humano	T G A A T G G A A C A G G G G A A A A T G G A G A A A A T G T T C C A A T A T T T C C A T T G G G A T G A G G T T C	1376
Cerdo	T G A A T G G A A C A G G G G A A A A T G G G A G A A A A T G C T C C A A T A T T T C C A T T G G G G A T G A G G T T C	1520
Vaca	T G A A T G G A A C A G G G G A A A A T G G G A G A A A A T G C T C A A T A T T T C C A T T G G G G A T G A G G T T C	1205
Humano	A A T T T G A A A T T A G C A T A A C T C A A A T A A T G T C C A A A A A A G A G A T T T C T G A A C C T T T A A A A	1436
Cerdo	A T T T T G A A A T T A G C A T A A C T G C A A A T A A A T G T C C A A A T A A G A A T T C T G A A A C A T T A A A A	1580
Vaca	A T T T T G A A A T T A G C A T A A C T G C A A A T A A A T G T C C A A A T A A G A A C T C T G A A A C C A T T A A A A	1265
Humano	T T A G C C T C T G G G C T T A C G A G G A A G T A G A G T T A T C C T T C A G T C A T C T	1487
Cerdo	T T A A G C C T C T G G G C T T C A C T G A G A A G T A G A G A T A T C C T T C A G T T C A T C T	1632
Vaca	T T A A G C C T C T G G G C T T C A C T G A G A A G T G A G A T T A T C C T T C A G T T C A T C T	1316

Figura 8: Homología de la secuencia usada como sonda (P1/P2) en tres especies: humano, cerdo y vaca. Los nucleótidos discordantes se destacan en azul.

1.2. Rastreo de la genoteca

La genoteca fue hibridada con la sonda específica sobre aproximadamente 10^6 pfu, obteniendo 8 clones positivos (1, 2.1, 2.2, 3, 4.1, 4.2, 6 y 8). La especificidad de dichos clones se confirmó mediante PCR con los cebadores específicos P1/P2 (**Figura 9**).

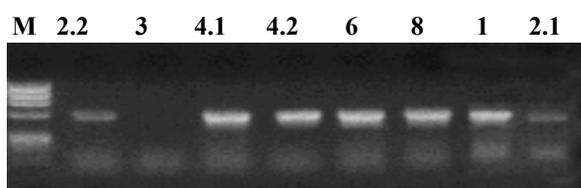


Figura 9: PCR sobre los clones seleccionados del primer rastreo con los cebadores P1/P2. M: λ 174HaeIII.

Como se observa en la **Figura 9**, el clon 3 resultó inespecífico en la PCR y fue descartado, junto con el clon 6 que posteriormente no se logró escindir. El procedimiento de escisión se llevó a cabo con los 6 clones restantes, cuyo material genético fue purificado y a continuación sometido a restricción con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* con el fin de conocer el tamaño del inserto contenido en el vector recombinante. El resultado de la digestión con las enzimas de restricción se muestra en la **Figura 10**, de la que se deduce que los mayores insertos son los contenidos en los clones 4.2 y 8.

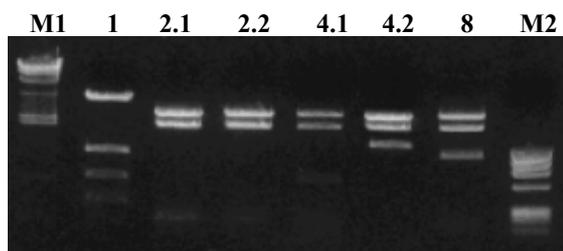


Figura 10: Digestiones dobles (*EcoRI/XhoI*) de los clones escindidos. M1: λ *HindIII* y M2: ϕ *x174HaeIII*.

La secuenciación de ambos clones puso de manifiesto que únicamente el clon 4.2, identificado como **CD29-4.2**, contenía la secuencia completa del gen CD29 porcino.

1.3. Secuencia completa del gen CD29 porcino

El análisis de la secuencia del inserto del clon **CD29-4.2** que se muestra en la **Figura 12** reveló una secuencia de ADNc de 3.838 pb, que contenía una región flanqueante 5' no traducida, de 247 pb, una fase abierta de lectura de 2.397 pb y una región flanqueante no traducida en 3' de 1.194 pb.

La fase abierta de lectura genera un péptido deducido de 798 aminoácidos; comienza con el codón de inicio ATG, que se localiza a 248 nt del extremo 5' y finaliza con el codón fin de mensaje TGA que se sitúa en la posición 2.642 nt.

La secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia nucleotídica de CD29 porcina presenta el perfil de hidrofobicidad que se muestra en la **Figura 11**. En este perfil se pueden apreciar dos regiones predominantemente hidrofóbicas. La primera región, que representaría al péptido señal, se localiza en la región amino terminal y está constituida por los primeros 20 aminoácidos. La segunda región hidrofóbica se encuentra en el extremo carboxilo terminal y está constituida por 23 aminoácidos, representando con probabilidad el único dominio transmembranario de la molécula. A

continuación se observa una región predominantemente hidrofílica, de 47 aminoácidos, que correspondería al dominio citoplásmico. En este dominio se localizan dos sitios potenciales de fosforilación, tiroxina 763 y treonina 769, también conservados en otras subunidades β de las integrinas (Lerea et al., 1999; Schaffner-Reckinger, 1998). La existencia de estos dominios y de un sitio probable de escisión del péptido señal entre los aminoácidos 20 y 21 manifiesta la similitud entre la estructura de la molécula CD29 porcina y otras cadenas β integrinas caracterizadas hasta el momento: existencia de un dominio extracelular (21 aa-728 aa), un dominio transmembranario (729 aa-751 aa) y un dominio citoplasmático (752 aa-798 aa) (**Figura 12**).

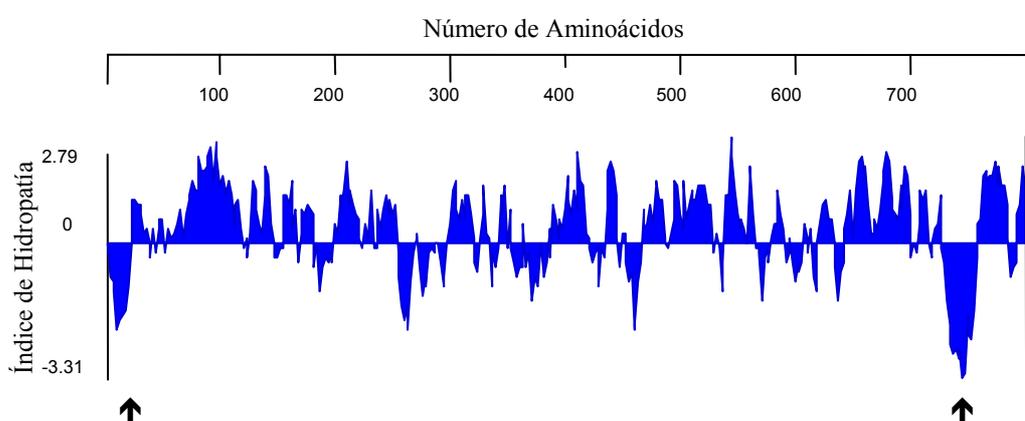


Figura 11: Análisis de hidrofobicidad de la secuencia peptídica CD29 porcina por el método de Kyte-Doolittle. Las flechas señalan las regiones hidrofóbicas correspondientes al péptido señal y al dominio transmembranario. La escala horizontal representa el número de aminoácidos y la vertical el índice de hidropatía.

Por consiguiente, excluyendo la secuencia señal, el polipéptido CD29 maduro porcino constaría de 778 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 88.277 daltons, menor que el evidenciado para esta proteína en SDS-PAGE (115.000 daltons) por Richard et al. (1998). Sin embargo, como se observa en la **Figura 12**, la secuencia de CD29 porcina contiene 12 sitios potenciales de N-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr donde X no puede ser Pro). Asumiendo que las cadenas de los hidratos de carbono, con un peso molecular medio de 2.500, se unieran a los 12 sitios de glicosilación, el peso molecular total de la molécula de CD29 porcina madura sería de aproximadamente 116.248 daltons, valor más acorde con el tamaño de CD29 porcina obtenido por SDS-PAGE.

La secuencia CD29 porcina es rica en cisteínas al contener 57 restos de este aminoácido (7,2% del total), todos ellos situados en el dominio extracelular, excepto uno que se localiza en el péptido señal. La mayoría de las cisteínas presentes en la molécula están dispuestas en un dominio localizado cerca del dominio transmembranario (**Figura 12**).

```

ggcacgagcggcgccgctgaggagctggattgccgcgaggaggcggtgccgccccgcttctcctgc
caggaggcgccccgcctcgcagagctctcctcctcccgcggcgaagaggaggagctgccgccccgcccgcgca
cggcggggagccaccagcctcggacagccgagcgggagctcggagagcgtggtggagccagccgccccggcg
ccgcgggagaagATGAAATTTACAACCTGATTTCTGGATTGGACTGATCAGTTTTCAGTTTGTATGTGTTTGGCCAAAGCAGAT
316
M N L Q L I F W I G L I S S V Y V F G Q A D
23
GAAAATAGATGTTTAAAGCAAATGCCAAATCATGTGGAGAGTATACAAGCAGGGCCAAATTTGGATGGTGCACAAAT
397
E N R L K A N A K S G E I Q A G P N G W T N
50
TCAACATTTTACAAGAAGGAATGCCTACTTCTGCTCGATGTGATGATTTGGAAGCCTTAAGAAAGAAGGGTTGTCAATCCA
478
S T F L Q E G M P T S A R D D L E A L R K K G H P
77
GATGACATTGAAAATCCCAGAGGCTCCAAAATATAAAGAAAAATAAAATGTAACCAACCGTAGCAAAGGGACAGCAGAG
559
D D I E N P R G S K N I K K N K N V T N R S K G T A E
104
AAGCTGCAGCCGGAAGATATCACTCAGATCCAAACCACAGCAGTTGGTTTTGTCAGTTACGATCAGGGGAGCCACAGACGTTT
640
K L Q P E D I T Q I Q P Q Q L V L Q L R S G E P Q T F
131
ACGTTGAAATCAAGCGAGCCGAGGACTATCCCATTGATCTCTACTACCTTATGGACCTCTCCTACTCCATGAAAGCAGC
721
T L K F K R A E D Y P I D L Y Y L M D L S Y S M K D
158
TTGGAGAACGTTGAAAGCCTTGGAACAGATCTGATGAATGAAATGAGGAGGATTAAGTTCAGACTCCGAAATGGATTTGGC
802
L E N V K S L R T D L M N E M R R I T S D F R I G F G
185
TCTTTTGTGAAAAAAGTGTGATGCCTTACATTAGCACAAACCAGCTAAGCTCAGGAACCTTGCACAAGTGAACAGAAC
883
S F V E K T V M P Y I S T T P A K L R N P T S E Q N
212
TGTACCAGCCATTTAGCTACAAAATGTCTCAGCCTTACTGATAAAGGGGAAGTATTAATGAACTTGTGGTAAACAG
964
T S P F S Y K N V L S L T D K G E V F N E L V G K Q
239
CCCATATCTGGAATTTGGATTCTCCAGAAGGTGGCTTGTATGCAATCATGCAAGTTGCCGTTTGTGGATCTTTGATTTGGC
1045
R I S G N L D S P E G G F D A I M Q V A V G S L I G
266
TGGAGGAATGTTACACGGCTGCTGGTGTTTTCCAGGATGCCGGTTTCACTTTGCCGGAGATGGGAACTTGGTGGCATT
1126
W R N V T R L L V F S T D A G F H F A G D G K L G G I
293
GTTTTACCAAAATGAGGATATCACTGGAATAATGATGATACACAATGAGCCATTACTACGATTATCCTTCTATTGCT
1207
V L P N D G H H L E N D V Y T M S H Y Y D Y P S I A
320
CACCTTGTCCAAAATAAGCGAAAATAACATTAGCAGGATTTTGCAGTTACTGAAGAATTTACGCTGTTTACAAGGAA
1288
H L V Q K L S E N N I Q T I F A V T E E F Q P V Y K E
347
CTGAAAATTTGATCCCAAGTACAGCAGTAGGAACATTATCTGCAAAATCCAGCAATGTAATTCAGTTGATCATTGATGCA
1369
L K N L I P K S A V T L S A N S S N V I Q L I I D A
374
TACAATTCCTTTCCTCAGAAGTCAATTTGGAAGAACAGCAATTACCAGAAGGAGTAACAATAAATACAATCTTACTGC
1450
Y N S L S S E V I L E N S K L P E G V T I N Y K S Y
401
AAAAATGGGGTGAATGGAACAGGGGAAACGGGAGAAAATGCTCCAATATTCCATTTGGGGATGAGGTTCAAGTTGAAAT
1531
K N G V N G T G E N G R K S N I S I G D E V Q F E I
428
AGCATAAATGCAATAAATGTTCAAAATAAGAAATTTGAACTATTAATAAATGAGCCTTGGGCTTCACTGAAGAAGTAGAG
1612
S I T A N K P N K N S E T I K I K P L G F T E E V E
455
ATAATCCTTCAAGTTCATGCGAATGTGAATGCCAGAGCGAGGGCATCCCCAGCAGCCCAAGTGCATGACGGCAATGGG
1693
I I L Q F I E E Q S E G I P S S P K H D G N G
482
ACGTTTGTAGTGTGGGCTGCAGGTGCAACGAGGAGCGTGTGGGAGACATTTGTAATGTAGCACAGACGAAGTGAACAGT
1774
T F E G A R N E G R V G R H E S T D E V N S
509
GAAGCATGGACCGTTACTGCAGGAAAGAGAACAGTTACAGAAATCTGTACCAACAATGGAGAGTGTGTCTGCGGACAGTGT
1855
E D M D A Y R K E N S E I T N N G E V G Q
536
GTATGTAGGAGAGGGATAATACAAAAGAAATTTATTTGCGAAATTTCTGCGAGTGTGATAATTTCAACTGTGATAGATCC
1936
V R K R N T D S P E G I Y S G K F E D N F N D R S
563
AATGGCTTAATTTGGAGGAAATGGTGTTCGAAAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTG
2017
N G L I G G N G V K R V E N P N Y T G S A C
590
GACTGTCTTGGATACTACGTCCTGCATGGCTGTAATGGACAGATCTGCAATGGCCGGGTGTCTGTGAATGGGGGTC
2098
D S L D T T S M A V N G Q I N G R G V E G V
617
TGTAAGTGTACAGATCCCAAGTTCCAAGGGCCAACTTGTGAGATGTGTGAGACTGCTGAGACTGCTGAGACTGAGACTG
2179
K T T D P K F Q G P T E M Q T L G V A E H K
644
GAATGTGTTCAAGTGCAGGCTTCAATAAAGGAGAAAGAAAGATACATGTGCCAGGAATGTTTCAATTTCAACATTACC
2260
E V Q R A F N K G E K K D T A Q E S H F N I T
671
AAGGTTGAAAATCGGGACAATTTGCCCCAGCGCCAGGCTGATCCCTTGTCCATTGTAAGGAGAAGGACGTTGATGAT
2341
K V E N R R D K L P Q P G Q V D P L S H K E K D V D D
698
TGCTGGTCTACTTACATCTCGTGAATGGGAACAATGAGGCCACTGTTTCAATGTTGTAGAGACTCCAGAGTGTCCCACT
2422
W F Y F T Y S V F V N G N N E A T V H V V E T P E P T
725
GGTCCAGACATTTTCAATTTGATGCTGGTGTGTTGCTGGAATTTGTTTCAATTTGCGCTTGCAGTGTCTGCTCATTGGAAK
2503
G P D I I P I V A G I V L I G L A L L I W K
752
CTTTAATGATTATTCACGACAGAAGGGAATTTGCCAAATTTGAAAAGGAAAAAATGAATGCCAAATGGGACACGGGTGAA
2584
L L M I I H D R R E F A K F E K E K M N A K W D T G E
779
AATCCGATTTAAGAGTGCCTGACACCGTTGTCAATCCGAAGTATGAGGGAAAATGAgcagtgctgagcagatctcag
2665
N P I Y K S A V T T V V N P K Y E G K
798
cactgaatgccaaagttagtaactgcagtcacagtgaggtagcttcaggcagcgtgccaaaggtcgctatgggcaggttct
2746
gaaaatgtataatgtataattgaaatTTTTTTTATTTTAAATTTGAAATTAATGTTATCACCAATGCCAGGACTGACAAA
2827
agacttgagacgggtaggtatcctgtcagctaaagtcacattgtgcctTTTTGACCTTTCTCCTGTAACATTGAAATG
2908
goagctctcattggattaagtgatatttctagagtgattgaaagacagtagtttaaagtaatgagtagtggtagagtagt
2989
tgttagtcaggtattaaaactgatttttagctttgagatagtcggttttcagttacacagaatccaaagtaaatggttt
3070
tctagctagtttagaattgtcctaagttatttttgcattttgctaatatgagacatgactgatgacatatctgaga
3151
gatgggtatgtgggagttactggtgtaaaataatgaaatctctgactcctaagccataggaaaagtcagttgggaggg
3232
gaaaaatgtagctttaaaacctggtgcccattttaagagttacttaactcctggttaacttttagccttctcttttaatt
3313
caagccttgataaaaagttgggaaatTTTCTGCAAAAAAAGTCTTATTAGCGTTATTACATAAAGGCTTAAT
3394
tacatgacttgcataactcaggacctttgggtgaaatTTTATTTTCAATTTTATTTTAAAGCCTGGTGCCTTTT
3475
atcacctctcttctaatcatttaagtattttgtttgcaattttgggtgaaagcttttttttaactcagtagctttttgttga
3556
tgttttagctgtacagttgcttttaaatgacatgtaagttgtagctgtggttatgcaaacagctatcacttaagcagtt
3637
cttacttctcatttcagtttagtctgtaagagaccactgtatatttactcctcactgtttgaattccggtttttgtttcata
3718
ctagtcacattcttatttaagtgccttttaatttaacagttcactttttacagtgctgtttactgaggtattttattga
3709
ataaaaatgctgtaaaatTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
3838

```

Figura 12: Secuencia del clon *CD29-4.2*. ADNc que codifica para la proteína CD29 porcina y secuencia de aminoácido deducida. Péptido señal: negro; sitios potenciales de N-glucosilación: gris claro; cisteínas: gris oscuro; dominio extracelular: azul; dominio transmembranario: rojo; dominio citoplasmático: verde; sitios potenciales de fosforilación: rosa; codón de inicio y terminación de lectura: en negrita.

1.4. Comparación de la secuencia CD29 porcina con otras moléculas CD29

La secuencia de aminoácidos de la molécula CD29 porcina fue comparada con sus homólogas caracterizadas en distintas especies. El procedimiento se llevó a cabo, considerando la secuencia completa y cada uno de los dominios estructurales por separado, mediante el empleo del programa *Megalign* perteneciente al software integrado de análisis de secuencias *DNASTAR's Lasergene*. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 7**.

ESPECIE	PS	EX	TM	CI	TOTAL
Vaca	No	98,0	100	100	98,2
Humano	85	94,1	100	100	94,4
Rata	80	91,9	100	100	92,4
Gato	90	97,7	100	97,8	97,6
Ratón	73,7	92,5	100	100	92,5
Pollo	25	84,9	100	100	84,5
<i>Xenopus</i>	20	79,6	100	100	79,6
<i>Ictalurus</i>	15	73,0	91,7	97,8	73,3

Tabla 7: Porcentajes de similitud entre la secuencia del gen CD29 de cerdo y sus homólogas en otras especies, considerando la secuencia completa y cada uno de los dominios estructurales por separado. PS: péptido señal; EX: extracelular; TM: transmembranario; CI: citoplasmático.

La comparación de la secuencia aminoacídica porcina con sus homólogas en distintas especies presentó un alto grado de conservación de aminoácidos, presentando un porcentaje de homología del 98,2% con CD29 bovina (*GeneBank Accession*: U10865), 97,5% con CD29 felina (*GeneBank Accession*: U27351), 94,4% con CD29 humana (*GeneBank Accession*: X07979), 92,5% con CD29 murina (*GeneBank Accession*: X15202), 92,4% con CD29 de rata (*GeneBank Accession*: U12309), 84,5% con CD29 de pollo (*GeneBank Accession*: M14049), 79,6% con CD29 del anfibio *Xenopus laevis* (*GeneBank Accession*: M20140) y 73,3% con CD29 del pez teleosteo *Ictalurus punctatus* (*GeneBank Accession*: AF224337).

Considerando los diferentes dominios estructurales por separado, el estudio de comparación de nuevo pone de manifiesto el gran nivel de conservación resultante en todas las especies estudiadas. Este grado de conservación afecta, en general, a todas las regiones estructurales de CD29, aunque es más evidente en los dominios transmembranario y citoplasmático, que son prácticamente idénticos en todas las especies, y muestra un menor nivel de conservación en lo que respecta a la secuencia

del péptido señal que únicamente se conserva entre los mamíferos, y en menor grado, considerados en el estudio.

La relación filogenética entre las especies comparadas en este trabajo con base en la secuencia nucleotídica del gen CD29, fue estimada mediante cálculo de distancia genética por el método Clustal (Higgins y Sharp, 1989). El resultado se muestra en la **Figura 13**, confirmando los resultados obtenidos anteriormente en el estudio de homología. Así, se puede observar que aves, anfibios y peces son las especies evolutivamente más alejadas del cerdo, en correspondencia con su menor homología a nivel de secuencia del gen CD29. De la observación de la **Figura 13** también se puede deducir que las especies de mamíferos comparadas se agrupan en un núcleo común diferenciado del resto, debido al alto porcentaje de conservación que presenta el gen CD29 en estas especies, si bien la divergencia evolutiva de roedores parece ser, con respecto a humano, que tuvo lugar con anterioridad a la diferenciación de los animales domésticos.

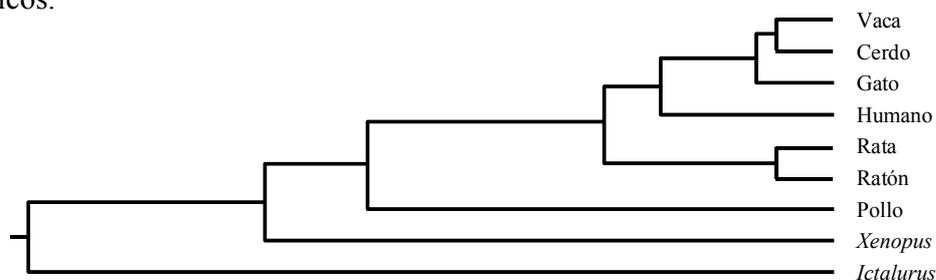


Figura 13: Análisis filogenético de CD29 en distintas especies.

La comparación entre las secuencias aminoacídicas de las diferentes especies se representa en la **Figura 14**, de la que se deduce que todas ellas comparten elementos estructurales comunes, destacando la conservación de 56 restos de cisteína presentes en el dominio extracelular. Un residuo adicional de cisteína presente en el péptido señal porcino estaría también conservado en la secuencia de los mamíferos y en la del único representante de aves estudiado. A este respecto, nada conocemos de la secuencia señal bovina al no estar disponible en la base de datos.

Como se observa en la **Figura 14**, muchas de las cisteínas (31 restos) estarían dispuestas en un dominio rico en cisteína, constituido por una secuencia de 40 aa repetida en tándem. Esta característica estructural de la integrinas se conserva en todas las moléculas CD29 consideradas en este análisis de homología.

En la **Figura 14**, también se observa que los 12 sitios de N-glucosilación de la secuencia porcina están conservados en todos los mamíferos. Además, 3 de estos lugares de glucosilación son exclusivos en estas especies, pero los 9 restantes están conservados en la secuencia de pollo. Finalmente, *Xenopus* e *Ictalurus*, presentan un

menor número de lugares de glucosilación, 8 y 7, respectivamente, todos ellos presentes en todas las especies.

Table with multiple columns showing amino acid sequences for various species (C, V, H, R, G, RN, P, X, I) across different regions (PEPTIDO SEÑAL, CD29, DOMINIO TRANSMEMBRANARIO, DOMINIO CITOPLASMÁTICO). Residues are color-coded: grey for cysteine, black for N-glycosylation sites, and red for phosphorylation sites.

Figura 14: Análisis de homología de la secuencia de aminoácidos de CD29 en distintas especies: vaca (V), cerdo (C), humano (H), rata (R), gato (G), ratón (RN), pollo (P), Xenopus laevis (X) e Ictalurus punctatus (I). Residuos de cisteína: gris fuerte; sitios de N-glucosilación: negro; sitios de fosforilación: rojo. La secuencia resaltada en gris claro corresponde al dominio rico en cisteína estando numerados los restos que constituyen las cuatro repeticiones en tándem.

1.5. Localización cromosómica del gen porcino CD29

Para la localización se utilizó un panel de células híbridas somáticas cerdo-roedor desarrollado por Yerle et al. (1996). La localización cromosómica se logró gracias a la segregación concordante de los resultados de PCR, usando cebadores de CD29 específicos y los fragmentos de cromosomas que contienen las células híbridas, como se detalla en Materiales y Métodos. Se detectó una banda específica porcina de 361 pares de bases en 14 híbridos (híbridos 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 18, 20, 21, 25 y 26) entre los 27 híbridos que constituían el panel (**Figura 15**). Estos resultados permitieron localizar al gen CD29 en la región q17 del cromosoma porcino 10 (SSC10), con una probabilidad de 0.89, un grado de error inferior al 0.1% y dos clones discordantes (híbridos 9 y 19).

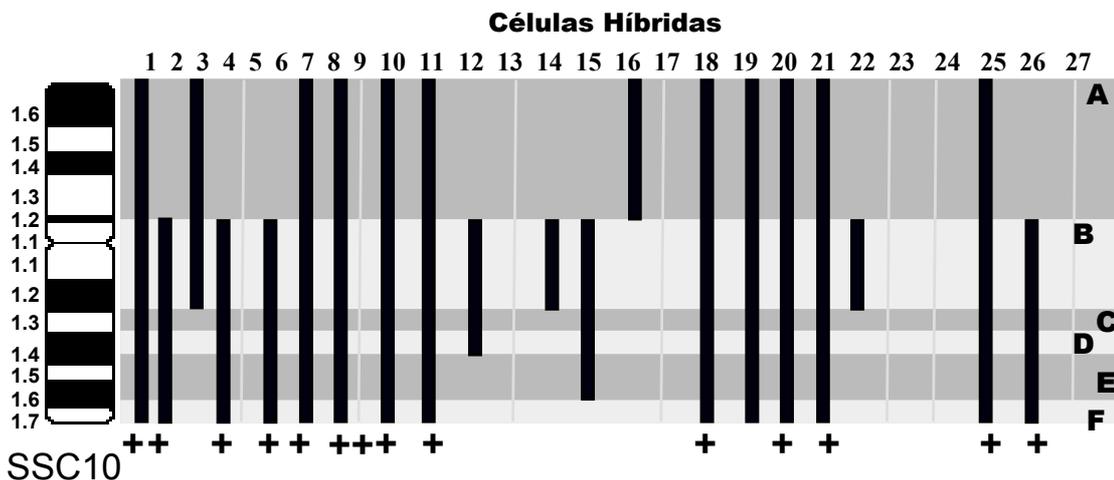


Figura 15: Diagrama representativo del cromosoma 10 de cerdo. Las barras verticales señalan los fragmentos cromosómicos contenidos en cada línea celular del panel de híbridos somáticos. La letra se refiere a la región citogenética del cromosoma- A: p11-16, B: q11-12, C: q13, D: 1/2q14, E: 1/2q14-16 y F: q17-.

1.6. Análisis de la expresión de CD29 de cerdo a nivel de ARNm

Para caracterizar la distribución tisular y el nivel de expresión de esta proteína a nivel de ARN se realizó RT-PCR sobre ARN total de distintos tejidos porcinos. Para la reacción se emplearon los siguientes tejidos y células: bazo, timo, médula ósea, macrófagos alveolares, plaquetas, PBL, hígado y riñón con los cebadores específicos del gen P1 y P2, descritos en Materiales y Métodos (página 43).

La banda de ADNc porcino de 580 pb generada por esta pareja de cebadores puso de manifiesto una distinta distribución tisular. Estos resultados fueron confirmados por Southern blotting empleando como sonda homóloga el mismo

producto marcado con digoxigenina. Los resultados obtenidos, que se muestran en la **Figura 16**, reflejaron que CD29 porcina, a pesar de expresarse en todos los tejidos estudiados, presenta un alto nivel de expresión en tejidos linfoides y una expresión más baja en tejidos no linfoides.

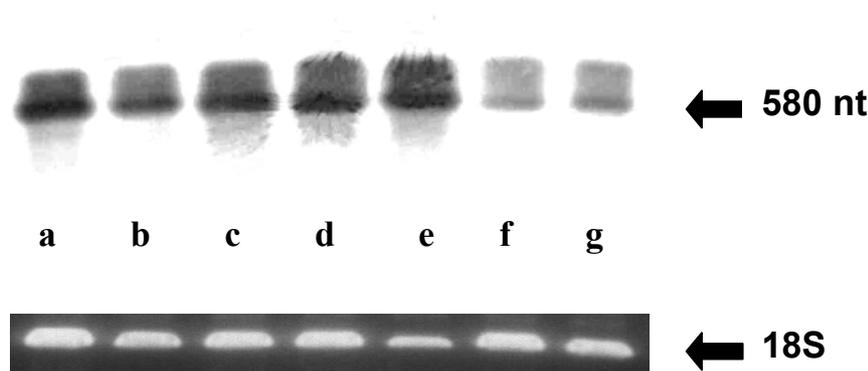


Figura 16: Estudio de expresión mediante RT-PCR sobre distintos tejidos porcinos con los cebadores P1 y P2: **a** (bazo), **b** (timo), **c** (macrófagos alveolares), **d** (médula ósea), **e** (leucocitos en sangre periférica), **f** (hígado) y **g** (riñón).

1.7. Análisis de la expresión de la proteína CD29 en tejidos porcinos

El estudio de la distribución celular y tisular de la proteína CD29 porcina se llevó a cabo mediante el empleo de un anticuerpo policlonal específico y técnicas de inmunohistoquímica.

Para la obtención de un anticuerpo policlonal anti-CD29, la secuencia nucleotídica homóloga al dominio de unión al ligando de la molécula humana (Hu et al., 1999), fue expresada en forma de proteína recombinante en un sistema de expresión procarionta utilizando la cepa *E.coli* BL21 (DE3) y el vector de expresión *pET-28b*. Para su clonación en el vector de expresión elegido, el fragmento específico de cerdo fue obtenido por PCR a partir del clon **CD29-4.2** mediante el empleo de los cebadores específicos F307 y R1017 (**Tabla 6**, página 49). Ambos cebadores generaron una banda de amplificación de 700 pb, restringida en sus extremos con *Bam*HI y *Hind*III, los puntos de corte elegidos en el sitio de clonación del vector para permitir la adecuada fase de lectura del inserto.

La proteína correspondiente a la secuencia expresada (**CD29R**) fue obtenida en cultivos bacterianos transformados con la construcción recombinante en presencia de IPTG, para optimizar el proceso de expresión, y finalmente purificada con columnas Ni-NTA mediante elución a pH de 4,5 (**Figura 17**).

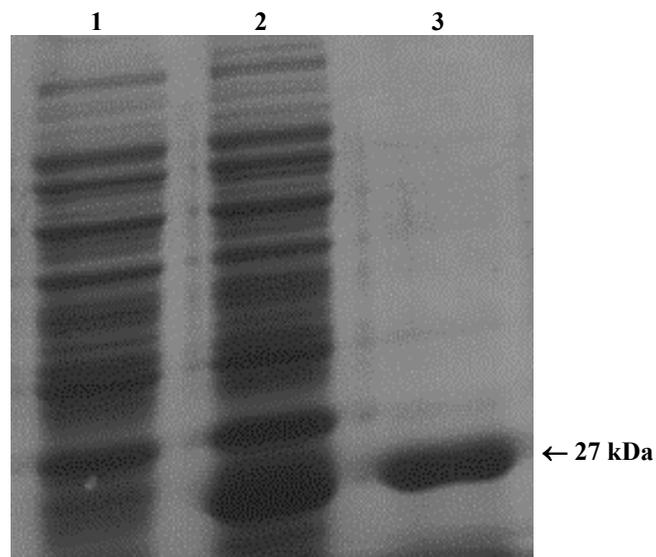


Figura 17: Electroforesis en SDS-PAGE de extractos celulares del cultivo inducido con IPTG (2) y sin inducir (1). La línea 3 corresponde a la proteína **CD29R** purificada.

Para la obtención del anticuerpo policlonal se realizaron las inmunizaciones necesarias con la proteína recombinante **CD29R** hasta conseguir un título de suero elevado (1/20.480).

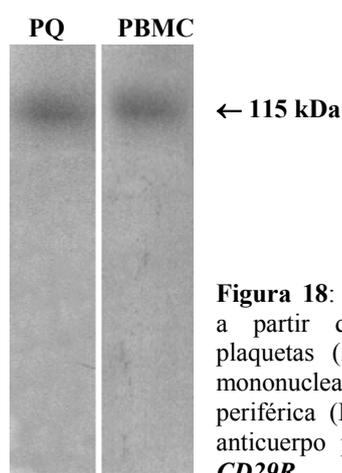


Figura 18: Inmunoblotting a partir de lisados de plaquetas (PQ) y células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) con el anticuerpo policlonal anti-**CD29R**.

La especificidad del anticuerpo policlonal producido fue comprobado mediante inmunoblotting en condiciones no reductoras frente a plaquetas y leucocitos mononucleares porcinos, dos tipos celulares en los que ha sido evidenciada su expresión en humano (Bosman, 1993). Las muestras no fueron hervidas antes de la electroforesis SDS-PAGE, preservando así la estructura de la proteína recombinante y del antígeno de membrana presente en ambos tipos celulares.

Como puede observarse en la **Figura 18**, el anticuerpo policlonal anti-**CD29R** reconoce una estructura de plaquetas y leucocitos mononucleares de un peso molecular aproximado de 115 kDa, coincidiendo con el evidenciado por otros autores para la proteína CD29 en condiciones no reductoras.

La detección del receptor CD29 se estudió en cortes de órganos linfoides y no linfoides de cerdo mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Para la fijación de las muestras de tejido se utilizaron dos fijadores, formaldehído tamponado al 10 % y líquido de Bouin. El fijador idóneo para la detección de los grupos antigénicos reconocidos por el anticuerpo policlonal anti-**CD29R** fue el líquido de Bouin, ya que la inmunorreacción con el formaldehído tamponado al 10 % fue más heterogénea y débil.

Otro parámetro que hubo de ser ajustado fue la dilución óptima de anticuerpo policlonal anti-**CD29R**. Los resultados mostraron que ensayos con la dilución más alta, 1/1000, fue la que presentó mayor contraste entre zonas positivas específicas y zonas positivas inespecíficas o ruido de fondo.

En estas condiciones, la técnica se llevó a cabo en las siguientes muestras de tejidos: médula ósea, ganglio linfático, bazo, timo, intestino delgado, placas de Peyer y tonsilas.

Médula ósea. El anticuerpo policlonal anti-**CD29R** reaccionó con el músculo liso de los vasos sanguíneos, así como con las células endoteliales. También se observó mayor positividad en los megacariocitos maduros (núcleo de menor tamaño y mayor citoplasma). **Figura 19.**

Bazo. La incubación de cortes de bazo con el anticuerpo policlonal anti-CD29R reveló inmunorreactividad en el endotelio de las arteriolas y las vénulas, así como en el músculo liso de ambas, exclusivamente. Dicha reacción también se observó en las trabéculas, apareciendo negativa en el tejido linfoide. **Figura 20.**

Ganglio linfático. Se observó inmunorreacción principalmente en monocitos, pero también en algunos leucocitos polimorfonucleares neutrófilos. Las fibras musculares lisas vasculares fueron positivas mientras que los linfocitos fueron negativos. **Figura 21 y 22.**

Timo. La reacción se observó en las células epiteliales de los corpúsculos de Hassall de la médula. Los timocitos y macrófagos fueron negativos. El endotelio y el músculo liso de los vasos sanguíneos también reaccionaron intensamente con el anticuerpo policlonal anti-**CD29R**. **Figura 23 y 24.**

Intestino. El anticuerpo policlonal anti-**CD29R** reaccionó con las células epiteliales de la mucosa intestinal de forma heterogénea. Así, el epitelio de las criptas de Lieberkhun fue negativo mientras que se observó una reactividad progresiva más intensa hacia el epitelio de superficie, coincidiendo con el grado de diferenciación. Además, se observó reacción en toda la musculatura lisa intestinal, incluyendo la muscular de mucosa y la capa muscular, y en el músculo liso vascular. En las placas de Peyer no se observó reacción. **Figura 25, 26 y 27.**

Tonsilas. El anticuerpo policlonal anti-**CD29R** reaccionó con el epitelio escamoso de la superficie y de las criptas tonsilares. Las células de la capa basal germinativa fueron negativas, y la reacción aumentaba de intensidad con la diferenciación progresiva de las células basales del estrato escamoso. Las células linfoides fueron negativas. **Figura 28 y 29**.

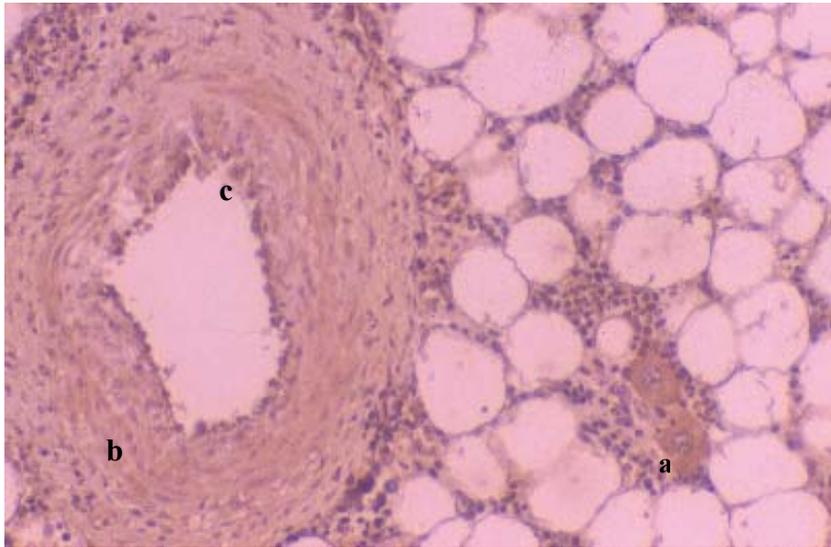


Figura 19: Médula ósea porcina. Se observa inmunorreacción en los megacariocitos maduros (a), musculatura vascular lisa (b) y células endoteliales (c). Técnica inmunohistoquímica del ABC, contratinción nuclear con hematoxilina (20x).

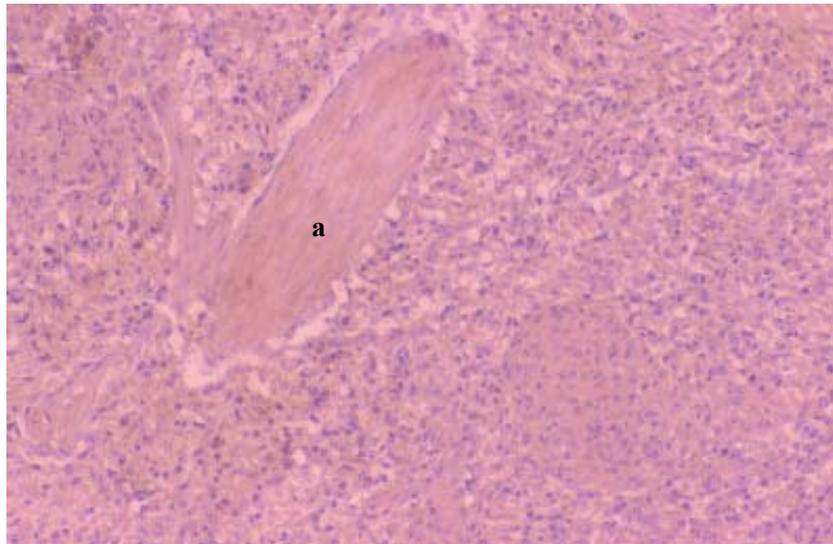


Figura 20: Bazo de cerdo. En este corte de pulpa roja se observa inmunorreacción en el músculo liso de la trabécula (a). Técnica inmunohistoquímica del ABC, contratinción nuclear con hematoxilina (20x).

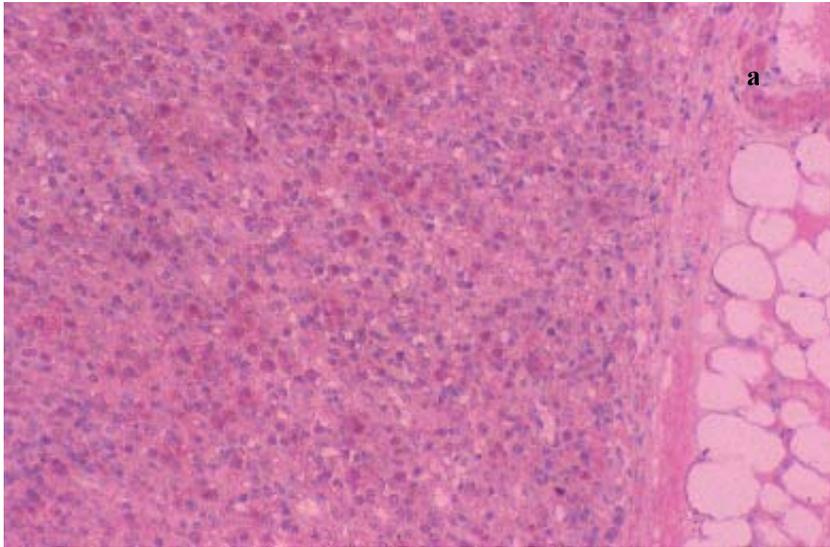


Figura 21: Ganglio linfático. Corte de médula ganglionar en el que se observa inmunorreacción en la musculatura lisa de la vénula (a). Técnica inmunohistoquímica de la estreptavidina-biotina-fosfatasa alcalina, contratinción nuclear con hematoxilina (20x).

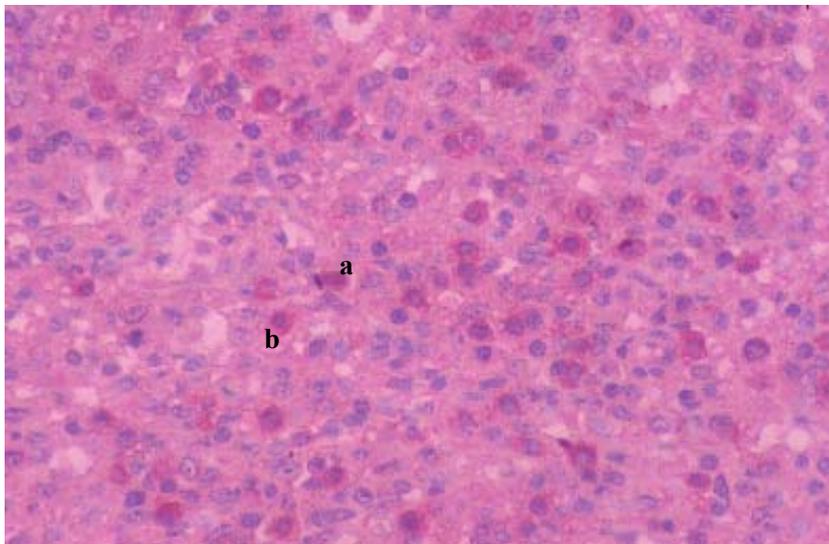


Figura 22: Ganglio linfático. Corte de médula ganglionar en el que se observa inmunorreacción en los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (a) y en los monocitos (b). Técnica inmunohistoquímica de la estreptavidina-biotina-fosfatasa alcalina, contratinción nuclear con hematoxilina (40x).

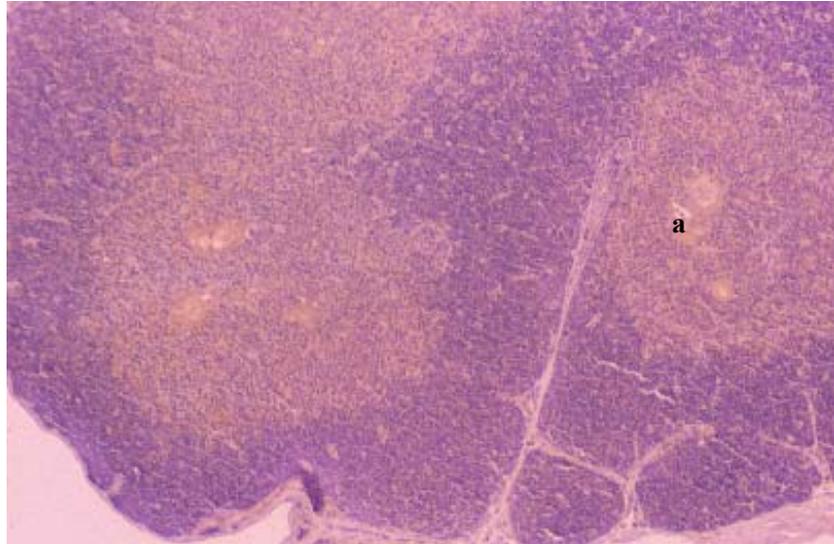


Figura 23: Timo de cerdo. Se observan dos lóbulos con la corteza periférica y la médula central. La inmunorreacción se encuentra en las células epiteliales tímicas o corpúsculos de Hassall (**a**). Técnica inmunohistoquímica del ABC, contratinción con hematoxilina (10x).

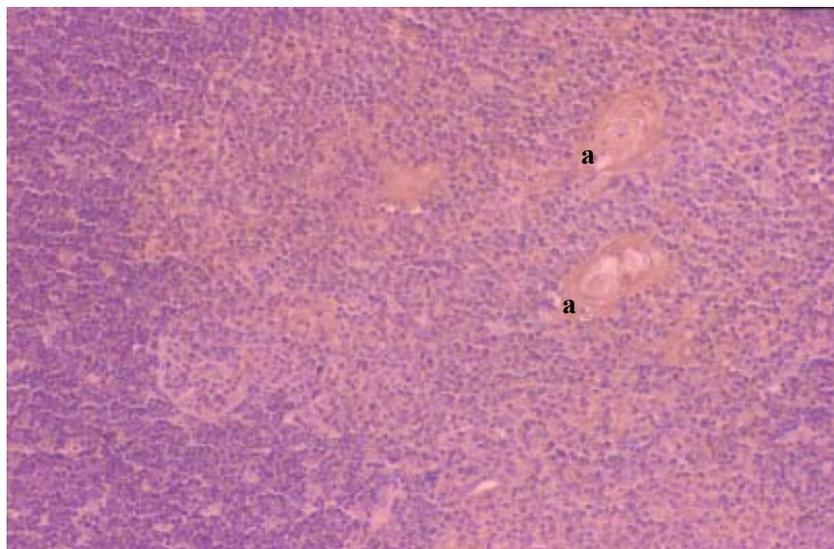


Figura 24: Timo de cerdo. Corte de la médula de timo en el que se observa inmunorreacción en los corpúsculos de Hassall o células epiteliales tímicas (**a**). Técnica inmunohistoquímica del ABC, contratinción nuclear con hematoxilina (20x).

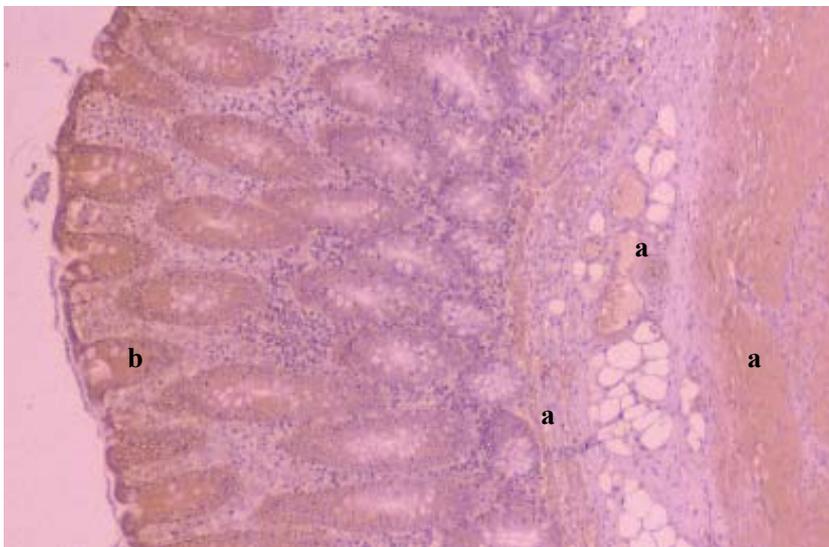


Figura 25: Intestino delgado porcino. Se observa inmurreacción en el tejido muscular de la capa muscular y en la muscular de la mucosa, así como en los vasos sanguíneos (**a**); en la mucosa reaccionan las células epiteliales superficiales (**b**), reflejándose una reactividad progresiva por diferenciación. Técnica inmunohistoquímica del ABC, contratinción nuclear con hematoxilina. (10x).

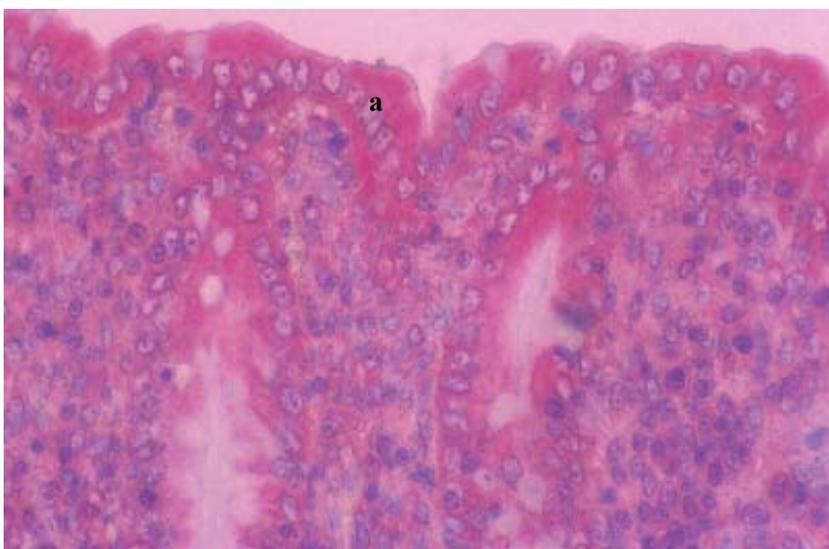


Figura 26: Intestino delgado porcino. Se observa inmunorreacción en el epitelio de la mucosa intestinal (**a**). Técnica inmunohistoquímica de la estreptavidina-biotina-fosfatasa alcalina, contratinción nuclear con hematoxilina (40x).

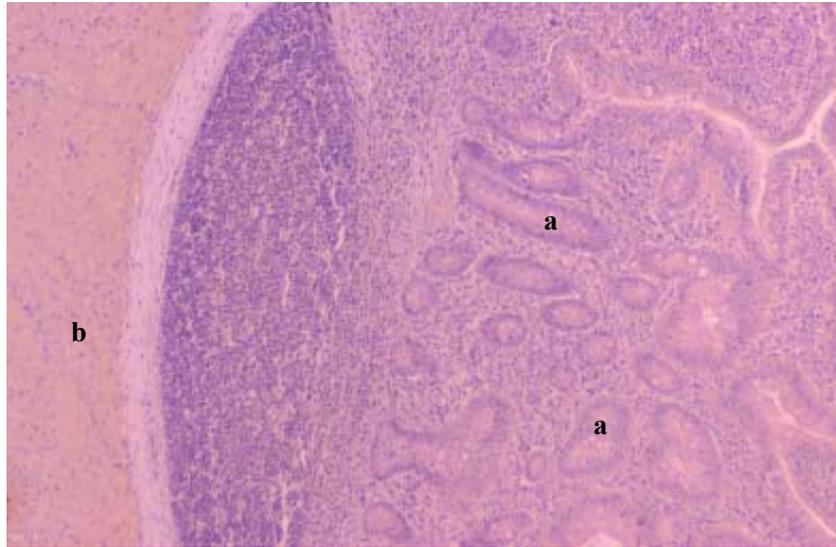


Figura 27: Tejido linfoide asociado a intestino porcino. Se observa el tejido linfoide no marcado (placa de Peyer negativa). El resto del corte presenta la misma inmunorreacción que en las preparaciones de intestino delgado, con el tejido muscular (**b**) y las células epiteliales de la mucosa positivas (**a**). Técnica inmunohistoquímica del ABC, contratinción nuclear con hematoxilina (10x).

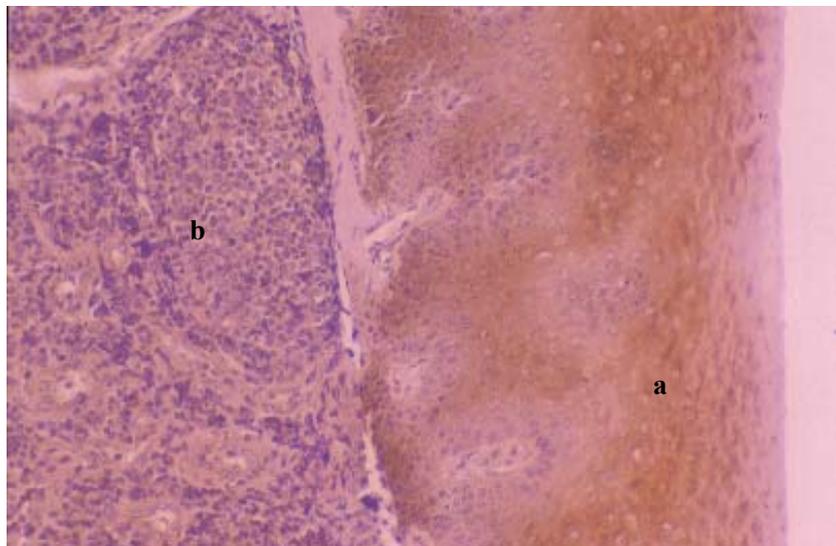


Figura 28: Tonsila de cerdo. Se observa inmunorreacción en el epitelio escamoso de la superficie (**a**), observándose un aumento de intensidad conforme las células del epitelio escamoso se diferencian. El tejido linfoide es negativo (**b**). Técnica inmunohistoquímica del ABC, contratinción nuclear con hematoxilina (20x).

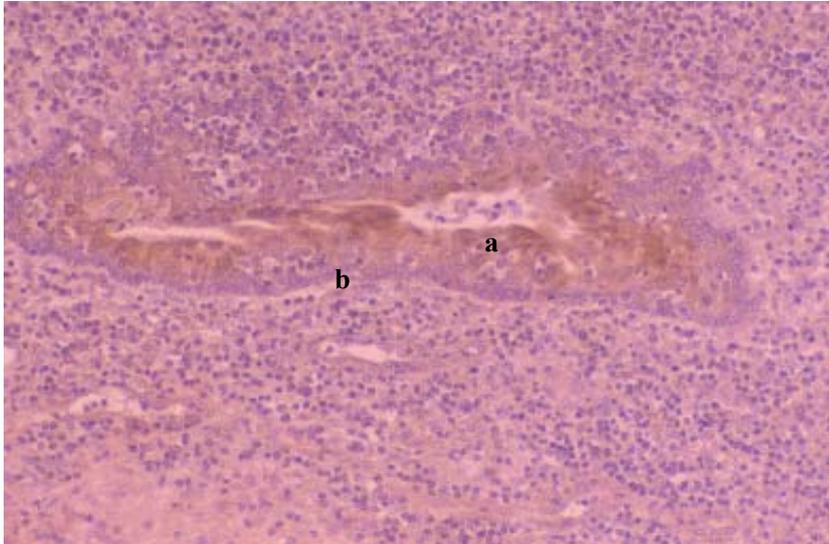


Figura 29: Tonsila de cerdo. Inmunorreacción localizada en el epitelio maduro de las criptas tonsilares (**a**), siendo negativas las células de la capa basal germinativa (**b**). Técnica inmunohistoquímica del ABC, contratinción nuclear con hematoxilina (40x).

2. CARACTERIZACION DE LA SUBUNIDAD β_3 INTEGRINAS PORCINAS (CD61)

2.1. Purificación de CD61 porcino

Para la purificación de la molécula CD61 porcina se empleó el anticuerpo monoclonal JM2E5 (Pérez de la Lastra et al., 1997) y un lisado de plaquetas porcinas a través de una columna de inmunoafinidad. La fracción obtenida, se sometió a una electroforesis en gel de acrilamida al 10% en condiciones no reductoras, mostrando dos bandas con un peso molecular aproximado de 140 kDa y 105 kDa, respectivamente (**Figura 30 A**). Mediante inmunoblotting se confirmó que la banda de 105 kDa correspondía a CD61 porcino al ser reconocida específicamente por el anticuerpo monoclonal JM2E5 (**Figura 30 B**).

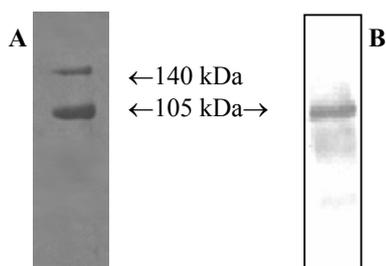


Figura 30: (A) SDS-PAGE de la fracción protéica purificada con el AcMo JM2E5. (B) Inmunoblotting a partir de un lisado de plaquetas con el mismo anticuerpo monoclonal.

La proteína porcina purificada fue analizada en su extremo amino-terminal mediante secuenciación, obteniéndose la siguiente secuencia de aminoácidos: Gly-Pro-Asn-Ile-X-Ala-Thr-Arg-Gly-Val.

El estudio de homología llevado a cabo, con el fin de confirmar la naturaleza del antígeno JM2E5 (JM2E5-Ag), puso de manifiesto el elevado grado de similitud existente entre la secuencia obtenida y los extremos amino-terminales correspondientes a proteínas CD61 de otras especies (**Figura 31**).

JM2E5-Ag	G P N I X A T R G V
	: : : : : : : :
CD61 Humano	G P N I C T T R G V
	: : : : : : : :
CD61 Conejo	G P N I C T T R G V
	: : : : : : : :
CD61 Perro	V S N I C T T R G V
	: : : : : : : :
CD61 Ratón	E S N I C T T R G V

Figura 31: Homología del antígeno JM2E5 con las secuencias CD61 de humano, conejo, perro y ratón. Están señalados los aminoácidos conservados entre las distintas secuencias comparadas.

2.2. Obtención de la sonda CD61

La secuencia del gen CD61 fue obtenida mediante el rastreo de una genoteca de ADNc con una sonda específica de cerdo. Para la obtención de la sonda se realizó RT-PCR con la pareja de cebadores F-101/R-869 (ver Materiales y Métodos, página 47) sobre distintos tejidos porcinos. La secuencia nucleotídica de F-101 fue deducida de la secuencia aminoacídica correspondiente al extremo amino secuenciado con anterioridad, mientras que el cebador R-869 se dedujo de regiones conservadas en la secuencia CD61 en diferentes especies.

El procedimiento de RT-PCR se llevó a cabo sobre ARN total procedente de bazo, timo, PBL e hígado. Mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% se observó el producto de amplificación esperado (787 pb) en PBMC, bazo y timo. El tejido elegido para la obtención de la sonda fue bazo, donde se obtuvo una única banda de la talla esperada y aparentemente con un mayor nivel de expresión (**Figura 32**).

El producto de amplificación en bazo fue purificado mediante el método *Genclean* III, clonado en *pGEM-T* y finalmente, secuenciado. A continuación, y con el fin de confirmar la naturaleza de la secuencia obtenida, se analizó su grado de homología frente a la base de datos de secuencias *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para ello fue empleado el programa de secuencias *BLAST* y el resultado reveló una elevada similitud entre la secuencia de cerdo y los distintos genes CD61 caracterizados en otras especies. En la **Figura 33** se muestra únicamente el resultado obtenido con las secuencias humana y canina.

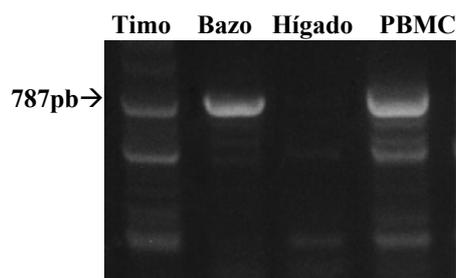


Figura 32: Obtención de la sonda CD61 mediante PCR sobre distintos tejidos porcinos.

2.3. Rastreo de la genoteca

Se efectuó el rastreo sobre una genoteca comercial de ADNc construida a partir de ARNm procedente de músculo liso porcino con el sistema *Uni-ZAP XR Vector System*. La genoteca fue hibridada con la sonda CD61 específica de cerdo, seleccionándose 8 clones positivos (4.1, 4.2, 6.1, 6.2, 8.1, 9.1, 9.2 y 9.3) sobre un total de 10^6 pfu examinadas. La especificidad de los halos de lisis positivos fue confirmada mediante PCR empleando los cebadores F101/R869.

	1					60
cerdo	TGTGAGCTCC	TGCCAGCAAT	GTCTGGCTGT	GAGTCCCATG	TGTGCCTGGT	GCTCAGATGA
humano	TGTGAGCTCC	TGCCAGCAGT	GCTTGGCTGT	GAGCCCCATG	TGTGCCTGGT	GCTCTGATGA
perroCTCC	TGCCAGCAAT	GTCTAGCTGT	GAGTCCCTGT	TGTGCCTGGT	GCTCAGATGA
	61					120
cerdo	GGATCTGCCT	CTGGGCACGC	CCCCTGTAA	CCTGGAGGAG	AATCTGCTGA	ACGATCACTG
humano	GGCCTGCCT	CTGGGCTCAC	CCTCGCTGTA	CCTGAAGGAG	AATCTGCTGA	AGGATAACTG
perro	GGCCTGCCT	CTGGGATCTC	CCCCTGTAA	CCTGAAGGAA	AATCTGCTGA	AGGATAACTG
	121					180
cerdo	TAACCCGAAG	TACATTGAGT	TCCCCATCAG	TGAGGCCAGA	ATCCTGGAGG	CCAGGCCCCCT
humano	TGCCCCAGAA	TCCATCGAGT	TCCAGTGAG	TGAGGCCGA	GTAAGAGG	ACAGGCCCCCT
perro	TGCCCTGGAA	TCCATTGAGT	TCCCCATCAG	TGAGGTCCGC	ATCCTGGAGG	CCAGGCCCCCT
	181					240
cerdo	GAGTGACAAG	GGCTCTGGAG	ACAGCTCCCA	GATAACTCAA	GTCAGCCCC	AGAGGATCTT
humano	CAGGACAAG	GGCTCTGGAG	ACAGCTCCCA	GCTCACTCAA	GTCAGTCCC	AGAGGATTGC
perro	TAGCAACAAG	GGCTCTGGAG	ACAGCTCCCA	GATTACTCAA	GTCAGCCCTC	AGAGGATTGC
	241					300
cerdo	GCTCCGGCTC	CGGCCAGATG	ATTCGAAGAG	TTTCTCCGTC	CAAGTCCGGC	AGGTGGAGGA
humano	ACTCCGGCTC	CGGCCAGATG	ATTCGAAGAA	TTTCTCCATC	CAAGTCCGGC	AGGTGGAGGA
perro	GCTCCGGCTC	CGGCCAGATG	ATTCGAAGAA	TTTCTCCATC	CAAGTCCGGC	AGGTGGAGGA
	301					360
cerdo	TTACCCTGTG	GACATCTACT	ACTTGATGGA	CCTGTCTTTC	TCTATGAAGG	ATGATCTGGA
humano	TTACCCTGTG	GACATCTACT	ACTTGATGGA	CCTGTCTTAC	TCCATGAAGG	ATGATCTGTG
perro	TTACCCTGTG	GACATCTACT	ACTTGATGGA	CCTGTCTTAT	TCCATGAAGG	ATGATCTGTC
	361					420
cerdo	GAGCATCCAG	AACCTGGGTA	CCAAGCTGGC	TTCCAGATG	CGTAAGCTCA	CCAGTAACCT
humano	GAGCATCCAG	AACCTGGGTA	CCAAGCTGGC	CAACAGATG	CGAAAGCTCA	CCAGTAACCT
perro	GAGCATCCAG	AACCTAGGCA	CCAAGCTGGC	CTCCAGATG	CACAAGCTCA	CCAGTAACCT
	421					480
cerdo	GCGGATTGGC	TTCGGGGCT	TTGTGGACAA	GCCTGTGTCA	CCTTACATGT	ACATCTCTCC
humano	GCGGATTGGC	TTCGGGGCT	TTGTGGACAA	GCCTGTGTCA	CCATACATGT	ATATCTCTCC
perro	GCGGATTGGC	TTCGGGGCTT	TTGTGGACAA	GCCTGTGTCT	CCATACATGT	ACATCTCTCC
	451					540
cerdo	ACCACAGGCC	CTCAAAAACC	CCTGCTATGA	TATGAAGACC	ACCTGTTTGC	CCATGTTTGG
humano	ACCAGAGGCC	CTCGAAAACC	CCTGCTATGA	TATGAAGACC	ACCTGCTTGC	CCATGTTTGG
perro	ACCAGAGGCC	CTCAAAAACC	CCTGCTATGA	TATGAAGACC	ACCTGTTTGC	CTATGTTTGG
	541					600
cerdo	CTACAAACAT	GTGCTCACAC	TAACTGACCA	GGTGACCCGT	TTCAACGAGG	AAGTGAAGAA
humano	CTACAAACAC	GTGCTGACGC	TAACTGACCA	GGTGACCCGC	TTCAATGAGG	AAGTGAAGAA
perro	CTACAAACAT	GTGCTGACGC	TAACTGACCA	GGTGACCCGC	TTCAATGAGG	AAGTGAAGAA
	601					660
cerdo	GCAGATGTG	TCACGGAACC	GAGATGCTCC	AGAGGGTGGC	TTTGATGCCA	TCATGCAGGC
humano	GCAGAGTGTG	TCACGGAACC	GAGATGCCCC	AGAGGGTGGC	TTTGATGCCA	TCATGCAGGC
perro	GCAGAGTGTG	TCACGGAACC	GAGATGCCCC	AGAGGGCGGC	TTTGATGCTA	TCATGCAGGC
	661					720
cerdo	TACTGTCTGT	GACGAGAAGA	TTGGCTGGAG	GAACGATGCA	TCCCCTTAC	TGGTGTTTAC
humano	TACAGTCTGT	GATGAAAAGA	TTGGCTGGAG	GAATGATGCA	TCCCCTTGC	TGGTGTTTAC
perro	TACAGTCTGT	GATGAGAAGA	TTGGCTGGAG	GAATGATGCA	TCCCCTTGC	TGGTATTTAC
	721		745			
cerdo	CACTGATGCC	AAGACCCATA	TAGCG			
humano	CACTGATGCC	AAGACTCATA	TAGCA			
perro	CACTGATGCC	AAGACCCATA	TAGCG			

Figura 33: Homología entre la secuencia amplificada en bazo con los cebadores F-101/R-869 y sus correspondientes secuencias humana y canina. Los aminoácidos discordantes están señalados en azul.

El resultado se muestra en la **Figura 34**, donde se puede observar que el clon 9.3 debe ser descartado por ser inespecífico en la PCR.

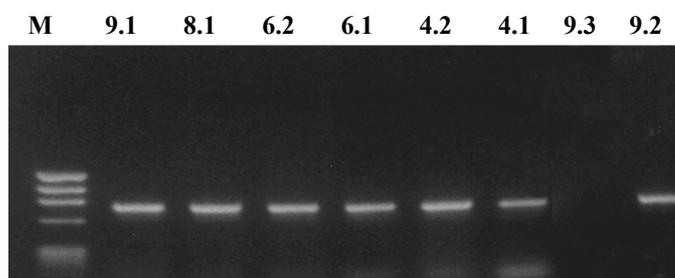


Figura 34: PCR sobre los clones seleccionados después del primer rastreo de la genoteca empleando los cebadores F101/R869. M: ϕ x174HaeIII.

El tamaño del inserto contenido en los clones específicos fue estimado mediante PCR empleando los cebadores universales, M 13 (-20) y M 13 reverse (-27), presentes en *pBluescript*.

Fueron así seleccionados los clones 6.2 y 8.1 (**CD61-6.2** y **CD61-8.1**), presentando ambos un tamaño de inserto adecuado como para contener el gen CD61, tomando como referencia la longitud de la secuencia humana (Kumar et al., 1997).

A continuación, se llevó a cabo la escisión y purificación de *pBluescript* recombinante contenido en cada uno de los clones seleccionados. Finalmente, la secuencia nucleotídica de cada inserto fue determinada mediante secuenciación (**Figura 35**). De los dos clones, únicamente contiene la secuencia completa el **CD61-8.1**.

2.4. Secuencia porcina de CD61

El análisis del inserto contenido en el clon **CD61-8.1** reveló una secuencia de ADNc de 4.566 pb que contenía una región flanqueante en 5', no traducida, de 31 pb, una fase abierta de lectura de 2.352 pb que codifica un polipéptido de 784 aminoácidos y una región flanqueante en 3', no traducida, de 2.183 pb (**Figura 35**).

Como refleja la **Figura 35**, en la secuencia de CD61 se distinguen tres dominios: dominio extracelular (97 nt-2174 nt), dominio transmembranario (2175 nt-2260 nt) y dominio citoplasmático (2261 nt-2386 nt). La secuencia de la integrina porcina presenta 56 restos de cisteína y 8 sitios potenciales de glucosilación (Asn-X-Ser/Thr, donde X no es Pro), dispuestos todos en el dominio extracelular, con excepción de uno de los sitios de glucosilación que se encuentra en el dominio citoplasmático. Como en la secuencia humana, el dominio citoplasmático contiene dos

sitios de fosforilación en las posiciones 747 (tiroxina) y 753 (treonina) (Lerea et al., 1999; Schaffner-Reckinger, 1998). La secuencia del extremo amino de CD61, obtenida con anterioridad a la clonación de *CD61-8.1*, aparece subrayada en la **Figura 35** y puso de manifiesto el sitio de escisión del péptido señal, localizado después del aminoácido 22. Finalmente, la fase abierta de lectura comienza con el codón de inicio (ATG), que codifica para el primer aminoácido, la metionina, localizándose a 31 nt, y termina en un codón fin de mensaje (TAG) situado en la posición 2.398 nt.

La secuencia de aminoácidos deducida de CD61 porcina presenta un perfil de hidrofobicidad característico de las integrinas (**Figura 36**). En el perfil de CD61 se pueden apreciar dos regiones predominantemente hidrofóbicas que corresponderían al péptido señal y al dominio transmembranario. Este dominio transmembranario estaría localizado entre los aminoácidos 715 y 743, en la región del extremo carboxilo terminal de la molécula (**Figura 35**); la secuencia de 41 aminoácidos que sigue, predominantemente hidrofílica, representaría el dominio citoplásmico de la molécula (**Figura 35**).

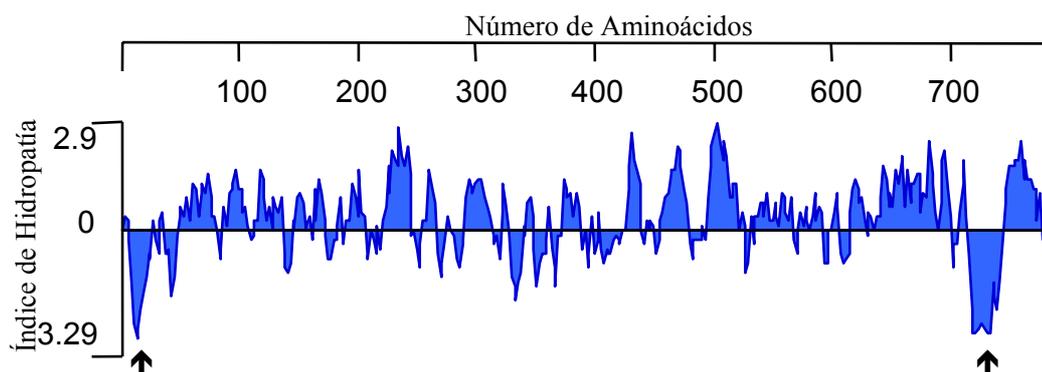


Figura 36: Análisis de hidrofobicidad de la secuencia peptídica CD61 porcina por el método de Kyte-Doolittle. Las flechas señalan las dos regiones hidrofóbicas. La escala horizontal representa el número de aminoácidos de la proteína y la escala vertical es el índice de hidropatía.

Excluyendo al péptido señal, la secuencia de CD61 consta de 762 aminoácidos con un peso molecular estimado de 86.365 daltons. Teniendo en cuenta los 8 sitios potenciales de N-glucosilación que contiene la secuencia, y que el peso molecular medio de una cadena de hidratos de carbono es de 2.500 daltons, el peso molecular de la proteína madura sería de aproximadamente 106.365 daltons, más cercano al obtenido con anterioridad mediante SDS-PAGE (**Figura 30 A**).

La secuencia de aminoácidos deducida de CD61 porcina contiene 56 restos de cisteína, lo que representa el 7.2% del total de aminoácidos. Este elevado contenido en cisteínas se concentra exclusivamente en el dominio extracelular, próximo al dominio transmembranario (**Figura 35**).

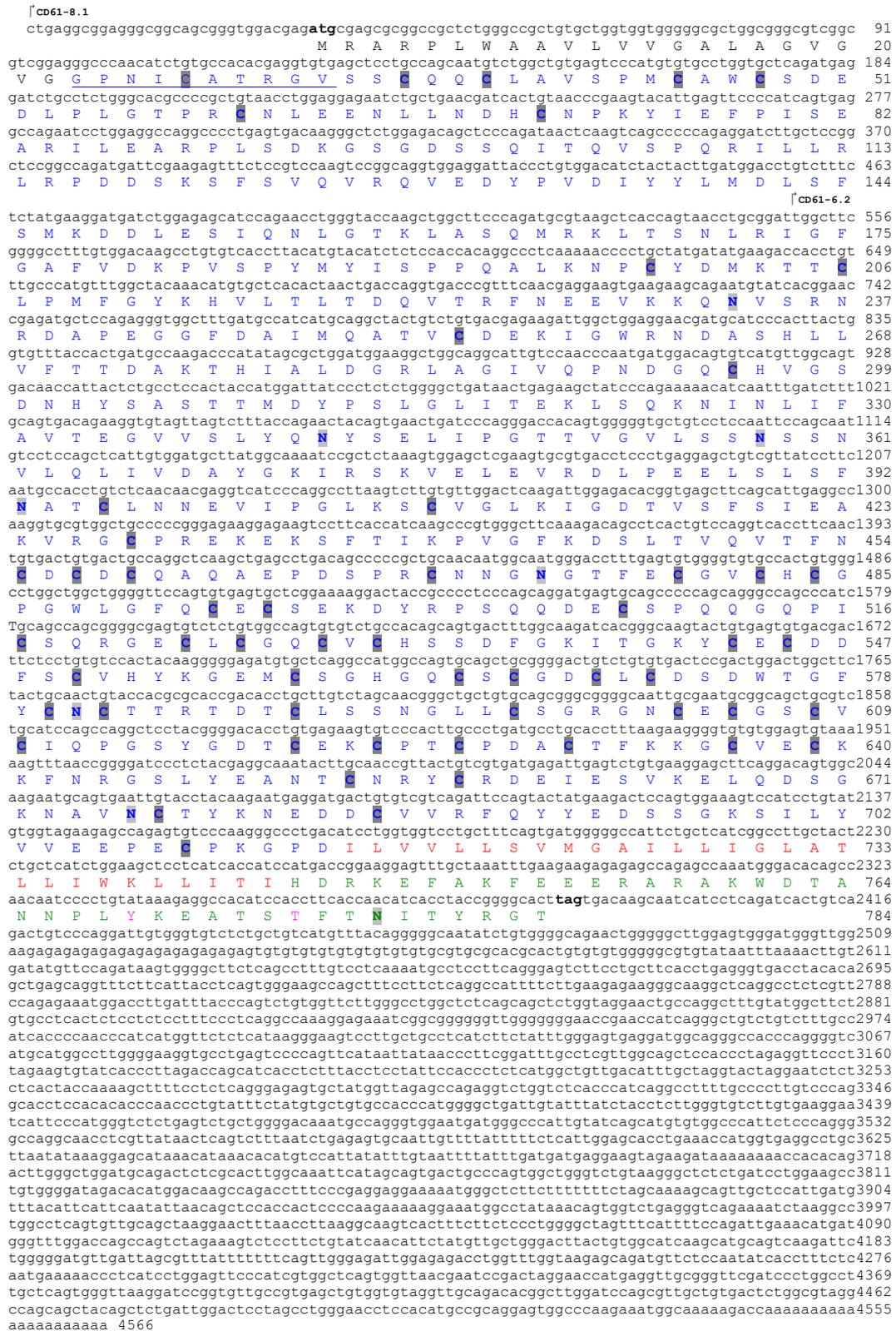


Figura 35: Secuencia del clon **CD61-8.1**. ADNc que codifica para la proteína CD61 porcina y secuencia de aminoácidos deducida. Péptido señal: negro; sitios potenciales de N-glicosilación: gris claro; cisteínas: gris oscuro; dominio extracelular: azul; dominio transmembranario; rojo; dominio citoplasmático: verde; sitios de fosforilación: rosa; codón de inicio y de terminación de lectura: ambos en negrita; secuencia del extremo amino obtenido con el AcMo JM2E5: subrayado; clones secuenciados: **CD61-8.1** y **CD61-6.2**

2.5. Comparación de la secuencia CD61 porcina con otras moléculas CD61

La secuencia de aminoácidos de la molécula CD61 porcina fue comparada con sus homólogas caracterizadas en distintas especies. El procedimiento se llevó a cabo utilizando el programa *Megalign* perteneciente al software integrado de análisis de secuencias *DNASTAR's Lasergene*, que proporciona los porcentajes de similitud y de divergencia entre las distintas secuencias analizadas.

El resultado obtenido se muestra en la **Tabla 8**, en la que se observa que la secuencia porcina muestra un 92,2% de identidad con la CD61 humana (*GenBank Accession*: U95204) y CD61 canina (*GenBank Accession*: AF116270), 91,7% con la CD61 de conejo (*GenBank Accession*: AF170529), 89,0% con la CD61 murina (*GenBank Accession*: AF026509), 79,5% con la CD61 de pollo (*GenBank Accession*: X72378) y 72,8% con *Xenopus laevis* (*GenBank Accession*: L13591).

PORCENTAJE DE SIMILITUD

	C	H	P	CO	R	P	X	
C	***	92,2	92,2	91,7	89,0	79,5	72,8	C
H	7,5	***	95,4	95,1	90,0	80,8	73,4	H
P	7,8	4,3	***	93,8	90,8	80,2	73,0	P
Co	8,0	4,9	6,1	***	90,1	79,8	72,3	Co
R	10,6	9,7	8,7	9,5	***	78,4	72,0	R
P	19,5	18,2	18,6	19,2	20,8	***	74,1	P
X	26,5	25,7	26,3	26,6	26,9	25,4	***	X
	C	H	P	Co	R	P	X	

PORCENTAJE DE DIVERGENCIA

Tabla 8: Comparación entre las secuencias aminoacídicas de CD61 distintas especies: C: cerdo; H: humano; P: perro; Co: conejo; R: ratón; P: pollo y X: *X. laevis*. Los porcentaje de similitud entre las secuencias están señaladas en rojo y las de divergencia en azul. Los datos relativos a la CD61 porcina se encuentran destacados en negrita

El análisis de homología entre las secuencias aminoacídicas de las diferentes especies se representa en la **Figura 37**. Todas las proteínas comparten elementos estructurales comunes, entre los cuales hay que destacar la conservación absoluta de los 56 restos de cisteína, en posición y número, a lo largo de toda la molécula y la similitud en el tamaño del dominio transmembranario.

De nuevo, y como ha sido observado para CD29, se observa una distribución de las cisteínas en un dominio rico en este aminoácido constituido por cuatro secuencias homólogas en tándem (**Figura 37**). Dicha estructura está conservada en todas las especies consideradas en el estudio, al igual que los sitios potenciales de fosforilación (**Figura 37**).

Sin embargo, los sitios de glucosilación varían entre las especies comparadas. Así, las secuencias de cerdo y conejo contienen 8 sitios de glucosilación conservados entre sí, mientras que humano y perro poseen sólo 7. Un total de 6 sitios de

glucosilación se localizan en ratón, siendo compartidos por todos los mamíferos estudiados. El único representante de aves (pollo) presenta 8 sitios de glucosilación, de los cuales 6 son los conservados en mamíferos y 1 en *Xenopus laevis*. Esta última especie posee 6 sitios potenciales de glucosilación, 4 de ellos conservados con el resto de especies.

La relación filogenética entre las especies comparadas, estimadas en base al porcentaje de similitud entre las secuencias de aminoácidos de CD61, se muestra en la **Figura 38**, deduciendo de ella que aquellas especies que como se ha visto anteriormente presentaron un menor nivel de homología con cerdo (*Xenopus* y pollo) son las que evolutivamente se encuentran más alejadas con respecto a esta especie.

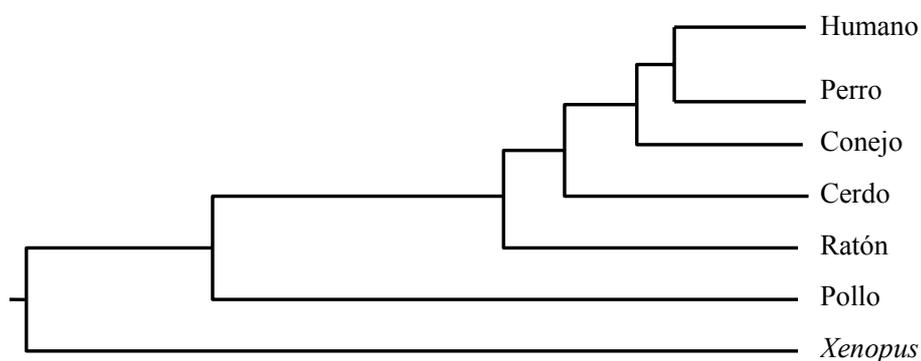


Figura 38: Estudio filogenético de las proteínas CD61 en distintas especies.

La homología entre la secuencia de cerdo y el resto de especies ha sido también estudiada considerando los dominios estructurales por separado. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 9**.

De nuevo, y como se ha visto al considerar la secuencia completa, se observa para cada dominio un elevado nivel de conservación entre los mamíferos considerados, siendo relevante el resultado obtenido en el caso del dominio citoplasmático, que es idéntico en todos ellos; en general, los niveles de homología son menores con pollo y *Xenopus*.

ESPECIE	PS	EX	TM	CI
Humano	72.7	92.2	96.7	100
Perro	86.4	91.6	100	100
Conejo	81.8	91.5	93.3	100
Ratón	59.1	88.9	100	100
Pollo	21.1	80.2	96.7	87.8
<i>Xenopus</i>	13.6	73.0	90.0	87.8

Tabla 9: Porcentajes de similitud entre las secuencias de las distintas especies, considerando los dominios estructurales por separado. PS: péptido señal; EX: extracelular; TM: transmembranario; CI: citoplasmático.

PÉPTIDO SEÑAL		
Cerdo	MRARPRPRLWVTVLALGALAGVGVGGPNITTRGVSSCQCLAVSPMCAWSDEALPLGTPRONLEENLLNDHNPKYIEFPVSEARILEARPLSDKGS	96
Humano	MRARPRPRLWVTVLALGALAGVGVGGPNITTRGVSSCQCLAVSPMCAWSDEALPLGSPRODLKENLLKDNAPESIEFPVSEARVLEDRPLSDKGS	100
Perro	MRARPRPRLWAAVLLGALAGTGVGVSNITTRGVSSCQCLAVSPVCAWSDEALPLGSPRONLKENLLKDNAPESIEFPVSEARILEARPLSDKGS	96
Conejo	MRARPRPRLWAAVLLGALAGVGVGGPNITTRGVSSCQCLAVSPMCAWSDEALPLGSPRODLRENLLQDNAPESIEFPVSEARILEARPLSDKGS	100
Ratón	MRAQWPGQLWAAVLLGALAGVGVGGPNITTRGVSSCQCLAVSPVCAWSDEALPLGSPRONLKENLLKDNAPESIEFPVSEARILEARPLSDKGS	99
Pollo	M-----EELRVAFSIL-VLCAAGSWGSNITATRGVTSCKQCLAVSPVCAWSAEVVAQSTPRCDLAFANLLQNGGRDFIEFPSSRITVLEERPLSDKGS	93
Xenopus	MKPDVYI--VYTICVQL-LLTAGTGWASITATRGVSSCQCLAVSPVCAWSAEVVAQSTPRCDLAFANLLQNGGRDFIEFPSSRITVLEERPLSDKGS	97
Cerdo	-GDSSQITQVSPQRIALLRPPDDSKFISIQVRQVEDYVVDIYYLMDLSYSMKDDLWSIQNLGTLKASQMRKLTNSLRIGFGAFVDPKVPSPYMISSPPEAL	195
Humano	-GDSSQITQVSPQRIALLRPPDDSKFISIQVRQVEDYVVDIYYLMDLSYSMKDDLWSIQNLGTLKATQMRKLTNSLRIGFGAFVDPKVPSPYMISSPPEAL	199
Perro	-GDSSQITQVSPQRIALLRPPDDSKFISIQVRQVEDYVVDIYYLMDLSYSMKDDLSSIQNLGTLKASQMRKLTNSLRIGFGAFVDPKVPSPYMISSPPEAL	195
Conejo	-GDSSQITQVSPQRIALLRPPDDSKFISIQVRQVEDYVVDIYYLMDLSYSMKDDLRSIQNLGTLKASQMRKLTNSLRIGFGAFVDPKVPSPYMISSPPEAL	199
Ratón	-GSSAQITQVSPQRIALLRPPDDSKFISIQVRQVEDYVVDIYYLMDLSYSMKDDLSSIQNLGTLKASQMRKLTNSLRIGFGAFVDPKVPSPYMISSPPEAL	198
Pollo	-GGST-TTQMSFQRIQLNLRPPDQMFVRVHRQVEDYVVDIYYLMDLSYSMKDDLKNIQNLGTLKASEMRKLTNSLRIGFGAFVDPKVPSPYMISSPPEAI	191
Xenopus	EGDTREITQMSFQKIDLFLRPPDDTKVFNLRQVRQVEDYVVDIYYLMDLSYSMKDDLKIQTGTLSEMRRLTNSLRIGFGAFVDPKVPSPYMISSPPEVI	197
Cerdo	KNPFDYDMKTTLLPMFGYKHLVTLTDQVTRFNEEVKKQSVSRNRDAPEGGFDAIMQATVDEKIGWRNDASHLLVFTTDAKTHIALDGRLAGIVQPNDDGQ	295
Humano	ENPFDYDMKTTLLPMFGYKHLVTLTDQVTRFNEEVKKQSVSRNRDAPEGGFDAIMQATVDEKIGWRNDASHLLVFTTDAKTHIALDGRLAGIVQPNDDGQ	299
Perro	KNPFDYDMKTTLLPMFGYKHLVTLTDQVTRFNEEVKKQSVSRNRDAPEGGFDAIMQATVDEKIGWRNDASHLLVFTTDAKTHIALDGRLAGIVQPNDDGQ	295
Conejo	RNPFDYDMKTTLLPMFGYKHLVTLTDQVTRFNEEVKKQSVSRNRDAPEGGFDAIMQATVDEKIGWRNDASHLLVFTTDAKTHIALDGRLAGIVQPNDDGQ	299
Ratón	KNPFDYDMKTTLLPMFGYKHLVTLTDQVTRFNEEVKKQSVSRNRDAPEGGFDAIMQATVDEKIGWRNDASHLLVFTTDAKTHIALDGRLAGIVQPNDDGQ	298
Pollo	KNPFDYDMKTTLLPMFGYKHLVTLTDQVTRFNEEVKKQSVSRNRDAPEGGFDAIMQATVDEKIGWRNDASHLLVFTTDAKTHIALDGRLAGIVQPNDDGQ	291
Xenopus	KNPFDYDMKTTLLPMFGYKHLVTLTDQVTRFNEEVKKQSVSRNRDAPEGGFDAIMQATVDEKIGWRNDASHLLVFTTDAKTHIALDGRLAGIVQPNDDGQ	297
Cerdo	HVGSNDHYSASTTMDYPSLGLMTEKLSQKNINLIFAVTEGVVSLYQNYSELIPTGTVGVLSVSSNVLQILVDAYGKIRSKVELEVRDLPEELSLSFNAT	395
Humano	HVGSNDHYSASTTMDYPSLGLMTEKLSQKNINLIFAVTEGVVSLYQNYSELIPTGTVGVLSMDDSNVLQILVDAYGKIRSKVELEVRDLPEELSLSFNAT	399
Perro	HVGSNDHYSASTTMDYPSLGLMTEKLSQKNINLIFAVTEGVVSLYQNYSELIPTGTVGVLSMDDSNVLQILVDAYGKIRSKVELEVRDLPEELSLSFNAT	395
Conejo	HIGGDHYSASTTMDYPSLGLMTEKLSQKNINLIFAVTEGVVSLYQNYSELIPTGTVGVLSVSSNVLQILVDAYGKIRSKVELEVRDLPEELSLSFNAT	399
Ratón	HIGTDHYSASTTMDYPSLGLMTEKLSQKNINLIFAVTEGVVSLYQNYSELIPTGTVGVLSMDDSNVLQILVDAYGKIRSKVELEVRDLPEELSLSFNAT	398
Pollo	HIDKDNFYSASTTMDYPSLGLMTEKLSQKNINLIFAVTEGVVSLYQNYSELIPTGTVGVLSMDDSNVLQILVDAYGKIRSKVELEVRDLPEELSLSFNAT	391
Xenopus	HLDLNDYAASTTMDYPSLGLMTEKLSQKNINLIFAVTEGVVSLYQNYSELIPTGTVGVLSMDDSNVLQILVDAYGKIRSKVELEVRDLPEELSLSFNAT	397
Cerdo	CLNNEVIPGLKSVGLKIGDVTVSFSIEAKVRGPPQEKEKSFITKPVGFKDSLIVQVTFDQDCAQAEAPDSPPRNNNGTPECGVCRGCPGLWGLGSCQCC	495
Humano	CLNNEVIPGLKSVGLKIGDVTVSFSIEAKVRGPPQEKEKSFITKPVGFKDSLIVQVTFDQDCAQAEAPDSPPRNNNGTPECGVCRGCPGLWGLGSCQCC	499
Perro	CLNNEVIPGLKSVGLKIGDVTVSFSIEAKVRGPPQEKEKSFITKPVGFKDSLIVQVTFDQDCAQAEAPDSPPRNNNGTPECGVCRGCPGLWGLGSCQCC	495
Conejo	CLNNEVIPGLKSVGLKIGDVTVSFSIEAKVRGPPQEKEKSFITKPVGFKDSLIVQVTFDQDCAQAEAPDSPPRNNNGTPECGVCRGCPGLWGLGSCQCC	499
Ratón	CLNNEVIPGLKSVGLKIGDVTVSFSIEAKVRGPPQEKEKSFITKPVGFKDSLIVQVTFDQDCAQAEAPDSPPRNNNGTPECGVCRGCPGLWGLGSCQCC	498
Pollo	CLNNEVIPGLKSVGLKIGDVTVSFSIEAKVRGPPQEKEKSFITKPVGFKDSLIVQVTFDQDCAQAEAPDSPPRNNNGTPECGVCRGCPGLWGLGSCQCC	491
Xenopus	CLNNEVIPGLKSVGLKIGDVTVSFSIEAKVRGPPQEKEKSFITKPVGFKDSLIVQVTFDQDCAQAEAPDSPPRNNNGTPECGVCRGCPGLWGLGSCQCC	497
Cerdo	SEKDYRFSQDECSPPQGGPICSQRGECICGQVCHSSDFGKITGKYCEDDFSVRYKGMGSGHGQCSGDCDLDSDWTGYGNTTTRTDTMSSNGL	595
Humano	SEEDYRFSQDECSPPQGGPICSQRGECICGQVCHSSDFGKITGKYCEDDFSVRYKGMGSGHGQCSGDCDLDSDWTGYGNTTTRTDTMSSNGL	599
Perro	SEEDYRFSQDECSPPQGGPICSQRGECICGQVCHSSDFGKITGKYCEDDFSVRYKGMGSGHGQCSGDCDLDSDWTGYGNTTTRTDTMSSNGL	595
Conejo	SEEDYRFSQDECSPPQGGPICSQRGECICGQVCHSSDFGKITGKYCEDDFSVRYKGMGSGHGQCSGDCDLDSDWTGYGNTTTRTDTMSSNGL	599
Ratón	SEEDYRFSQDECSPPQGGPICSQRGECICGQVCHSSDFGKITGKYCEDDFSVRYKGMGSGHGQCSGDCDLDSDWTGYGNTTTRTDTMSSNGL	598
Pollo	SEEDYRFSQDECSPPQGGPICSQRGECICGQVCHSSDFGKITGKYCEDDFSVRYKGMGSGHGQCSGDCDLDSDWTGYGNTTTRTDTMSSNGL	591
Xenopus	SEEDYRFSQDECSPPQGGPICSQRGECICGQVCHSSDFGKITGKYCEDDFSVRYKGMGSGHGQCSGDCDLDSDWTGYGNTTTRTDTMSSNGL	597
Cerdo	LQSGRGNCECGSCVCIQPGSYGDTCEKCPDPACTFKKKEVECKKFFRNGSLYEANTNRYRDEIESVKELQDSGKNAVNTYKNEDDCVVRFQYYEDS	695
Humano	LQSGRGNCECGSCVCIQPGSYGDTCEKCPDPACTFKKKEVECKKFFRNGSLYEANTNRYRDEIESVKELKDTGKDAVNTYKNEDDCVVRFQYYEDS	699
Perro	LQSGRGNCECGSCVCIQPGSYGDTCEKCPDPACTFKKKEVECKKFFRNGSLYEANTNRYRDEIESVKELKDTGKDAVNTYKNEDDCVVRFQYYEDS	695
Conejo	LQSGRGNCECGSCVCIQPGSYGDTCEKCPDPACTFKKKEVECKKFFRNGSLYEANTNRYRDEIESVKELKDTGKDAVNTYKNEDDCVVRFQYYEDS	699
Ratón	LQSGRGNCECGSCVCIQPGSYGDTCEKCPDPACTFKKKEVECKKFFRNGSLYEANTNRYRDEIESVKELKDTGKDAVNTYKNEDDCVVRFQYYEDS	698
Pollo	VQSGHGIQVCGKCDIIPGSGYNTCEKCPDPACTFKKKEVECKKFFRNGSLYEANTNRYRDEIESVKELQDSGKNAVNTYKNEDDCVVRFQYYEDS	691
Xenopus	LQSGRGNCECGSCVCIQPGSYGDTCEKCPDPACTFKKKEVECKKFFRNGSLYEANTNRYRDEIESVKELQDSGKNAVNTYKNEDDCVVRFQYYEDS	697
DOMINIO TRANSMEMBRANARIO		DOMINIO CITOPASMÁTICO
Cerdo	SGKSILYVVEEPEPKGPDILVLLSVMGAILLIGLATLLIWKLLITIDHRKEFAKFEERARAKWDTANNPLYKEATSTFTNITYRG-T	784
Humano	SGKSILYVVEEPEPKGPDILVLLSVMGAILLIGLATLLIWKLLITIDHRKEFAKFEERARAKWDTANNPLYKEATSTFTNITYRG-T	788
Perro	SGKSILYVVEEPEPKGPDILVLLSVMGAILLIGLATLLIWKLLITIDHRKEFAKFEERARAKWDTANNPLYKEATSTFTNITYRG-T	784
Conejo	SGKSILYVVEEPEPKGPDILVLLSVMGAILLIGLATLLIWKLLITIDHRKEFAKFEERARAKWDTANNPLYKEATSTFTNITYRG-T	788
Ratón	SGRAVLYVVEEPEPKGPDILVLLSVMGAILLIGLATLLIWKLLITIDHRKEFAKFEERARAKWDTANNPLYKEATSTFTNITYRG-T	787
Pollo	SGKSILYVVEEPEPKGPDILVLLSVMGAILLIGLATLLIWKLLITIDHRKEFAKFEERARAKWDTANNPLYKEATSTFTNITYRG-NM	781
Xenopus	SGKSILYVVEEPEPKGPDILVLLSVMGAILLIGLATLLIWKLLITIDHRKEFAKFEERARAKWDTANNPLYKEATSTFTNITYRG-NM	788

Figura 37: Comparación de la secuencia aminoacídica CD61 porcina con otras secuencias CD61. Sitios potenciales de N-glicosilación: negro; restos de cisteína: gris oscuro; sitios potenciales de fosforilación: rojo. Dentro del dominio rico en cisteína señalado en gris claro, están numerados los restos de aminoácidos dentro de las cuatro secuencias repetidas en tándem.

2.6. Localización cromosómica del gen porcino CD61

Para la localización cromosómica se utilizó un panel de células híbridas somáticas cerdo-roedor desarrollado por Yerle et al. (1996). Los resultados se obtuvieron por la segregación concordante entre los resultados de PCR obtenidos usando cebadores específicos y los fragmentos de cromosomas que contienen las células híbridas, tal y como se detalla en Materiales y Métodos. Se detectó una banda específica de 733 pares de bases en 9 híbridos (híbridos 16, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 27) de entre los 27 híbridos que constituyen el panel (**Figura 39**). Estos resultados permitieron localizar al gen CD61 en la región p11-2/3p13 del cromosoma porcino 12 (SSC12) con una probabilidad de 0.89 y un grado de error inferior al 0.1%.

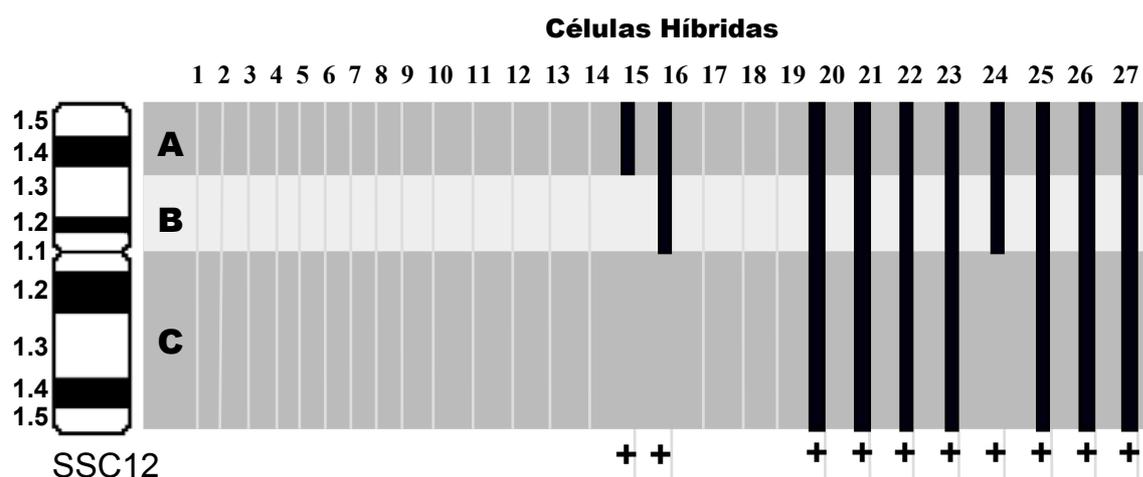


Figura 39: Diagrama representativo del cromosoma 12 porcino. Las barras verticales señalan los fragmentos cromosómicos contenidos en cada línea celular de híbridos somáticos. La letra se refiere a la región citogenética del cromosoma -A: 1/3p13-15, B: p11-2/3p13 y C: q11-q15-.

2.7. Análisis de la expresión de CD61 de cerdo a nivel de ARNm

La distribución tisular de CD61 de cerdo mediante la estimación de la expresión a nivel de ARNm se realizó empleando la técnica RT-PCR sobre ARN total aislado a partir de distintos tejidos. Los tejidos empleados fueron bazo, timo, médula ósea, macrófagos alveolares, plaquetas, PBL riñón e hígado y la RT-PCR fue llevada a cabo utilizando los cebadores específicos del gen: F797 y R2361 (**Tabla 10**), que generan un producto de amplificación de 1.590 pb.

5'-GAGAAGATTGGCTGGAGGAACGATGC-3'	F797
5'-CTAAGTGCCCCGGTAGGTGATGTTGG-3'	R2361

Tabla 10: Pareja de cebadores específicos de CD61 de cerdo utilizados para el estudio de su distribución tisular mediante RT-PCR.

Los resultados obtenidos fueron confirmados mediante Southern blotting empleando como sonda homóloga el mismo producto de amplificación marcado con digoxigenina, que pusieron de manifiesto que el ARNm que codifica para CD61 de cerdo presenta el nivel más alto de expresión en plaquetas, aunque se expresa, en menor medida, en el resto de tejidos y células linfoides, estando ausente su expresión en los tejidos no linfoides estudiados (riñón e hígado) (**Figura 40**)

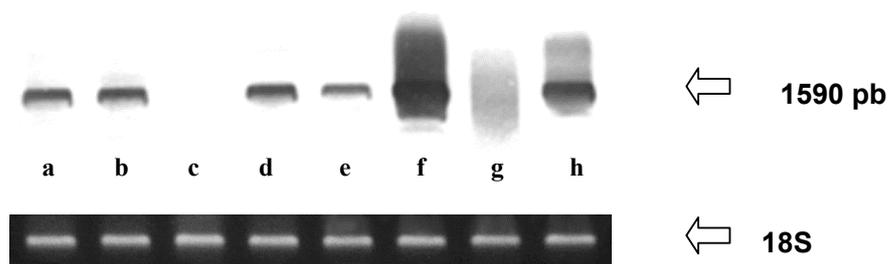


Figura 40: Estudio de expresión mediante RT-PCR sobre diferentes tejidos y células porcinos con los cebadores F797 y R2361: (a) timo; (b) macrófagos alveolares; (c) hígado; (d) bazo; (e) médula ósea; (f) plaquetas; (g) riñón y (h) leucocitos en sangre periférica.

2.8. Análisis de la expresión de la proteína CD61 en tejidos porcinos

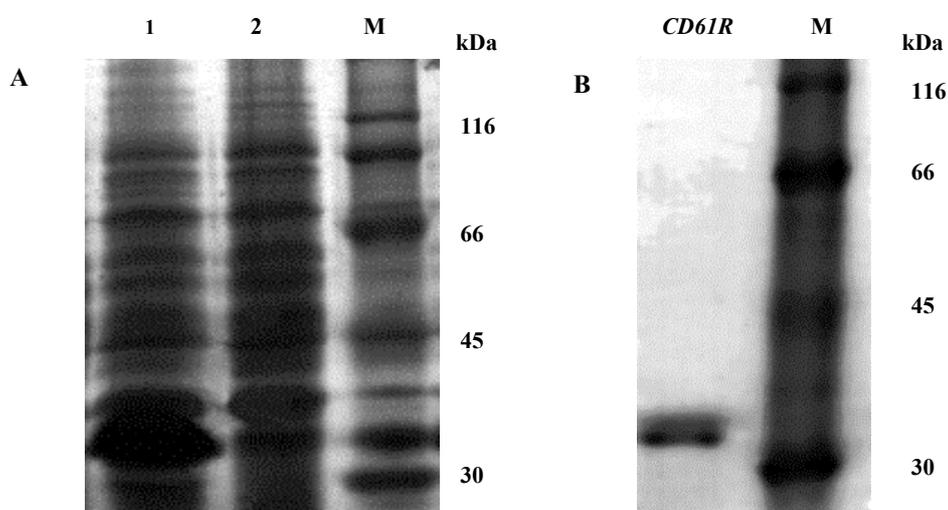
La distribución tisular de la proteína CD61 de cerdo fue determinada mediante anticuerpos monoclonales específicos y el empleo de técnicas inmunohistoquímicas.

Los anticuerpos monoclonales anti-CD61 utilizados en este trabajo fueron producidos mediante inmunización de ratones BALB/c con una proteína recombinante obtenida a partir de la secuencia porcina homóloga a la que en humano contiene los sitios de unión al ligando (Hu D.D. et al., 1999).

La proteína recombinante utilizada como inmunógeno, **CD61R**, de 33kDa, fue producida mediante el empleo del kit *pET* System, mediante la clonación en el vector de expresión procariota *pET*-28b de la secuencia nucleotídica de 742 pb comprendida entre las posiciones 101 y 843 (**Tabla**).

Con la construcción recombinante se llevó a cabo la transformación de un cultivo de bacterias *E. coli* BL21 (DE3) que fue inducido con IPTG. Como se observa en la **Figura 41 A** el nivel de expresión de la proteína **CD61R** se vio incrementado con la inducción por IPTG del cultivo transformado.

Finalmente, la proteína **CD61R** fue purificada mediante una columna Ni-NTA empleando un tampón de elución a pH 5.9 (**Figura 41 B**).



Figuras 41 A y B: (A) Electroforesis en SDS-PAGE de extractos celulares del cultivo inducido con IPTG (1) y sin inducir (2). M: marcador; (B) Electroforesis en SDS-PAGE de la proteína purificada **CD61R**. M: marcador de peso molecular.

Para la obtención de los anticuerpos monoclonales, se llevaron a cabo 2 fusiones. De la fusión I fueron seleccionados 30 híbridos por su reacción positiva en ELISA frente al inmunógeno, mientras que de la fusión II se seleccionaron 17. De los híbridos seleccionados, sólo 2 fueron estables en su crecimiento: **AJ2G11** (fusión I) y **AJRC2** (fusión II). Ambos híbridos presentan un isotipo IgM y su especificidad fue confirmada mediante inmunoblotting frente a la proteína recombinante **CD61R** en condiciones no reductoras (**Figura 42**).

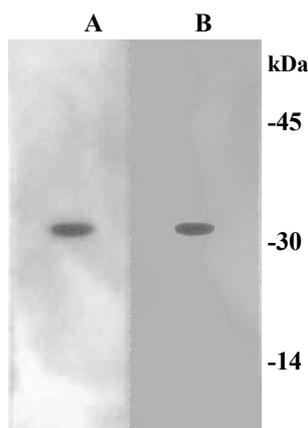


Figura 42: Inmunoblotting de control de los los AcMo **AJ2G11** (A) y **AJRC2** (B) frente la proteína **CD61R**.

La caracterización molecular del antígeno reconocido por los anticuerpos monoclonales *AJ2G11* y *AJRC2* fue llevado a cabo mediante inmunoprecipitación a partir de lisados de plaquetas marcadas con biotina.

El resultado correspondiente a *AJ2G11* se muestra en la **Figura 43**, en la que se observa que en condiciones reductoras, el anticuerpo monoclonal identifica dos bandas de 110 y 100 kDa, aproximadamente, correspondientes al tamaño de las cadenas α y β del receptor CD41/CD61 en estas condiciones (Pérez de la Lastra et al., 1997). La inmunoprecipitación realizada con el anticuerpo monoclonal *AJRC2* sobre lisados de plaquetas porcinas bajo las mismas condiciones no inmunoprecipitó proteína alguna.

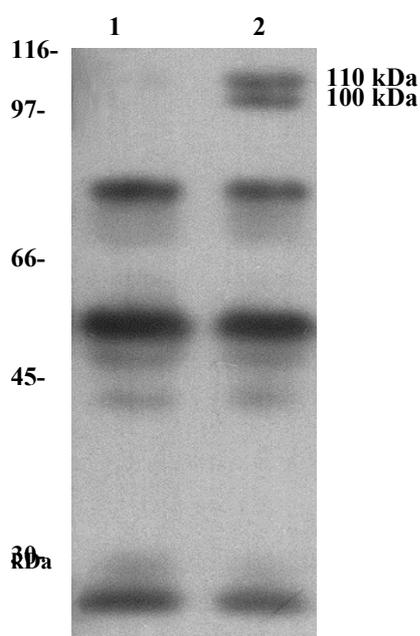


Figura 43: Inmunoprecipitación con el anticuerpo monoclonal *AJ2G11* a partir de un lisado de plaquetas en condiciones reductoras. 1: control negativo; 2: *AJ2G11*.

La distribución tisular y celular del receptor CD61 se analizó mediante técnicas inmunohistoquímicas en órganos linfoides y no linfoides.

Para la fijación de las muestras de tejido se utilizaron dos fijadores: formaldehído tamponado al 10% y líquido de Bouin. El fijador idóneo para la detección de los grupos antigénicos reconocidos por ambos anticuerpos monoclonales anti-CD61R, *AJ2G11* y *AJRC2*, fue el líquido de Bouin, al presentar el otro fijador una inmunorreacción más débil y menos homogénea.

Para establecer la dilución óptima de los anticuerpos monoclonales *AJ2G11* y *AJRC2* en este ensayo, se partió del sobrenadante puro en ambos monoclonales; sin embargo, los resultados manifestaron que el anticuerpo monoclonal obtenido de la fusión I (*AJ2G11*) no necesitaba ningún ajuste de dilución, mientras que el de la fusión II (*AJRC2*) precisó una dilución 1:10.

Las muestras tisulares se obtuvieron de tres cerdos: dos sin lesiones a nivel histológico y uno con lesiones características de la enfermedad de Glasser, infección por *Haemophilus parasuis* que cursa con septicemia, meningitis, artritis, poliserositis y lesiones locales debidas a la formación de coágulos en los vasos sanguíneos (Smith et al., 1990).

Bajo estas condiciones (líquido de Bouin y sobrenadante puro o diluido 1:10) se realizó la técnica sobre los siguientes tipos de tejidos porcinos: ganglio linfático, bazo, médula ósea, timo, riñón, pulmón e hígado.

Los resultados obtenidos con ambos anticuerpos monoclonales fueron idénticos. Sin embargo, a pesar de la calidad de las inmunorreacciones con ambos anticuerpos monoclonales, se observó que la obtenida con *AJ2G11* presentaba más nitidez y contraste entre zonas positivas específicas y zonas positivas inespecíficas.

Presentamos, pues, los mejores resultados obtenidos con ambos anticuerpos monoclonales, *AJ2G11* y *AJRC2*, en cada uno de los tejidos testados.

Bazo. Ambos anticuerpos monoclonales reaccionaron con el músculo liso vascular y trabecular, así como con el endotelio vascular y con macrófagos (**Figura 44**). Además se observó inmunorreacción de tipo puntiforme en la pulpa roja. Las estructuras inmunopositivas se identificaron como plaquetas mediante el uso de un anticuerpo frente al antígeno relacionado con el factor VIII (**Figura 45**). Con frecuencia, las plaquetas positivas se observaron formando un anillo periférico en megacariocitos no reactivos (**Figuras 46 y 47**). No se observó inmunorreacción en los linfocitos esplénicos.

Médula ósea. Se observó inmunorreacción principalmente en el citoplasma de células de la serie mieloide y de megacariocitos. Al igual que en el resto de tejidos, el anticuerpo monoclonal reaccionó intensamente con el músculo liso y los endotelios vasculares (**Figuras 48**).

Ganglio linfático. Se observó inmunorreacción en el músculo liso y el endotelio de los vasos sanguíneos, así como también en los monocitos presentes en los senos ganglionares. Las células linfoides fueron negativas (**Figura 49 y 50**).

Timo. Se observó inmunorreactividad en alguna de las células epiteliales de los corpúsculos de Hassall (**Figura 51**), mientras que el tejido linfoide es negativo.

Riñón. Se observó inmunorreactividad en la musculatura lisa de los vasos sanguíneos y sus células endoteliales (**Figura 52**), así como en el epitelio de los túbulos contorneados distales (**Figura 53**). Algunos leucocitos polimorfonucleares reactivos se observaron en los capilares glomerulares (**Figura 54**).

Pulmón. Como en el resto de tejidos, la inmunorreactividad se localizó en la musculatura lisa, tanto vascular como bronquial (**Figura 55**) y en las células

endoteliales. También se observó reacción en algunas células localizadas en el interior de los capilares sanguíneos. Estas células presentaron tanto una morfología redondeada, por lo que fueron identificados como monocitos circulantes, como una morfología fusiforme y adosados al endotelio vascular, por lo que fueron identificados como macrófagos intravasculares pulmonares (**Figura 56**).

Hígado. La incubación de cortes de hígado con los anticuerpos monoclonales revelaron inmunorreactividad en músculo liso vascular y en las células endoteliales, así como en células aisladas localizadas en los sinusoides hepáticos (**Figura 57**) y que corresponden a monocitos y a células de von Kupffer.

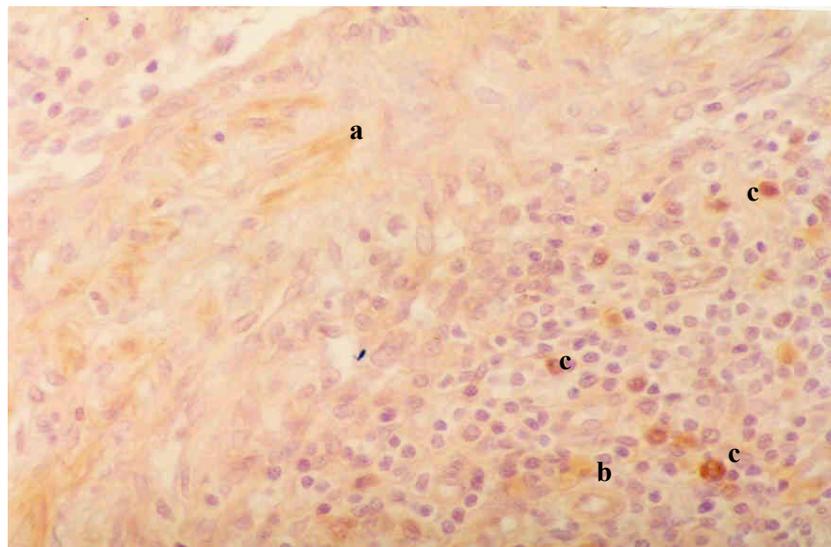


Figura 44: Bazo de cerdo. Se observa inmunorreactividad en las fibras musculares lisas de las trabéculas (a) y los vasos sanguíneos (b), así como en los macrófagos esplénicos (c). *AJ2G11*. Técnica inmunohistoquímica del ABC, contratinción nuclear con hematoxilina (40x).

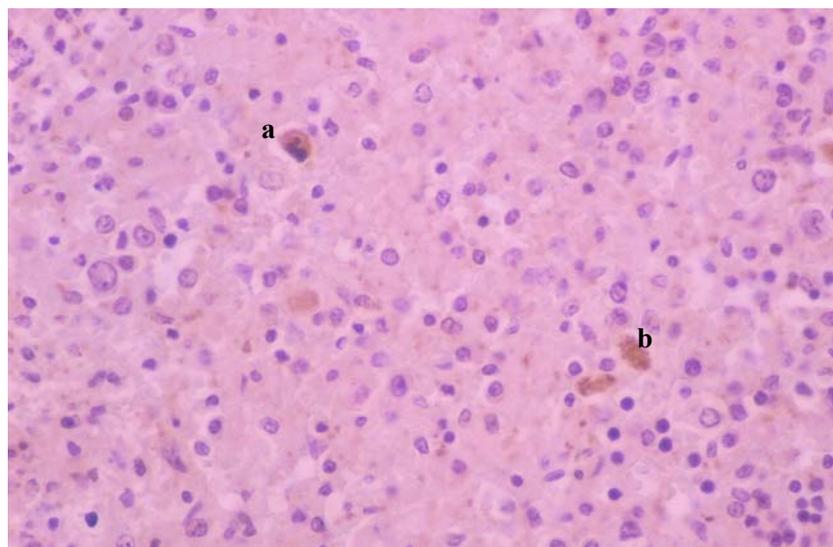


Figura 45: Bazo de cerdo. En esta imagen, se observan dos tipos de estructuras con el anticuerpo anti-antígeno relacionado con el factor VIII: un megacariocito (a) y grupos dispersos de morfología granular que corresponden a plaquetas (b). Técnica inmunohistoquímica del ABC, contratinción nuclear con hematoxilina (40x).

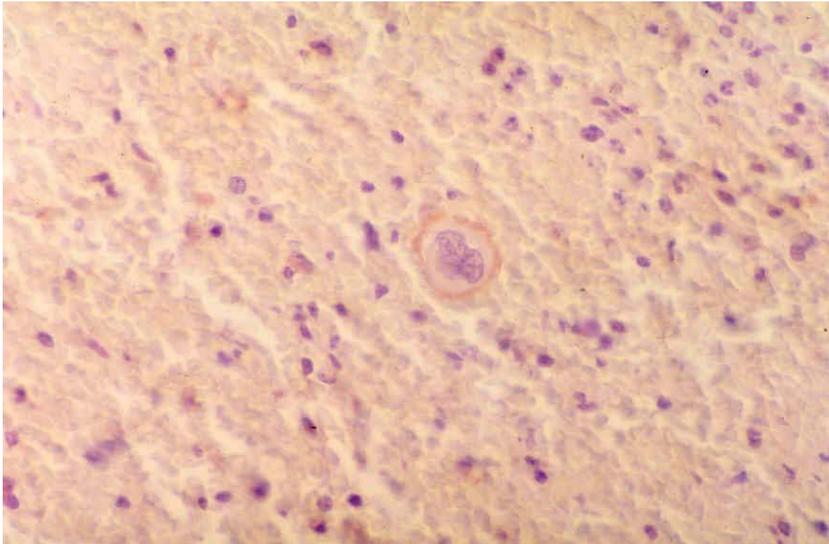


Figura 46: Bazo de cerdo. En la pulpa roja se observa un megacariocito que presenta una banda periférica positiva mientras que el resto de citoplasma es negativo. *AJ2G11*. Técnica inmunohistoquímica del ABC, contratinción nuclear con hematoxilina (40x).

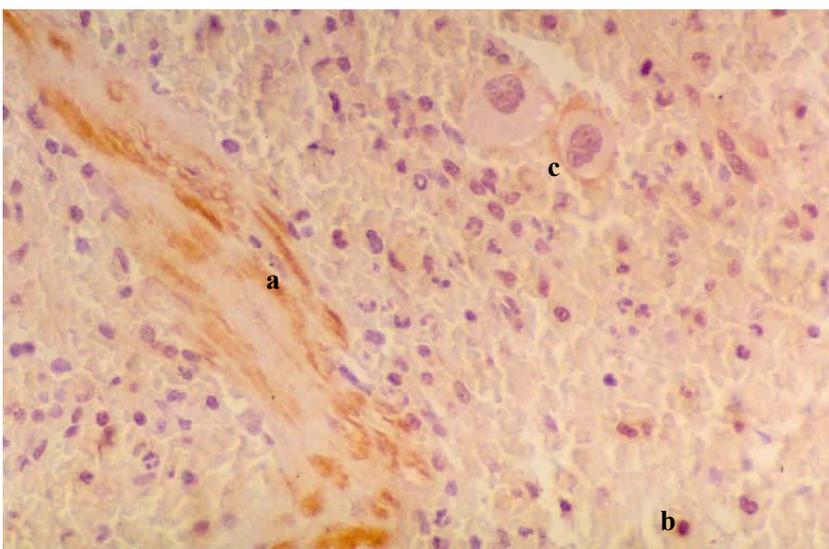


Figura 47: Bazo de cerdo. Se observa intensa positividad en las fibras musculares lisas de las trabéculas (a), en macrófagos aislados (b) y en uno de los dos megacariocitos en forma de halo periférico (c). *AJRC2*. Técnica inmunohistoquímica del ABC, contratinción nuclear con hematoxilina (40x).

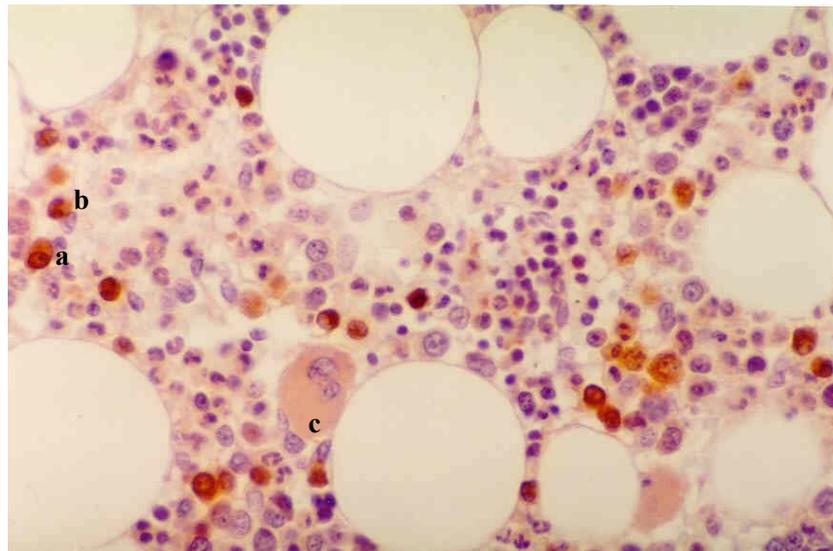


Figura 48: Médula ósea de cerdo. Se observa una intensa reacción en células redondas de núcleo único (a) o lobulado (b) así como en el citoplasma de un megacariocito (c) de forma más ligera. *AJ2G11*. Técnica inmunohistoquímica del ABC, contratinción nuclear con hematoxilina (40x).

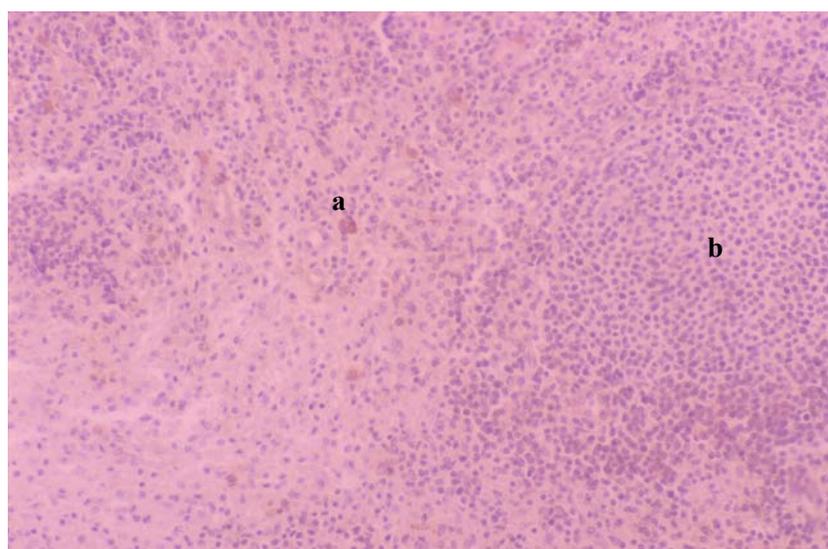


Figura 49: Ganglio linfático de cerdo. Se observan células positivas aisladas en la médula ganglionar de citoplasma grande (a) que corresponde a monocitos. Los linfocitos son negativos (b). *AJ2G11* Técnica inmunohistoquímica del ABC, contratinción nuclear con hematoxilina (20x).

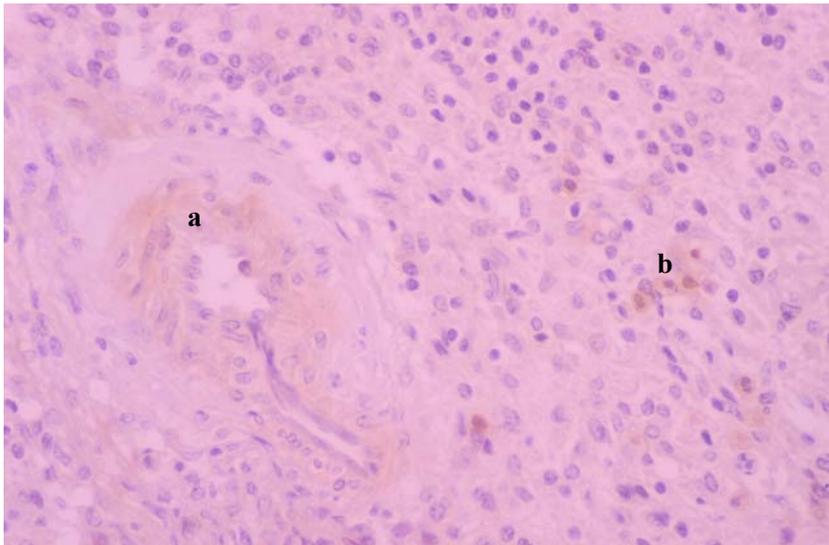


Figura 50: Ganglio de cerdo. A la derecha se observa inmunorreactividad en las fibras musculares lisas de una vena (a), mientras que a la izquierda se observan monocitos aislados positivos (b). *AJRC2*. Técnica inmunohistoquímica del ABC, contratinción nuclear con hematoxilina (40x).

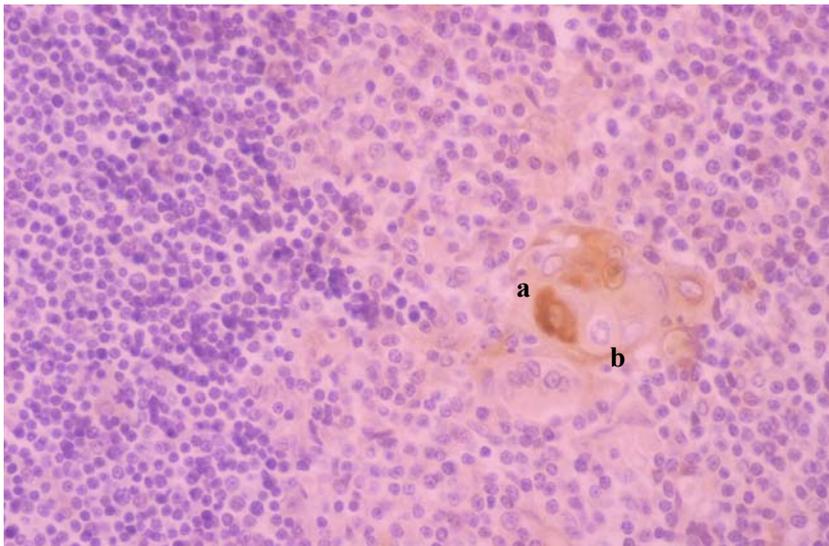


Figura 51: Timo de cerdo. Algunas de las células epiteliales de los corpúsculos de Hassall presentan positividad en el citoplasma (a) con ocasiones referencias de membrana (b). *AJ2G11*. Técnica inmunohistoquímica del ABC, contratinción nuclear con hematoxilina (40x).

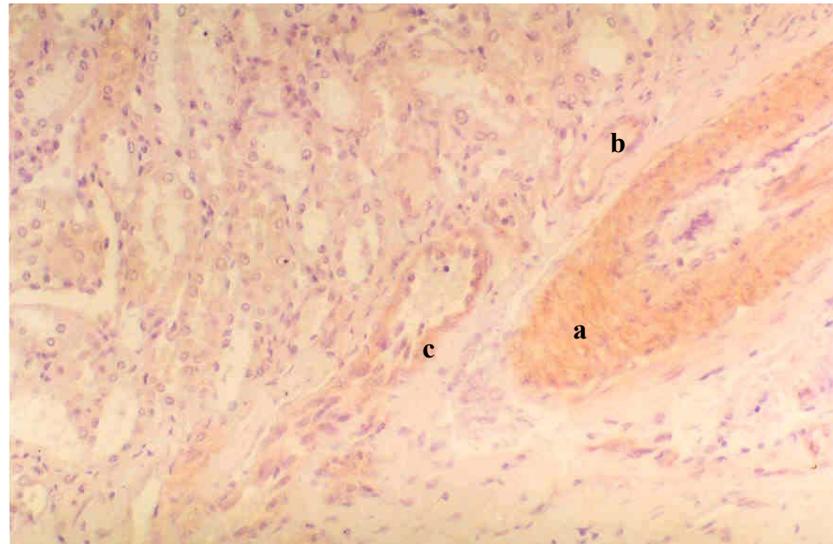


Figura 52: Riñón de cerdo. Se observa intensa positividad en la pared muscular de una vena (a), en el endotelio de una vénula (b) y en el epitelio de algunos túbulos renales (c). AJRC2. Técnica inmunohistoquímica del ABC, contratinción nuclear con hematoxilina (20x).

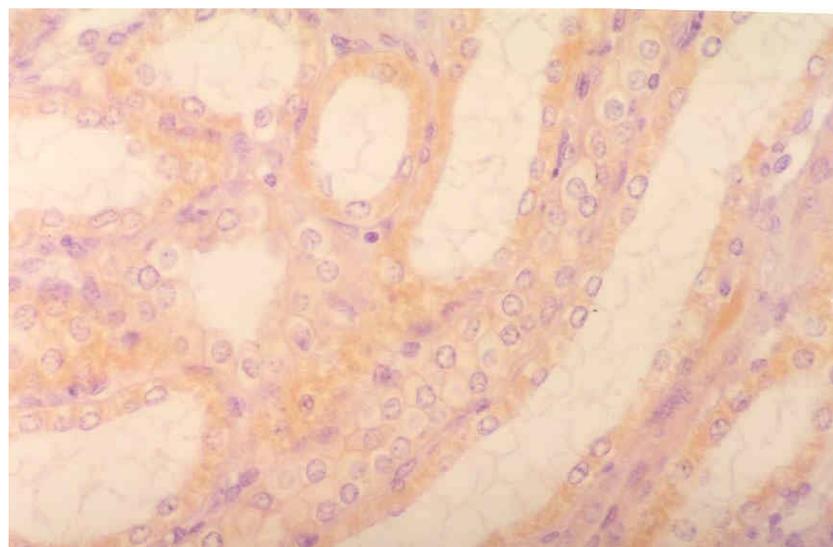


Figura 53: Riñón de cerdo. Se observa la reacción del anticuerpo AJ2G11 con las células epiteliales de algunos túbulos renales. Técnica inmunohistoquímica del ABC, contratinción nuclear con hematoxilina (40x).

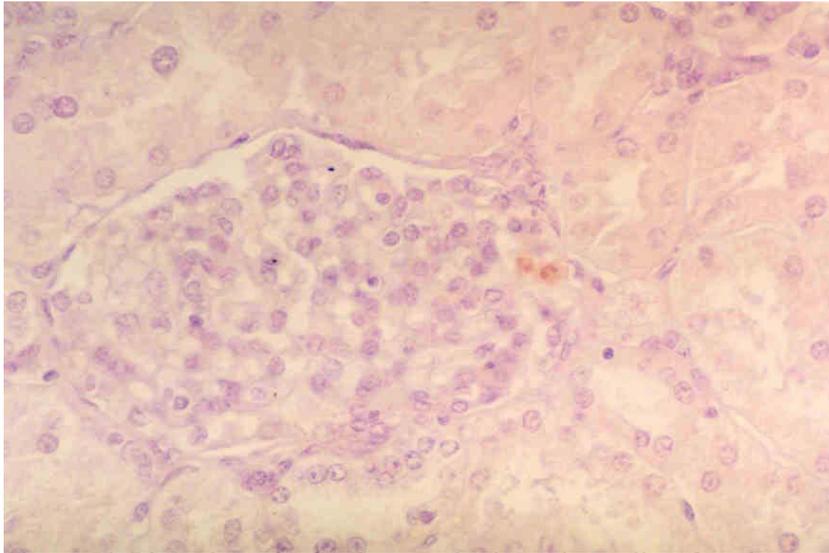


Figura 54: Riñón de cerdo. Se observan dos leucocitos polimorfonucleares en el interior de un glomérulo renal. **AJRC2** . Técnica inmunohistoquímica del ABC, contratinción nuclear con hematoxilina (40x).

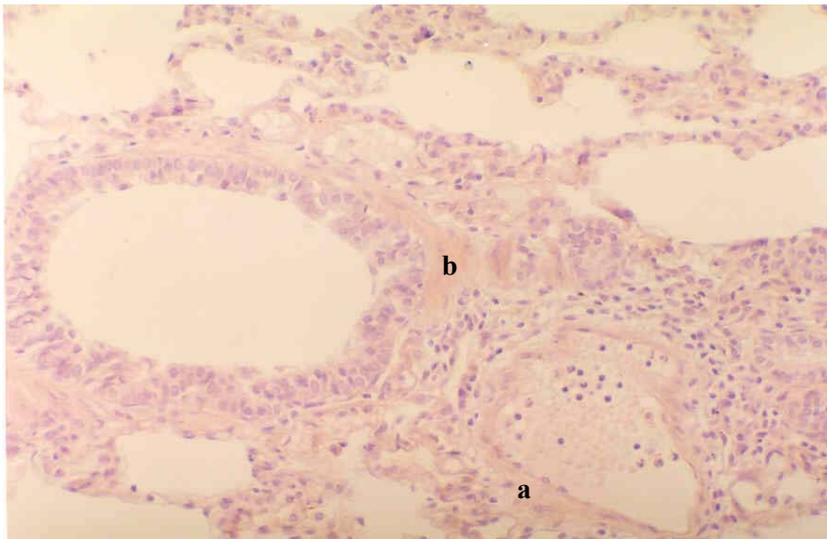


Figura 55: Pulmón de cerdo. Se observa reacción en el músculo liso vascular (a) y bronquial (b). **AJRC2** .Técnica inmunohistoquímica del ABC, contratinción nuclear con hematoxilina (20x).

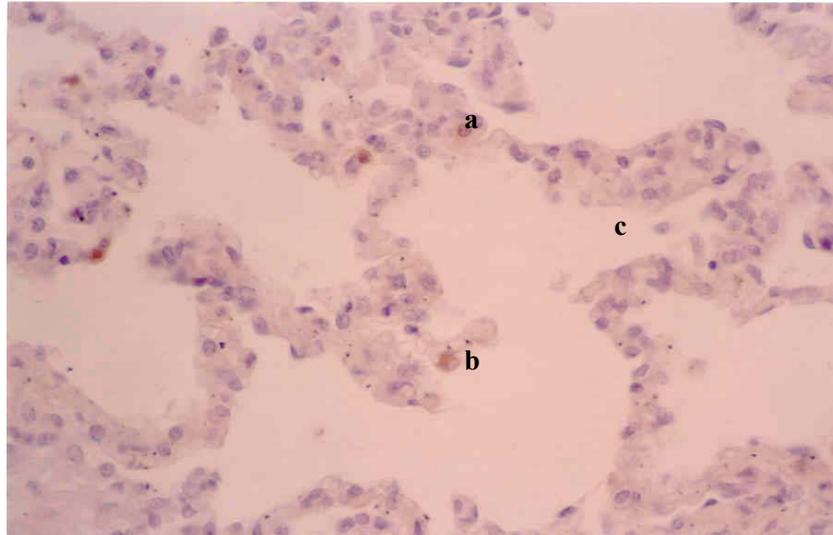


Figura 56: Pulmón de cerdo. Algunas células de los tabiques alveolares son positivas: monocitos (**a**) y macrófagos intravasculares pulmonares (**b**). Los macrófagos alveolares pulmonares (**c**) son negativos. **AJ2G11**. Técnica inmunohistoquímica del ABC, contratinción nuclear con hematoxilina (40x).

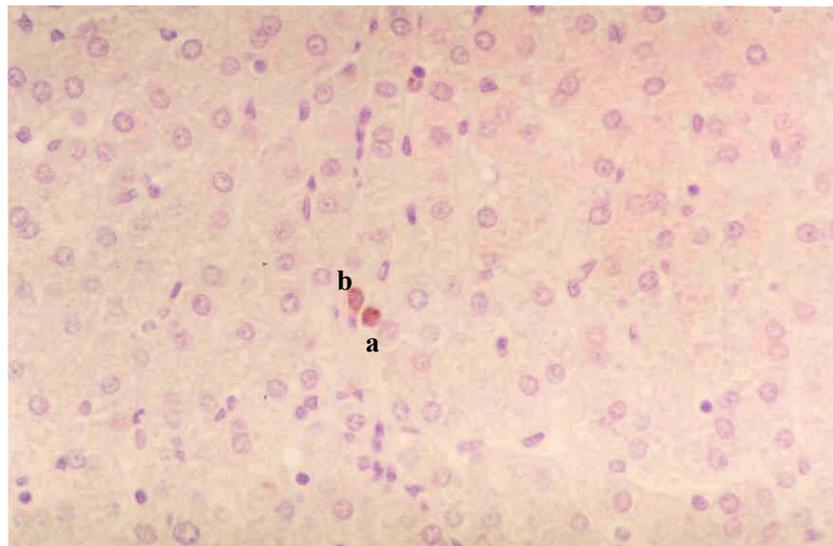


Figura 57: Hígado de cerdo. Se observan dos células positivas entre los cordones de hepatocitos negativos, que corresponden a un monocito (**a**) y una célula de von Kupffer (**b**) localizados en un sinusoides. **AJ2G11**. Técnica inmunohistoquímica del ABC, contratinción nuclear con hematoxilina (40x).

DISCUSIÓN

1. ESTRUCTURA DE LAS INTEGRINAS β_1 Y β_3 PORCINAS

La caracterización molecular de los receptores CD29 y CD61 en el cerdo ha revelado que, al igual que en el resto de las especies en las que han sido estudiadas, las β integrinas porcinas son glucoproteínas transmembranarias del tipo I, constituidas por un dominio extracelular mayoritario con aproximadamente 800 aminoácidos, una única región de anclaje a la membrana de la célula y un corto dominio citoplasmático de unos 50 aminoácidos o menos. Este esquema general de estructura se mantiene constante en todas las subunidades β caracterizadas hasta el momento, independientemente de la especie que se trate, con excepción de la subunidad β_4 humana que posee un dominio citoplasmático inusualmente largo, constituido por algo más de 1000 aminoácidos (Hogervorst et al., 1990).

1.1. CD29

La secuencia completa de la molécula CD29 ha sido por primera vez obtenida en la especie porcina, si bien algunas aproximaciones al conocimiento de su estructura han sido llevadas a cabo anteriormente mediante el empleo de anticuerpos monoclonales (Holzknecht y Platt, 1995; Richard et al., 1998). El resultado de estos trabajos previos fue la obtención de secuencias parciales de péptidos internos de la molécula que han sido confirmados en su totalidad mediante comparación con la secuencia de aminoácidos deducida en el presente trabajo (**Figura 58**).

N N I Q T I F A X T	Péptido interno extracelular
: : : : : : : :	
N N I Q T I F A V T	CD29 Porcino
K W D T G E N P I Y	Péptido interno citoplasmático
: : : : : : : :	
K W D T G E N P I Y	CD29 Porcino

Figura 58: Homología comparada de secuencias aminoacídicas de CD29 porcina y secuencias parciales de péptidos internos previamente caracterizadas por otros autores, los residuos conservados están señalados (:).

La comparación de la secuencia de CD29 de cerdo con sus moléculas homólogas caracterizadas en otras especies ha puesto de manifiesto el alto grado de conservación de esta molécula a lo largo de la evolución, observándose una mayor homología con las secuencias de mamíferos (una media del 95% de similitud), en contraste con la observada cuando se compara con las secuencias correspondientes a especies evolutivamente más alejadas: pollo, *Xenopus* e *Ictalurus* (84,5, 79,6 y 73,3%

respectivamente). El estudio de filogenia llevado a cabo mediante el cálculo de distancias genéticas, en base al análisis de homología de la secuencia del gen CD29, está en concordancia con la divergencia evolutiva de las especies, al agruparse los mamíferos comparados en un núcleo común diferenciado del resto de especies menos evolucionadas. Este resultado pondría de manifiesto que la variación dentro de este gen podría ser debida a presiones selectivas que tuvieron lugar en el momento de la especiación. De esta manera, si se asume la existencia de integrinas ancestrales en periodos evolutivos muy tempranos (Hynes, 1999), las modificaciones posteriores en la secuencia de los genes probablemente fueron consecuencia del progresivo desarrollo fisiológico de las especies y por consiguiente de la necesidad de dar respuesta a una mayor complejidad en los mecanismos de adhesión celular.

La similitud entre las distintas β_1 integrinas no se manifiesta únicamente a nivel de secuencia de nucleótidos o aminoácidos, sino que todas ellas comparten elementos estructurales comunes. Así, los primeros 20 aminoácidos de la molécula CD29 porcina son predominantemente hidrofóbicos y corresponden con probabilidad a la secuencia del péptido señal con una identidad de 18 de los 20 aminoácidos que la conforman con la secuencia humana en esta misma zona de la proteína (Argraves et al., 1987). En el extremo opuesto de la proteína, en la región carboxilo-terminal, un segmento de 23 aminoácidos hidrofóbicos constituye el dominio transmembranario de la molécula y muestra un 100% de identidad con todas las especies comparadas, a excepción del único representante de peces considerado. Similares niveles de homología entre especies muestra también el dominio citoplasmático de todas las subunidades β_1 integrinas, con el interés adicional de que todos presentan idéntica longitud. La conservación de este dominio en todas las especies estudiadas probablemente esté en relación directa con su función de interacción con proteínas presentes en el citoesqueleto de la célula como la actina, vinculina y tensina y otras implicadas en el proceso de regulación de la transducción de señales (Dedhar y Hannigan, 1996; LaFlamme et al., 1997).

La región extracelular de la proteína CD29 madura en la especie porcina presenta dos características estructurales típicas de las β integrinas. La primera, es su elevado contenido en el aminoácido cisteína, concretamente 56 residuos, cuya importancia en el mantenimiento de la estructura o función de estas moléculas puede ser deducida por el hecho de que se conservan en igual número y posición, no sólo en todas las subunidades β_1 comparadas en este estudio (**Figura 14**), sino también en las β_1 , β_2 , β_3 , β_5 y β_6 humanas e incluso en las subunidades β que han sido descritas en una especie tan alejada en la evolución como *Drosophila melanogaster* (Calvete et al.,

1991; Hynes, 1992). La mayoría de los residuos de cisteína, concretamente 31, constituyen, en la proximidad de la región citoplasmática, cuatro dominios homólogos, dispuestos en tandem e internamente unidos mediante puentes disulfuro. El primer dominio repetido es incompleto, mientras que los siguientes tres contienen ocho cisteínas cada uno y la siguiente secuencia consenso: C₁xxxxC₂xxxxC₃C₄C₅C₆xxxxC₇xxC₈.

La segunda característica de la región extracelular es que contiene 12 puntos potenciales de N-glucosilación. Si se considera que el peso molecular estimado de la secuencia de aminoácidos del polipéptido CD29 maduro es de 88,277 kDa y que el observado en geles SDS-PAGE es de 115 kDa, se podría concluir que todos los sitios potenciales de glucosilación en la molécula están ocupados. Si esto es así, la subunidad β_1 sería la integrina con mayor nivel de glucosilación presente en las membranas celulares de las células endoteliales porcinas y ello explicaría el hecho evidenciado en el xenotrasplante de ser la molécula endotelial más eficientemente reconocida por los anticuerpos anti-gal- α -(1,3)gal presentes en el suero humano.

El análisis de homologías entre las secuencias de aminoácidos llevado a cabo en este trabajo ha permitido evidenciar que los 12 puntos de glucosilación de la molécula porcina están conservados en número y posición en todas las demás especies de mamíferos estudiadas. A pesar de ello, algunas especies presentan particularidades, como es el caso de la rata, donde la diferencia existente entre el peso molecular estimado y el observado permite suponer que no todos los sitios potenciales de glucosilación parecen estar ocupados (Malek-Hedayat y Rome, 1995), como ocurre en las β_1 integrinas humana y porcina.

Por otro lado, la comparación de las distintas β_1 integrinas ha puesto de manifiesto que el número de lugares de glucosilación aumenta en la escala evolutiva (**Figura 14**), si bien es de interés resaltar que los siete puntos de glucosilación presentes en la molécula de *Ictalurus*, la especie más antigua de las consideradas en este trabajo, se mantienen conservados en igual número y posición en todas las especies, a pesar de la divergencia evolutiva posterior (**Figura 59**). De la misma manera, los 8 puntos de glucosilación presentes en *Xenopus* están incluidos en los 9 de pollo y éstos en los 12 de mamíferos, no existiendo aparentemente un lugar de glucosilación en la molécula de una determinada especie que no se encuentre incluido en los que aparecen en otra especie más evolucionada.

<i>Ictalurus punctatus</i>	N4—N5—N6	N8—N9—N10—N11
<i>Xenopus laevis</i>	N4—N5—N6	N8—N9—N10—N11—N12
<i>Gallus gallus</i>	N4—N5—N6—N7—N8—N9—N10—N11—N12	
Mamíferos	N1—N2—N3—N4—N5—N6—N7—N8—N9—N10—N11—N12	

Figura 59: Lugares potenciales de N-glicosilación en las moléculas CD29 de las especies analizadas. El ordinal añadido al aminoácido asparragina corresponde al orden de distribución en la secuencia aminoacídica de mamíferos.

1.2. CD61

La subunidad β_3 de las integrinas es probablemente la molécula de adhesión mejor estudiada en la especie humana por su implicación en procesos fisiológicos tan relevantes como el desarrollo embrionario, las metástasis tumorales, la agregación plaquetaria, la proliferación vascular y la cicatrización de heridas (Hynes, 1992). En los animales, los estudios dirigidos a la caracterización y análisis de la función de esta integrina han sido hasta el momento reducidos, a pesar de que, en las especies de interés económico y aquellas otras que pudieran ser empleadas como modelo animal de enfermedades humanas, un incremento en el nivel de conocimiento acerca de esta importante molécula estaría plenamente justificado.

En el presente trabajo, la caracterización molecular de la integrina CD61 de cerdo ha sido llevada a cabo empleando una estrategia alternativa a la utilizada para la caracterización de CD29 en la misma especie, gracias al empleo del anticuerpo monoclonal JM2E5, específico del complejo CD41/CD61 porcino (Pérez de la Lastra et al., 1997) que permitió la obtención del extremo amino terminal de la molécula CD61 porcina.

De manera similar a lo observado en el caso de la subunidad β_1 , la comparación de la secuencia de aminoácidos de CD61 de cerdo con la correspondiente a las moléculas β_3 de otros vertebrados, de nuevo pone de manifiesto el notable grado de conservación de las integrinas de la clase β en las distintas especies. Así, si bien se observa que la secuencia porcina presenta mayor similitud con sus homólogas en mamíferos (91% de media), cuando es comparada con especies evolutivamente más alejadas, como aves y anfibios, el nivel de identidad que se obtiene es también muy elevado (79,5% y 72,8%, respectivamente).

La conservación de esta proteína se hace aún más evidente cuando es considerado el nivel estructural en el análisis comparativo, y pone de manifiesto la existencia de similares dominios estructurales en las moléculas β_3 de todos los

vertebrados. Puesto que, como en todas las moléculas de interés biológico, la relación entre estructura y función está, en general, intrínsecamente relacionada, la conservación de las subunidades β_3 de las integrinas durante al menos los últimos 350 millones de años, a partir del momento en el que se produce la divergencia evolutiva de los anfibios, probablemente ha tenido lugar como consecuencia de la existencia de una fuerte presión selectiva sobre la estructura de estos receptores (DeSimone y Hynes, 1988; Davids et al., 1999).

Entre los dominios estructurales comunes observados en todas las β_3 analizadas, la secuencia del péptido señal en el cerdo está constituida por 22 aminoácidos, de manera similar a la observada en la especie canina, y con 4 aminoácidos menos que la que determina el gen humano (Villa-García et al., 1994). Esta diferencia es consecuencia de la repetición de seis pares de bases (CGGCCG) en la secuencia humana. Como se observa en la **Figura 60**, a pesar de que este motivo nucleotídico está presente en cerdo y conejo, en estas especie no se produce su repetición en tándem. En la **Figura 60** también queda reflejado que la menor longitud de la secuencia señal de la molécula β_3 porcina, en comparación con la humana, es consistente con las observaciones de McHugh y colaboradores en el ratón (*GeneBank Accesion AF026509*, 1998), especie en la cual el péptido señal determinado por el gen CD61 es también más corto que en humano.

Cerdo	M R A R P L W A A V L V V G A L A G V G V G atgcgagcg cggccg ctctgggcccgtgtgctggtggtggggcgctggcgggcgctggcgctcgga
Humano	M R A R P R P L W A T V L A L G A L A G V G V G atgcgagcg cggccg cgccc cggccg ctctgggcccactgtgctggcgctggggcgctggcgggcgctggcgtagga
Ratón	M R A Q W P G Q L W A A L L A G A L A G V V V V G atgcgagcgcagtggccggacaactctgggcccgtctgctggtggcgctggggcgctggcgggcgctggtgtgga
Perro	M R A R P L W A A V L V V G A L A G V G V G atgcgggcg cggccg ctctgggcccgggtgctgctgctggggcgctggcgggcaccggcgctcgga

Figura 60: Comparación de las secuencias de aminoácidos y nucleótidos correspondientes a las secuencias señales de las integrinas β_3 humana, de cerdo, perro y ratón. En azul ha sido señalado el motivo nucleotídico repetido dos veces en la secuencia humana y una sola en cerdo y perro.

El segundo segmento hidrofóbico de la molécula CD61 porcina está constituido por 29 aminoácidos y representa el dominio transmembranario, particularmente conservado en todas las especies analizadas. Concretamente, las secuencias porcina, canina y murina son idénticas y su nivel de homología con el resto es elevado, con un número de sustituciones en este fragmento muy reducido como se observa en la **Figura 61**.

Cerdo	714	ILVVL	SVMGAILLIGLATLLIWKLLITI	743
Humano	718	ILVVL	SVMGAILLIGLAA [■] LLIWKLLITI	747
Perro	714	ILVVL	SVMGAILLIGLATLLIWKLLITI	743
Conejo	718	ILVVL	SVMGAILLIGFA [■] LLIWKLLITI	747
Ratón	717	ILVVL	SVMGAILLIGLATLLIWKLLITI	746
Pollo	710	ILVVL	SVMGAILLIGLAA [■] LLIWKLLITI	739
Xenopus	716	ILVVL	MSVMGAILLIGLVA [■] LLIWKLLITI	745

Figura 61: Análisis comparativo de los dominios transmembranarios con las distintas β_3 consideradas. Están resaltados los residuos discordantes.

La conservación de los dominios transmembranarios en especies pertenecientes a clases distintas de vertebrados sugiere que, además de la hidrofobicidad, otras fuerzas selectivas, entre las que se pueden incluir la interacciones de la subunidad β con la subunidad α o con otras proteínas (DeSimone y Hynes, 1988), han debido actuar sobre dicha región de CD61, determinando de esta manera la permanencia de su importancia funcional a lo largo del tiempo.

El dominio citoplasmático es idéntico en todas las especies comparadas, a excepción de las dos especies más distantes evolutivamente, los representantes de aves y anfibios. Por homología con la secuencia humana, en la región citoplasmática de la molécula porcina se localizan dos sitios potenciales de fosforilación, el residuo 747 y el 753, correspondiendo a una tirosina y una treonina, respectivamente. La conservación de estos residuos entre las distintas β_3 y otras subunidades β integrinas, como la β_1 , permite sugerir que la fosforilación de estas moléculas podría estar relacionada con un mecanismo común de modulación de la avidéz de las integrinas por sus ligandos y en las interacciones de estos receptores de membrana con el citoesqueleto celular. En efecto, algunas evidencias experimentales sugieren que la fosforilación de la subunidad β_3 en la treonina₇₅₃, da lugar a una modificación de la carga iónica de la molécula, y está implicada en los cambios de conformación de los lugares específicos de unión al ligando del heterodímero $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Lerea et al., 1999). Por otro lado, el papel de la fosforilación de la tirosina₇₄₇ en el aumento de avidéz por el ligando permanece en controversia debido a contradictorios estudios mutacionales, si bien dicha fosforilación es requerida en las interacciones con el citoesqueleto (Calvete, 1999).

La secuencia de aminoácidos correspondiente a la proteína CD61 madura, esto es, la que resulta después de eliminar el péptido señal, presenta en el cerdo una longitud de 784 aminoácidos, el 90% de los cuales constituyen la región extracelular de la molécula. En la molécula humana, una de las características más representativas de este dominio es la presencia de dos largos puentes disulfuro que unen el extremo amino

terminal con la sección media de la proteína y esta a su vez con el extremo carboxilo. Estos dos grandes puentes intramoleculares están implicados en el mantenimiento de la estructura proteica de esta integrina y las cisteínas involucradas en dichas uniones corresponden a las posiciones C₁(5)-C₁₆(435) y C₁₄(406)-C₅₄(655), respectivamente (Calvete et al., 1991). En la molécula porcina, las 56 cisteínas que contiene el dominio extracelular se conservan en idéntico número y posición que en la secuencia humana por lo que cabe esperar que ambos puentes disulfuro también colaboren en el mantenimiento de la estructura proteica en esta integrina en el cerdo. Como se ha visto antes, similar patrón de distribución de las cisteínas extracelulares puede ser observado en la secuencia de la molécula porcina CD29 permitiendo suponer una conformación estructural similar en todas las integrinas de la clase β en la especie porcina.

La presencia en el dominio extracelular de la integrina β_3 porcina de una zona rica en cisteínas constituida por cuatro repeticiones en tándem de unos 40 aminoácidos en la proximidad de la región transmembranaria, confirmaría la anterior suposición. En la **Figura 62** se puede observar la semejanza estructural del dominio rico en cisteínas en las dos β integrinas caracterizadas en este trabajo, un dominio implicado en el mantenimiento estructural de la molécula y que recientemente ha sido descrito como zona de resistencia a la proteólisis en el dominio extracelular de la β_3 (Plow y Byzova, 1999). En base a la conservación de su estructura, cabe suponer la misma función de esta región en el resto de las β integrinas.

		1		2		3	4	5	6		7	8							
β_1	466	CQSEGIPSSPKCHDNGT	FECGACRC	NEGR-VG-----	RHCE-C	S	T	D	E	V	N	S	E	D	M	D	A	Y	515
β_3	459	CQAQAEPDSPRCNNGT	FECGVCHC	GPWG-LG-----	FQCE-C	S	E	K	D	Y	R	P	S	Q	Q	D	E	507	
		1		2		3	4	5	6		7	8							
β_1	516	CRKENS--SEICTN-NGE	CVCQGCV	CRKR	DNTNEI	YSGKF	CE-	C	D	N	F	N	-----	559					
β_3	508	CSPQQG--QPICSQ-RGE	CLCGQCV	CHSS	DFGK-IT-	GKYCE-	C	D	D	F	S	-----	549						
		1		2		3	4	5	6		7	8							
β_1	560	CDRSNG---LICG-GNG	VCKCRV	CECN	PN-YTG-----	SACD-	C	S	L	D	T	T	S	-----	598				
β_3	550	CVHYKG---EMCS-GHG	QCSGDC	L	C	D	S	D	-WTG-----	FYCN-	C	T	T	R	T	D	T	-----	588
		1		2		3	4	5	6		7	8							
β_1	599	CMAVNG---QIC-NGR	GVCEG	VCKCT	DPKFQ-----	GPTCE	M	C	M	Q	T	-----	635						
β_3	589	CLSSNG---LLC-SGR	GNCEG	SCVCI	QPGSY-----	GDTCE	K	C	P	T	-----	625							

Figura 62: Representación de la conservación del dominio rico en cisteína en las subunidades β integrinas caracterizadas en el presente estudio. Se encuentran resaltados y numerados los distintos restos de cisteínas que lo constituyen.

Finalmente, es necesario hacer mención al hecho de que la proteína CD61 porcina es una molécula menos glucosilada que CD29, al presentar únicamente ocho sitios potenciales de glucosilación, frente a los doce que hemos visto que presenta la subunidad β_1 . A pesar de que ambas integrinas están presentes en el endotelio vascular porcino, la notable diferencia en el número de moléculas de glucosilación entre ambas

explicaría razonablemente la menor implicación de la subunidad β_3 integrina en el rechazo hiperagudo al xenotransplante mediado por la acción de los anticuerpos naturales humanos. Por otro lado, como se pone de manifiesto en resultados, la distribución de estos sitios en las especies comparadas es más heterogénea que en el caso de CD29, y no se observa un aumento de lugares de glucosilación a medida que las especies alcanzan mayor grado de evolución.

En la especie humana la proteína CD61 es la integrina más polimórfica, con al menos 7 alelos caracterizados a nivel molecular, siendo este polimorfismo causado por mutaciones que provocan sustituciones en las posiciones aminoácidas 33, 40, 143, 407, 489 y 636 (Newman y Valentin, 1995). La secuencia de aminoácidos deducida de la β_3 porcina se corresponde con la forma alélica más frecuente en humano para cinco de los seis lugares de mutación: Leu₃₃Leu₄₀Arg₁₄₃Pro₄₀₇Arg₆₃₆, siendo la glutamina el aminoácido que ocupa la posición 489 en el cerdo, mientras dicha posición es ocupada con mayor frecuencia por la arginina en la raza caucásica (Newman y Valentin, 1995).

El polimorfismo de integrina β_3 está íntimamente ligado a la función de las plaquetas en la hemostasis (Nurden, 1995), presentando además un significativo carácter inmunogénico al desencadenar un número clínicamente importante de determinantes aloantigénicos que son responsables de la respuesta inmune que tiene lugar en algunos desórdenes inmunopatológicos como la trombocitopenia aloinmune neonatal (NATP) y el síndrome púrpura postransfusional (PTP) (Newman et al., 1989).

El polimorfismo de CD61 más frecuente implicado en estos desórdenes es el sistema PI^{A1}/PI^{A2} (o HPA-1a/HPA-1b), que es causado por una transición leucina (alelo HPA 1a) \rightarrow prolina (alelo HPA 1b) en la posición 33 de la secuencia de aminoácidos humana (Llanes D. et al., 2001). La molécula porcina caracterizada en este trabajo corresponde por tanto al alelo HPA-1^a (PI^{A1}), al presentar en la posición 33 el mismo aminoácido caracterizado en humano para este polimorfismo.

El sistema dialélico HPA-4 (Pen) corresponde al polimorfismo definido por la sustitución arginina (HPA-4a, Pen^a) \rightarrow glutamina (HPA-4b, Pen^b) en la posición 143 y es la causa más frecuente para los síndromes NATP y PTP en algunas poblaciones asiáticas (Wang et al., 1992). Algunos autores han considerado que este cambio en el aminoácido 143 podría afectar a la función de la molécula al localizarse en el dominio de unión al ligando RGD (Newman et al., 1995); sin embargo, se ha observado que la presencia de histidina, como en el caso de la β_3 canina no manifiesta cambios sustanciales en la agregación plaquetaria (Lipscomb et al., 1999). La arginina es el aminoácido en la posición 143 en la CD61 porcina, por lo tanto, correspondería al alelo HPA-4a.

Los sistemas aloantigénicos HPA-6, HPA-7 y HPA-8 son raros. El antígeno plaquetario HPA-6 (Ca) corresponde con el polimorfismo descrito en la posición 489: arginina (HPA-6a, Ca^a)→glutamina (HPA-6b, Ca^b) y ha sido asociado al síndrome NATP humano (Wang et al., 1993). La molécula porcina se corresponde con el alelo HPA-6b que es el que con mayor frecuencia se encuentra en el hombre.

El sistema aloantigénico plaquetario HPA-7 (Mo) involucra a la mutación en en el lugar 407 de la secuencia humana definido por el cambio prolina (HPA-7a, Mo^a) →alanina (HPA-7b, Ca^b) (Nurden, 1995) mientras que el sistema HPA-8 (Sr) se corresponde con la sustitución arginina (HPA-8a, Sr^a) →cisteína (HPA-8b, Ca^b) en la posición 636 y fue el primer aloantígeno plaquetario detectado en el síndrome NATP humano (Santoso et al., 1994). Para estas dos series polimórficas, la secuencia aminoacídica deducida de la molécula CD61 porcina presentaría los alelos más frecuentes en humano: HPA-7a y HPA-8^a respectivamente.

Por lo tanto, el modelo porcino podría ser ejemplar para las investigaciones de los mecanismos de las enfermedades que afectan a las especies humana y veterinarias, pudiendo ser también considerado a la hora de desarrollar agentes antiplaquetarios y estudios de terapia génica.

1.3 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN EN LAS SUBUNIDADES β INTEGRINAS

Como ha sido visto con anterioridad, la caracterización de las integrinas porcinas CD29 y CD61 ha puesto de manifiesto su elevado grado de conservación en otras especies de vertebrados. Numerosos autores han considerado que el grado de conservación estructural de las moléculas de adhesión está intrínsecamente relacionado con la conservación de su función (Schwartz et al., 1995; Shattil et al., 1998; Dedhar y Hannigan, 1996 Calvete, 1999). Esta relación entre la estructura de las integrinas y la función biológica que desarrollan ha sido estudiada fundamentalmente en el hombre mediante el empleo de anticuerpos monoclonales, ensayos con enzimas proteolíticas, mutagénesis dirigida a la modificación de potenciales motivos funcionales y técnicas de reacción cruzada con péptidos sintéticos inhibidores de la asociación ligando-receptor. El resultado ha sido un incremento en el conocimiento de las interacciones de los heterodímeros $\alpha\beta$ con sus ligandos específicos mediante la caracterización de las regiones estructurales de estas moléculas implicadas en la interacción con el ligando, la activación de la integrina o bien otras directamente relacionadas con la relación del receptor con el interior celular y la transducción de señales. Con el fin de elucidar la función de las integrinas β porcinas, hemos llevado a cabo una aproximación al estudio

de su estructura en base al hecho constatado en este trabajo de que muchas de las regiones funcionales de las integrinas β humanas están conservadas en las integrinas β porcinas.

1.3.1 Motivos funcionales de la región extracelular

1.3.1.1. Unión al ligando

Dentro del dominio extracelular de las subunidades β integrinas humanas se localizan dos regiones de unión al ligando. La primera es la secuencia localizada entre los aminoácidos 109-171 en la β_3 humana (correspondientes a 120-182 en la β_1) (D'Souza et al., 1988), implicada en la unión de la integrina a péptidos que contienen el motivo aminoacídico RGD (Arginina-Glicina-Aspártico). Dentro de esta región el motivo aminoacídico DXSXS (Asp119, Ser121, Ser123, en la subunidad β_3 humana) está absolutamente conservado en todas las subunidades β y su importancia en la unión de la integrina a su ligando específico ha sido demostrada mediante ensayos de mutación dirigida llevados a cabo sobre β_1 (Takada et al., 1992), β_2 (Bajt et al., 1995) y β_3 (Bajt y Loftus, 1994). En el cerdo aún no han sido llevados a cabo estudios funcionales similares, sin embargo nuestros resultados ponen de manifiesto la conservación de este motivo en las regiones homólogas de las integrinas β_1 y β_3 porcinas (**Figura 63 A**) permitiendo suponer un procedimiento de interacción de las integrinas porcinas con sus ligandos específicos muy similar al evidenciado en la especie humana.

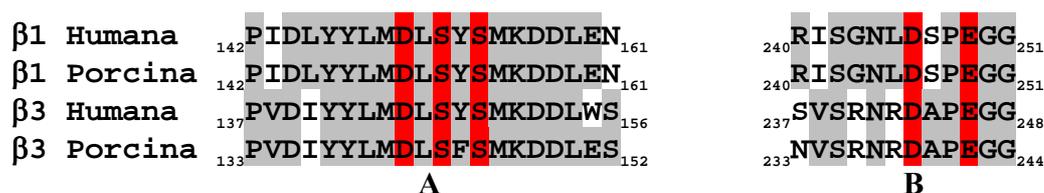


Figura 63: Comparación de las regiones funcionales de unión al ligando entre las subunidades β porcinas descritas en este trabajo y sus homólogas en la especie humana. **A:** sitio de unión al ligando que contienen la secuencia RGD; **B:** sitio de unión al fibrinógeno en la β_3 integrina. Resaltado en rojo se encuentra la conservación absoluta, mientras que en gris la conservación parcial.

La anterior suposición se ve sustentada cuando se considera el segundo sitio potencial que interactuaría con el ligando, descrito en la subunidad β_3 humana como lugar específico de unión al fibrinógeno (Charo et al., 1991) y constituido por los aminoácidos 211-222 (correspondientes a 220-231 en β_1). Como se observa en la **Figura 63 B**, esta región funcional tiene sus secuencias homólogas representadas en las

integrinas β_1 y β_3 , caracterizadas en esta tesis, en las que se mantiene la presencia de dos aminoácidos cuya participación en la interacción ligando-receptor se ha revelado esencial en la especie humana. Se trata de los residuos Asp₂₁₇ y Glu₂₂₀ de la subunidad β_3 humana cuya sustitución mediante mutagénesis dirigida supone la pérdida de la función del complejo $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Tozer et al., 1996). La conservación de estos aminoácidos en la β_3 porcina de la misma manera que están presentes en las β_1 humana y porcina probablemente sea un indicio de su importancia en la función de estas integrinas.

1.3.1.2 Activación

Las integrinas son proteínas alostéricas que pueden existir en un estado activo o inactivo, siendo únicamente en el primer caso cuando son competentes para establecer la interacción con su ligando específico. A nivel celular, la activación de una integrina puede ser controlada a través de su dominio citoplasmático mediante la transducción de señales desde el interior al exterior celular y viceversa. La secuencia 227-238 de la subunidad β_1 humana está situada entre las dos zonas directamente relacionadas con la unión al ligando anteriormente analizadas, y, aunque no está directamente implicada en esta interacción, los cambios producidos en su conformación podrían estar relacionadas con una pérdida de contacto entre las cadenas α y β , dando como resultado la exposición al ligando de ambas regiones (Green et al., 1998). Este hecho ha sido evidenciado mediante anticuerpos monoclonales específicos de este epítipo que son capaces de reconocer preferencialmente el estado activo de la integrina mientras que se unen con mucha menor afinidad al estado inactivo de la molécula (Mould et al., 1996). En la especie porcina, la regulación de la actividad de las β_1 integrinas podría ser ejercido de la misma manera que en humano ya que la secuencia NKGEVFNELVGK está presente íntegramente en su secuencia (**Figura 64**). Esta secuencia reguladora no se encuentra en las subunidades β_3 humana y porcina sugiriendo que el estado de activación en las integrinas β_3 debe ser regulado mediante un procedimiento diferente y hasta el momento desconocido.

β_1 Humana	227	NKGEVFNELVGK	238
β_1 Porcina	227	NKGEVFNELVGK	238
β_3 Humana	224	DQVTRFNEEVKK	235
β_3 Porcina	220	DQVTRFNEEVKK	231

Figura 64: Comparación del sitio de activación-inhibición entre las integrinas β_1 y β_3 humanas y porcinas. En rojo se señala la conservación absoluta entre las β_1 de ambas especies. En gris la conservación parcial de estas secuencias en las β_3 .

1.3.2 Motivos funcionales de la región citoplasmática

El dominio citoplasmático de las integrinas está conectado a los filamentos de actina que constituyen el citoesqueleto celular y está implicado en la transmisión de señales desde el exterior al interior de la célula (outside-in signaling). Por otro lado, mediante su interacción con proteínas intracelulares específicas, actúa modulando la afinidad de la integrina por su ligando mediante la propagación de cambios conformacionales hacia el dominio extracelular (inside-out signalling).

La caracterización molecular de la β_1 y β_3 porcinas revela la existencia en la región citoplasmática de ambas moléculas de dos potenciales dominios funcionales implicados en la regulación de adhesión celular mediada por las integrinas. Se trata de la de los motivos constituidos por las secuencias KLLxxxxD y NPxY que como se observa en la **Figura 65** están presentes en las β integrinas humanas y porcinas. La primera de estas secuencias, la más cercana a la zona transmembranaria contiene residuos importantes en la asociación de la cadena β con el motivo aminoacídico GFFKR, conservado en la mayoría de las cadenas α (Baker et al., 1997). En particular el aspártico terminal del motivo en β_3 ha sido evidenciado en humano que interactúa con la arginina de su motivo complementario en α_{IIb} (Hughes et al., 1996). Este aspártico está conservado en las secuencias de las integrinas β_1 y β_3 porcinas (**Figura 65**) sugiriendo que esta región es funcionalmente importante también en la especie porcina.

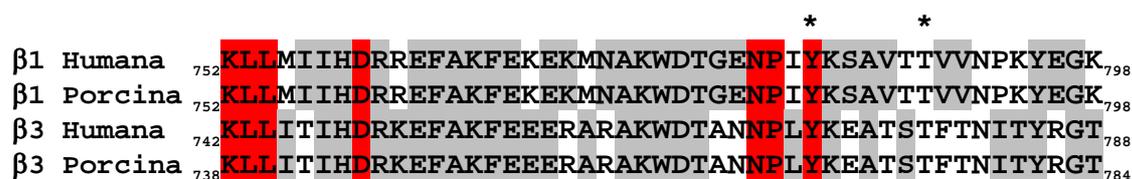


Figura 65: Comparación de la región citoplasmática de las subunidades β_1 y β_3 humanas y porcinas. La conservación de los motivos funcionales están señalados en rojo y conservación parcial de estos dominios en gris. Los asteriscos señalan la presencia de dos sitios potenciales de fosforilación.

El segundo dominio, el representado por el motivo NPxY, se encuentra presente en las regiones intracelulares de todas las β integrinas humanas, a excepción de la β_4 , y como también está conservado en las integrinas β porcinas caracterizadas en esta tesis. La importancia de esta secuencia ha sido generalmente puesta de manifiesto mediante ensayos de mutación dirigida que han demostrado su implicación directa en la activación de la molécula, esto es en la eficiencia en su interacción con ligandos específicos (Reszka et al., 1992).

Uno de los residuos que constituyen este segundo dominio funcional es una tirosina cuya fosforilación es requerida para que se desencadenen los fenómenos de unión al ligando, como ha sido evidenciado mediante estudios de mutación dirigida afectando a los residuos aminoacídicos que afectan a la interacción ligando-receptor (Schaffener-Reckinger et al., 1998). Otro sitio potencial de fosforilación en la región citoplasmática está representado por la treonina 779 de la cadena β_3 humana, conservada en las β_1 humana y porcina al igual que en la β_3 de cerdo (**Figura 65**). La fosforilación de este aminoácido ha sido propuesto como un mecanismo de regulación de la función de las moléculas de adhesión al observarse que la inhibición de las fosfatasa citoplasmáticas producen el bloqueo de algunas funciones de las integrinas como por ejemplo la agregación plaquetaria mediada por el receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Lerea et al., 1999).

2. LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA DE LOS GENES

Los genes para las subunidades β_1 y β_3 de cerdo han sido mapeados en colaboración con el *Departamento de Genética Celular* del Centro INRA de Toulouse (Francia) mediante el empleo de un panel de células híbridas somáticas cerdo-roedor desarrollado en el marco del Programa de Cartografía del Genoma Porcino (PigMap) en el que actualmente se encuentran implicados diversos grupos de investigación europeos y de EEUU.

El gen CD29 está localizado dentro del cromosoma 10 porcino (SSCR10) en la región q17, siendo, junto con la secuencia codificante de la proteína de expresión tumoral vimentina (Tosser-Klopp et al., 1998) el segundo gen porcino mapeado dentro de esta región. Este resultado está en consonancia con los datos de mapeo comparativo obtenidos hasta el momento y que tienen como objetivo el establecimiento de correspondencias entre las regiones cromosómicas humana y porcina (Goureau et al., 1996). De esta manera, la identificación de homología entre los cromosomas de ambas especies mediante el sistema denominado Zoo-FISH (Fröncke et al., 1996) ha evidenciado la correspondencia entre la región 1/2q12-q17 del cromosoma 10 porcino con el brazo corto del cromosoma 10 humano (HSAP 10p15-p11.2) y ello apoyado en la localización del gen de la vimentina humana en HSAP 10p13 (Ferrari et al., 1987).

El gen CD61 se encuentra en el cromosoma 12 de cerdo (SSCR12), en la región p11-2/3p13. De nuevo, como en el caso anterior, los datos de mapeo comparativo entre especies confirman este resultado ya que el cromosoma 12 porcino en su totalidad es homólogo al 17 humano (HSAP17) (Yerle et al., 1997). Además, el gen de la β_3

integrina humana está localizado en la región q21.32 de HSAP17 (Sosnoski et al., 1988) en una situación muy cercana al sitio de mapeo del gen α_{IIb} (Bray et al., 1987) constituyendo, junto con los genes GIP y HOX un grupo de sintenia que se agrupa de manera similar en el cromosoma 11 del ratón (Bentley et al., 1993). Como se observa en la **Figura 66**, en el cromosoma 12 porcino se presenta un agrupamiento de genes similar al que encontramos en el cromosoma 17 humano, por lo que podemos deducir la existencia de un grupo de ligamiento también en la especie porcina. Sin embargo, la comparación de ambos cromosomas nos indica una ordenación inversa de los genes en ambas especies, efecto que también ha sido puesto de manifiesto en cabra, en donde el reordenamiento genético es similar al que encontramos en cerdo (Pinton et al., 2000).

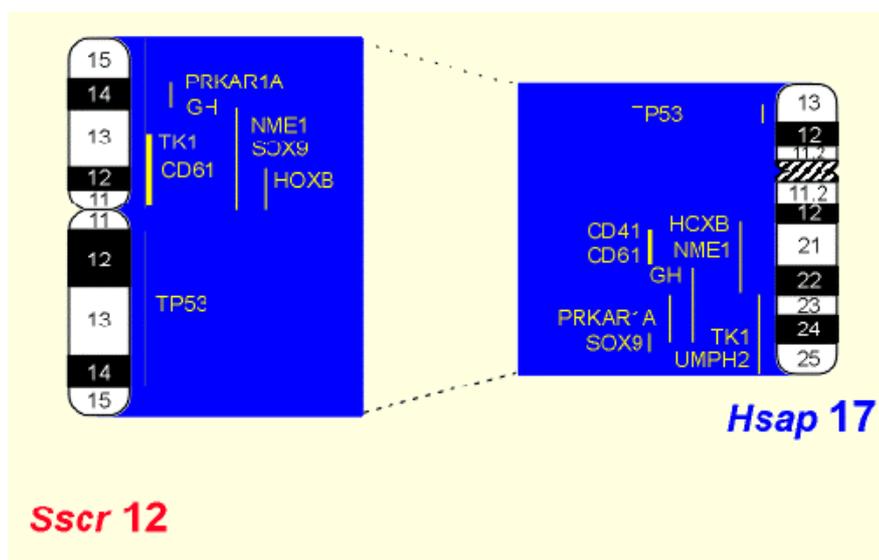


Figura 66. Mapa físico del cromosoma 12 de cerdo (SSCR12) y el 17 humano (HSAP17) indicando la correspondencia entre ambos

A pesar de que desde un punto de vista estructural las integrinas son moléculas heterodiméricas constituidas por una cadena α y otra β asociadas, en general, los genes que codifican para ambos tipos de moléculas no mapean juntos dentro del genoma. Así, en ninguna especie ha sido evidenciada la presencia de un sitio de ligamiento entre el gen CD29 y alguno de los genes que codifican para la amplia variedad de cadenas α con la que esta subunidad β_1 de las integrinas se encuentra asociada. Excepcionalmente, sin embargo, los genes para la integrina LFA-1 humana CD11a (subunidad α_L integrina) y CD18 (subunidad β_2 integrina) se localizan juntos en HSAP 21q2 (Corbi et al., 1988) y como ha sido indicado con anterioridad, los correspondientes al receptor de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$ (CD41/CD61) mapean juntos en HSAP 17q21. Algunos autores han relacionado este ligamiento genético con la función de

ambos receptores. Concretamente Thornton y col. (1999) proponen que el sitio cromosómico $\alpha_{IIb}\beta_3$ podría estar constituyendo un locus específico de expresión de la integrina durante el proceso de megacariopoyesis. Una hipótesis similar podría ser planteada en la especie porcina, aunque para ello, previamente habría de ser confirmada la presencia del gen CD41 en SSCR12.

3. EXPRESIÓN DE LAS INTEGRINAS β_1 Y β_3 PORCINAS

La expresión de las integrinas porcinas β_1 y β_3 ha sido estudiada en esta tesis desde la consideración de dos aproximaciones distintas y complementarias. En primer lugar ha sido analizada mediante RT-PCR la expresión de los transcritos de cada molécula en diferentes tejidos. A continuación, se abordó el estudio de la distribución celular de cada proteína mediante técnicas de inmunohistoquímica con un anticuerpo policlonal en el caso de CD29 y anticuerpos monoclonales para CD61.

Los resultados de RT-PCR indicaron la expresión del gen CD29 en todos los tejidos analizados, si bien con un nivel más reducido en aquellos tejidos de naturaleza no linfoide. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en otras especies, concretamente humano y ratón donde la expresión del ARNm que codifica para esta proteína presenta también una amplia distribución tisular (Altruda et al., 1990; Pinkstaff et al., 1999; Baudoin et al., 1996). Por otro lado, estudios preliminares en humano han puesto de manifiesto que los transcritos específicos del gen CD29 presentan niveles de expresión reducidos en tejidos no linfoides y no llegan a ser detectados por análisis de Northern-blot (Altruda et al., 1990).

La expresión de los transcritos específicos de CD61 es patente en tejidos linfoides, resaltando el alto nivel de expresión de este gen en plaquetas. Este análisis del gen CD61 porcino refleja, al igual que las referencias en humano, que su expresión no está limitada a las plaquetas, presentándose en otros tipos celulares (Wall et al., 1997). La alta expresión del gen CD61 porcino en plaquetas está en concordancia con la abundante presencia de esta proteína en la superficie de estas células, al estar descrito en humano alrededor de 80.000 copias del receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ en su superficie celular (Shattil et al., 1998).

Con la producción de anticuerpos frente a una secuencia parcial de ambos genes porcinos se analizó la distribución de sus heterodímeros en tejidos y células de cerdo mediante técnicas inmunohistoquímicas.

En estudios preliminares se observó que la fijación del tejido con formaldehído tamponado al 10% afectaba al reconocimiento del antígeno, enmascarando los grupos antigénicos y disminuyendo o incluso anulando la reacción con el anticuerpo. Este

hecho es atribuible a la acción desnaturalizante que este tipo de fijador ejerce sobre las proteínas, si bien es más eficaz en la inmovilización de los componentes proteicos y la conservación de su morfología (Palacín Forgue, 1984).

Al no existir un fijador universal, la elección debe de estar en función de los grupos antigénicos que se pretenden detectar, tratando de buscar un equilibrio entre la preservación de la morfología y de la inmunorreactividad (Palacín Forgue, 1984). En nuestro estudio el fijador que cumple estos requisitos es el líquido de Bouin.

La distribución tisular de la β_1 integrina porcina fue estudiada mediante el anticuerpo policlonal *anti-CD29R*. En general, el patrón de inmunorreacción en los distintos tejidos estudiados pone de manifiesto que esta proteína está expresada principalmente en músculo liso, endotelio de los vasos sanguíneos y células del linaje mieloide, y no se ha encontrado expresión en las células del linaje linfoide.

La presencia de CD29 en el músculo liso vascular probablemente sea debida al receptor $\alpha_1\beta_1$, como se pone de manifiesto con el estudio de Skinner y colaboradores (1994), donde se detecta este heterodímero en el músculo liso vascular de arterias humanas. La localización de esta integrina en músculo liso no vascular se debe presumiblemente a la integrina $\alpha_5\beta_1$, al estar descrita su homóloga humana en interacción con la fibrina (Yee et al., 1998). Sin embargo, en el endotelio puede estar reconociendo distintos miembros de la subfamilia β_1 , ya que el endotelio vascular humano expresa a $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha_6\beta_1$ (Kramer et al, 1990). A pesar de que la subunidad β_1 fue originalmente caracterizada en linfocitos T activados, formando parte de los heterodímeros $\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_2\beta_1$ (Hemler, 1990), el anticuerpo policlonal no reconoce este tipo celular, y ésto probablemente sea debido a la diferente expresión de CD29 durante la activación celular del tejido linfoide (Hemler, 1990), no siendo perceptible tal diferencia probablemente por la técnica de estudio empleada. Esta ausencia de inmunorreacción entre los linfocitos también se ha observado con otros estudios inmunohistoquímicos realizados en humano y ave (De Strooper et al., 1988; Favre et al., 1992). Estos trabajos preliminares concuerdan también con la presencia de reacción en la vasculatura y tejido muscular liso en estas especies (De Strooper et al., 1988).

El estudio de distribución tisular pone de manifiesto un aumento de expresión de la CD29 porcina conforme algunos tipos celulares progresan en su estado de maduración. Entre los tejidos que presentan esta distribución en la expresión de la β_1 se encuentra el intestino, donde se observa una graduación en la intensidad en la inmunorreacción conforme las células epiteliales de la mucosa intestinal se diferencian, localizándose la mayor intensidad de reacción en las células con mayor estado de maduración, en los bordes estriados de los villi y las glándulas (**Figura 25**). Al analizar

la expresión de esta molécula en tonsilas se observa también una distribución heterogénea relacionada con el estado de maduración de las células. En este tejido las células menos maduras no presentan inmunorreacción, correspondiendo a la capa basal germinativa del epitelio escamoso. Con su progresiva maduración hacia la superficie, se observa un aumento en la intensidad de reacción y aparecen más marcadas las células apicales del epitelio escamoso de la superficie y de las criptas tonsilares (**Figura 28 y 29**). En la médula ósea se distingue el grado de maduración en los megacariocitos observándose mayor marcaje del citoplasma de los megacariocitos maduros y apareciendo más débilmente marcado el citoplasma de los inmaduros. En la especie humana también se ha evidenciado este patrón inmunohistoquímico de aumento de expresión de esta proteína conforme se desarrolla la maduración celular en un estudio de expresión en timo, ganglio linfático y piel (Favre et al., 1992).

Esta interesante distribución de la proteína en estos tejidos sugiere que el receptor CD29 porcino podría ser considerado como un posible marcador de la diferenciación de algunos tipos celulares. Este papel es conocido en su homólogo humano, donde experimentos con anticuerpos inhibidores evidencian una importante función de esta proteína durante la diferenciación de un gran número de tipos celulares, incluyendo los osteoclastos, las células epiteliales mamarias, queratinocitos y los mioblastos (Brakebusch et al., 1997).

Para el estudio inmunohistoquímico de la β_3 integrina se utilizaron los anticuerpos monoclonales *AJ2G11* y *AJRC2*, obteniendo idénticos resultados en ambos casos. En primer lugar, hay que destacar su nivel de reacción en el endotelio vascular de todos los tejidos, debida probablemente a la expresión constitutiva del gen, evidenciada también por algunos autores en estudios de expresión de la integrina β_3 y el receptor $\alpha_V\beta_3$ en cerdo y rata, respectivamente (Singh et al., 2000; Moreno et al., 2002). Otro tejido donde se observa siempre la expresión de esta integrina es en músculo liso, localizándose en los vasos sanguíneos, las trabéculas del bazo y el tejido bronquial. Esta expresión, también se debe probablemente a la presencia de $\alpha_V\beta_3$ en este tejido, como se ha sido indicado en estudios previos de expresión en humano (Yee et al., 1998). Ambos anticuerpos monoclonales son además marcadores de la serie mielode al aparecer inmunoreactividad en todos los tejidos analizados donde hay presencia de este tipo celular. De esta forma se encuentran marcadas las células de la serie mielode en la médula ósea, macrófagos en el bazo, monocitos del ganglio linfático, pulmón e hígado, y leucocitos polimorfonucleares en el glomérulo renal.

Sin embargo, los anticuerpos monoclonales *AJ2G11* y *AJRC2* no presenta inmunoreactividad frente a células del linaje linfode, como ha sido observado en las preparaciones de ganglio linfático, timo y bazo. Este mismo resultado se ha puesto de

manifiesto en humano mediante el empleo del anticuerpo monoclonal 7E3, sobre poblaciones de linfocitos de tonsilas, timo, ganglio linfático, bazo o apéndice intestinal humanos (Zutter, 1991).

El empleo de muestras de bazo procedente de un cerdo con la enfermedad de Glasser permitió observar la liberación de plaquetas a partir de megacariocitos conforme sufrían su diferenciación celular en el proceso de megacariocitopoyesis. La enfermedad de Glasser se caracteriza por la aparición de una infección generalizada por la bacteria gramnegativa *Haemophilus parasuis* (Smith et al., 1990). El shock séptico producido por esta enfermedad provoca una respuesta inmunológica extrema por parte del organismo, llegando a producir lesiones vasculares que conducen a la activación del sistema de coagulación (Cotran et al., 2000). La necesidad por parte del organismo de aumentar la respuesta inflamatoria y favorecer la eliminación de las lesiones vasculares provocan un déficit plaquetario que debe ser contrarrestado mediante la activación de sus precursores celulares, provocando la inusual presencia de los megacariocitos en el bazo (Cheville, 1999). Estos megacariocitos liberan las plaquetas dentro de la pulpa roja esplénica observándose alrededor de su progenitor en forma de anillo periférico, siendo más reducido en megacariocitos inmaduros que en maduros (**Figura 46 y 47**), como se evidencia mediante el uso de ambos monoclonales y con un marcador de plaquetas (Factor VIII) para comprobar la especificidad de la inmunorreacción. También se observa con frecuencia reactividad en agrupaciones de plaquetas distribuidas de forma heterogénea en la pulpa esplénica (**Figura 45**).

Este efecto no se observa en muestras de médula ósea de cerdos fisiológicamente normales. En este tejido el abastecimiento constitutivo de plaquetas por parte de estos animales, en ausencia de este tipo de respuesta inmunológica extrema, hace que los anticuerpos muestren una inmunorreactividad menos evidente, apreciándose la reacción de forma más ligera en el citoplasma de sus precursores (**Figura 48**). Este hecho es debido probablemente a la presencia en el citoplasma de α -gránulos que sufren también un proceso de maduración conforme los megacariocitos se diferencian en plaquetas y en los que se encuentra el receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Heijnen et al., 1998).

Por lo tanto, ambos anticuerpos podrían constituirse como posibles marcadores de la maduración de este tipo celular al observarse una reacción más patente del megacariocito liberando plaquetas en el bazo y una tinción más débil en el citoplasma del megacariocito en la médula ósea debido probablemente al proceso de diferenciación celular que da lugar a las plaquetas.

En las preparaciones de pulmón la reacción con ambos anticuerpos está presente en algunas células mononucleadas, identificadas como monocitos y macrófagos. Esta

distribución tisular se observa en parte también en un estudio previo de expresión en cerdo realizado con el anticuerpo anti- $\alpha_V\beta_3$ (Singh et al., 2001) que reaccionó con células mononucleadas del parénquima pulmonar y los espacios alveolares, pero sin especificar qué tipos celulares eran. Sin embargo nuestros anticuerpos evidencian la expresión de CD61 en células mononucleadas localizadas en el interior de los capilares sanguíneos del parénquima pulmonar, identificándose por su morfología como monocitos circulantes y macrófagos intravasculares pulmonares (M.I.Ps.), no reconociendo ninguna de las células en el espacio alveolar, que han sido identificadas en nuestro caso, como macrófagos alveolares pulmonares (M.A.Ps.) (**Figura 56**). La ausencia de inmunorreacción en esta subpoblación celular, probablemente sea debida a la pérdida de adhesión de estos macrófagos al endotelio, que posiblemente esté mediada por esta integrina, o bien al uso de un fijador que afecte a la conformación de este receptor de membrana en la preparación de la muestra en estudio. Profundizar en el reconocimiento de los M.I.Ps., uno de los tipos celulares reconocidos, sería de gran interés ya que forman una subpoblación de macrófagos altamente reactiva adherida al endotelio capilar del pulmón con gran importancia inmunológica y distintos papeles de vigilancia en algunas especies de mamíferos (Chitko-McKown y Blecha, 1992L).

La expresión de la subunidad β_3 porcina con ambos anticuerpos monoclonales en riñón presenta inmunorreacción similar a la descrita en trabajos preliminares en cerdo (Singh et al., 2001; Moreno et al., 2002), localizándose reactividad en el epitelio de los túbulos renales (**Figura 53**). Una revisión de la expresión de las integrinas en este tejido en mamíferos, entre los que no se encuentra la especie porcina, ponen de manifiesto una expresión más amplia de esta integrina al localizarse en los podocitos y la cápsula de Bowman de los glomérulos renales (Kreidberg y Symons, 2000). Sin embargo, esta expresión no es detectada por los anticuerpos monoclonales *AJ2G11* y *AJRC2*, por lo tanto, el resultado indicaría que la subunidad β_3 porcina podría mostrar una distribución más restringida en este tejido. Por otra parte, la presencia de esta integrina en el epitelio porcino ha sido también observada en las preparaciones de timo empleadas, donde se observa que las células epiteliales que constituyen los corpúsculos de Hassall en este órgano aparecen marcadas con los anticuerpos monoclonales empleados.

Por último, en hígado la expresión de CD61 porcina con ambos anticuerpos monoclonales presenta inmunorreacción en células aisladas de los sinusoides hepáticos que corresponden a células de von Kupffer (**Figura 57**). Un trabajo previo de esta integrina en cerdo describe inmunoreactividad no sólo en estos macrófagos hepáticos sino también en el epitelio de los conductos biliares (Singh et al., 2001). Sin embargo, no se dispone de mucha más información en cuanto a su distribución tisular y, como en

el caso anterior, parece tratarse de un tejido con una expresión reducida de esta integrina, como se pone de manifiesto en trabajos previos (Moreno et al., 2002; Singh et al., 2001).

CONCLUSIONES

1. Mediante el empleo de sondas específicas de ADN y genotecas de expresión, han sido caracterizadas las secuencias codificantes de los genes de las subunidades β_1 y β_3 de las integrinas porcinas. El análisis de la estructura molecular de estas proteínas y la comparación con sus homólogas en distintas especies de vertebrados han puesto de manifiesto el elevado grado de conservación que mantienen estas moléculas a lo largo de la evolución. Esta conservación estructural, con probabilidad deberá estar relacionada con un mantenimiento de la función de ambas integrinas en los procesos de adhesión celular que tienen lugar en la especie porcina.

2. La subunidad β_1 presenta 12 sitios potenciales de N-glicosilación mientras que la β_3 presenta únicamente 8. Esta diferencia en el nivel de glucosilación de ambas moléculas probablemente sea el motivo de que CD29 sea más eficientemente reconocida que CD61 por los anticuerpos naturales humanos en el xenotransplante.

3. El gen CD29 mapea en la región q17 del cromosoma 10 del cerdo, y el gen CD61 en la región p11-2/3p13 del cromosoma 12. Ambas localizaciones están en consonancia con los datos de mapeo comparativo llevado a cabo entre las especies humana y porcina confirmando, la correspondencia entre la región 10q12-q17 y el cromosoma 12 en el cerdo y la región 10p15-p11.2 y el cromosoma 17 humano, respectivamente.

4. El estudio de expresión de la subunidad β_1 de las integrinas ha indicado que esta proteína se expresa exclusivamente en músculo liso, endotelio vascular, epitelio y células hematopoyéticas del linaje mieloide, pudiendo ser considerada un marcador de este último tipo celular frente a las células de linaje linfóide en donde no aparece expresada.

5. El análisis de la distribución tisular de la proteína CD29 porcina ha puesto de manifiesto el aumento en su nivel de expresión a medida que progresaba el estado de maduración en algunos tipos celulares, indicando que al igual que en la especie humana, en el cerdo, la subunidad β_1 de las integrinas podría representar un importante papel en los procesos de diferenciación celular.

6. El estudio de expresión de la subunidad β_3 de las integrinas porcinas pone de manifiesto que, se trata de una molécula con un patrón de distribución similar al observado en otros vertebrados, con presencia en músculo liso, endotelio, epitelio, plaquetas y células del linaje mieloide. Sin embargo, los resultados obtenidos en riñón e hígado reflejan que en el cerdo esta molécula presenta una expresión más restringida que su homóloga humana.

7. La ausencia de expresión de CD61 en células del linaje linfoide indica que esta molécula puede ser considerada como un marcador del linaje mieloide, dentro del cual ha manifestado una heterogeneidad en la expresión en megacariocitos en diferente estado de maduración, lo que puede estar relacionado con una posible función de esta molécula en la diferenciación de este tipo celular.

8. Los anticuerpos monoclonales *AJ2G11* y *AJRC2* reconocen los macrófagos intravasculares pulmonares, pero no los macrófagos alveolares pulmonares, sugiriendo su posible utilidad en la distinción de estas dos importantes subpoblaciones celulares cuya función está relacionada con la vigilancia inmunológica dentro del pulmón.

ANEXOS

ANEXO 1: REACTIVOS

Agua DEPC (dietilenopirocarbonato): 0,2% DEPC (*Sigma*), agitar vigorosamente durante una hora e inactivar el reactivo mediante el autoclave.

CTAB 5%: 2,5 g de bromuro hexadeciltrimetil amonio (*Merck*) en 50 ml.

Formamida desionizada: A la formamida (*Sigma*) se añade resina de intercambio iónico (*Sigma*) en una proporción de 1/10 p/v en agitación lenta a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se retira la resina por filtración.

GB1: 100mM Tris-HCl pH 7,5 y 150mM NaCl.

GB2: 2% agente de bloqueo en GB1.

GB3: 100mM Tris-HCl pH 9,5, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂.

LB agar: 1,5 % agar / litro LB, autoclavar.

Líquido de Bouin: 78,8% solución de ácido pícrico acuoso saturado, 26% formaldehído 40% y 5,25% ácido acético glacial.

Medio de congelación: 45 ml de suero fetal bovino, previamente inactivado durante una hora a 56°C, 5 ml de dimetil-sulfóxido (DMSO) (*Sigma*).

Medio HY con antibiótico: 2.500 U/L penicilina (*Sigma*), 2,5 mg/l streptomina (*Sigma*), en medio HY.

Medio HY suplementado: 0,1mM hipoxantina (*Sigma*), 0,016mM timidina (*Sigma*), 2.500 U/L penicilina, 2,5 mg/l streptomina, 10% suero fetal bovino (*Sigma*) en medio HY.

Medio HY: 13,3% Medio HY (*Sigma*), 3,5% NaHCO₃, pH 7,3.

Medio LB (Lennox L Broth Base): 2% LB (*Sigma*), autoclavar.

Medio selectivo HAT (hipoxantina/aminopterin/timidina): 0,1mM hipoxantina (*Seromed*), 0,016mM timidina (*Seromed*), 0,4µM aminopterin (*Seromed*), en medio HY.

NEW Wash: 20mM Tris pH 7,4, 1mM EDTA, 0,1M NaCl, 50% EtOH.

NZY: 85,5mM NaCl, 8mM MgSO₄, 0,5% extracto de levadura (*Difco*), 1% caseína hidrolizada (*Sigma*), pH 7.5 con NaOH.

NZY-agar: composición igual a NZY, pero con 1,5% agar.

NZY-agarosa de cobertera: composición igual a NZY, pero con 0,7% agarosa.

PBS/PBST (tampón fosfato salino/ tampón fosfato salino-tween): 8,1 mM NaHPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4/ Tween-20 0,1% (*Panreac*).

Psi-a: 0,5% Bacto extracto de levadura (*Difco*), 2 % bacto triptona (*Panreac*), 0,5 % MgSO₄, 1,4% bactoagar (*Difco*), pH 7,6 con KOH.

Psi-b: Composición igual a Psi-a, pero sin agar.

Solución 1 (stock de monómeros): 29,2% acrilamida (*Serva*), 0,8% de bis-acrilamida (*Amresco*).

Solución 4: 10 % SDS (dodecil sulfato sódico).

Solución APS: 10% APS.

Solución BCIP: 50 mg/ml 5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato (BCIP) (*Roche*) en dimetilformamida.

Solución de β -mercaptoetanol: 1,8 μ l de β -mercaptoetanol (*Merk*) y 98,2 μ l de agua (1.8%).

Solución de anticuerpo anti-Digoxigenina: 1:10000 ó 75 mU/ml de anti-digoxigenina AP Fab fragments (*Roche*) en solución de bloqueo GB2.

Solución de ARNasa: 10 mg/ml de ARNasa (*Roche*).

Solución de bloqueo: Leche desnatada en polvo 5% en PBS o BSA (*Roche*) 2% en PBST.

Solución de bromuro de etidio: 10 mg/ml bromuro de etidio (*Roche*).

Solución de carga (secuenciación): 25mM EDTA pH 8.0 con azul de dextrano (*Sigma*) 50 mg/ml; en proporción 5:1.

Solución de carga 10X (electroforesis agarosa): 40% sacarosa (*Merck*) en agua, 0,25% azul de bromofenol (*Panreac*), 0,25 % xileno cianol (*Sigma*).

Solución de coloración: 4,5 μ l de NBT, 3,5 μ l de BCIP/ml GB3.

Solución de detención: 0,5N Fluoruro Sódico (*Panreac*).

Solución de Ficoll-Urografin: 8% ficoll 400 (*Pharmacia Biotech*) en agua destilada al que se añade amidotriazoato sódico y meglumina al 76% (*Schering*) hasta alcanzar una densidad de 1,080 g/ cm³.

Solución de glurataldehido: 0,5% de glutaraldehido en PBS.

Solución de hibridación: 50% formamida desionizada, 5xSSC, 0,1% p/v N-lauroilsarcosina, 0,02 % p/v SDS y 2% p/v agente de bloqueo.

Solución de lisozima: 50 mg/ml lisozima (*Roche*).

Solución de PEG (polietilén glicol): 1,6M NaCl, 13% PEG 8000 (*Merk*).

Solución de poli-L-lisina: 1mg de poli-L-lisina (*Sigma*) en 100 ml de PBS.

Solución de tinción: 0,125% Coomassie Blue R-250 (*Panreac*), 50% metanol, 10% ácido acético.

Solución decolorante: 50% metanol, 10% ácido acético en agua destilada.

Solución desnaturalizante: 0,5N NaOH y NaCl 1,5M.

Solución eosina: 0,25% eosina (*Panreac*), 0,02% NaN₃ en PBS.

Solución gel concentrador 4%: 7ml H₂O, 1,5 ml solución 1, 2,87 ml tampón de transferencia 3, 120 μ l solución 4, 100 μ l solución APS, 10 μ l TEMED.

Solución gel separador 10%: 8 ml H₂O, 6,67 ml solución 1, 5 ml tampón de transferencia 2, 200 µl solución 4, 100 µl solución APS, 10 µl TEMED.

Solución gel separador 15%: 3,1 ml H₂O, 6,4 ml solución 1, 3,2 ml tampón de electroforesis 2, 130 µl solución 4, 80 µl solución APS, 8 µl TEMED (N, N, N', N-tetrametil-etiléndiamina) (*Sigma*).

Solución gel separador 5%: 7,3 ml H₂O, 2,2 ml solución 1, 3,2 ml tampón de transferencia 2, 130 µl solución 4, 80µl solución APS, 8µl TEMED.

Solución I: 25mM Tris-HCl pH 8, 50mM Glucosa, 10mM EDTA.

Solución II: 0,2M NaOH, 1% SDS.

Solución III: 3M KOH, 5 M ácido acético.

Solución NBT: 75 mg/ml tetrazolio de nitroazul (NBT) (*Roche*) en dimetilformamida al 70%.

Solución negro-amido: 0,1% negro-amido 10-B, 45% metanol, 10% ácido acético.

Solución neutralizante: 1M Tris-HCl pH 7,5 y 1,5M NaCl.

Solución reveladora de ELISA: 0,5M ácido cítrico pH 4 (*Panreac*), 1/100 (v/v) 2% ABTS (ácido 2,2' azino-bis (3-etilbezo-tiazolín-6-sulfónico)) (*Roche*), 0,03% H₂O₂.

Solución salina: 0,45% NaCl en agua destilada.

Solución Tris: Tris 0,05M, pH 7,6.

SSC 5X (sal de citrato sódico): 0.75M NaCl, 0.075M citrato sódico, pH 7.

STET (Sacarosa-Tritón-EDTA-Tris): 8% sacarosa, 0,1% tritón X 100, 50mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH 8.

TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1×: 0,04M Tris-Acetato, 0,001M EDTA, pH 8,5.

Tampón 2 de electroforesis: 1,5M Tris-HCl, pH 8,8.

Tampón 3 de electroforesis: 0,5M Tris-HCl, pH 6,8.

Tampón de acoplamiento: 0,1M NaHCO₃ pH 8,3, 0,5M NaCl.

Tampón de electroforesis 10×(ARN): 0,2M MOPS (ácido morfolino-propanosulfónico) (*Sigma*), 20mM NaOAc (*Merck*), 20mM EDTA pH 8, pH 7 con NaOH 2N.

Tampón de elución: composición igual a tampón de lisis B, pH 5,9 ó 4,5 con HCl.

Tampón de lavado C: composición igual a tampón de lisis B, pH 6,3 con HCl.

Tampón de lisis B: 8M urea, 0,1M NaH₂PO₄, 0,01M Tris, pH 8 con NaOH.

Tampón de lisis celular: 10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF(fluoruro fenilmetilsulfónico) (*Merck*), 0,05% NP-40 (*Sigma*), pH 7,4.

Tampón de lisis: 100mM ClNa, 10mM Tris-HCl pH 8; 25mM EDTA (ácido etilén-diaminotetracético) pH 8, 0,5% SDS, 0,1 mg/ml de proteinasa K.

Tampón de transferencia: 25mM Tris, 192mM Glicina, 20% metanol, pH 9,2.

Tampón de tratamiento de muestras: 0,125M Tris-HCl, 4% SDS, 20% glicerol, (10% 2-mercaptoetanol) (*Merck*), 0,1% Brilliant blue (*Sigma*), pH 6.8.

Tampón puente electroforesis: 0,025M Tris-HCl, 0,192M Glicina, 0,1% SDS.

Tampón SM: 100mM NaCl, 10mM MgSO₄·7 H₂O, 0,01% gelatina, 50mM Tris-HCl pH 7,5.

TBE 10X (Tris-Borato-EDTA): 0,9M Tris-Borato, 0.02M EDTA.

TBE Modifier: Manitol 1M (*Sigma*).

TE (Tris-EDTA): 10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, pH 8,0.

TFb 1: 30mM Acetato de potasio, 100mM KCl, 10mM CaCl₂, 50mM MnCl₂, 15 % glicerol, pH 5,8 con ácido acético 0.2M.

TFb 2: 10mM MOPS, 75mM CaCl₂, 10mM KCl, 15% Glicerol, pH 6,5 con KOH.

ANEXO 2: APARATOS Y MATERIAL

Agitador orbital *Heidolph UNIMAX 1010*
Baño de 37°C (*Precistern-pSelecta*)
Bomba de vacío *Pharmacia LKB-VacuGene (Pharmacia)*
Bomba peristáltica P-1 (*Pharmacia*)
Botella o placas de cultivo (*Greiner*)
Caja de Petri de 92 mm/150 mm de diámetro (*Greiner*)
Centrífuga Heraeus-Sepatech Megafuge 1,0 (*Heraeus Instruments*)
Colector de fracciones (*Pharmacia LKB-RediFrac*)
Cubetas de electroforesis Gel electrophoresis apparatus GNA-100 (*Pharmacia*)
Equipo de transferencia semiseco (*Millipore*)
Espectrofotómetro *SmartSpec 3000 (Bio-Rad)*
Formador de gradientes SG SERIES (*Hoffer Scientific Instrument*)
Fotomicroscopio *Olympus BH 2*
Fuente de alimentación 2103 POWER SUPPLY (*LKB BIOCHROM*)
Fuente de alimentación *LKB-MultiDrive XL (Pharmacia)*
Horno de hibridación *Stuart Scientific*
Incubador *INFORSHT*
Lector de ELISA Microplate Reader Model 550 (*Biorad*)
Megacentrífuga *Beckman J2-21*
Microcentrífuga *Sorvall MC 12V (DuPont)*
Microtomo *MICRON HM325*
Placas microtest p96 (*Greiner*)
Procesador automático *SHANDOM Hypercenta XP y SHANDOM Histocentre 2*
Secuenciador automático *ABI 373 XL Strech (Perkin Elmer)*
Sistema de transferencia *Pharmacia LKB-VacuGene XL (Pharmacia)*
Soportes de electroforesis *SE 250 y SE 600 (Hoffer Scientific Instrument)*
Termociclador *GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer)*
Termociclador *GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer)* (secuenciación)
Transiluminador *LKB 2011 MacroVue (LKB BIOCHROM)*
Tubos de 1,5/2 ml *Eppendorff*
Tubos de 10/50 ml *Falcon*

BIBLIOGRAFÍA

Akiyama S.K., Yamada S.S and Yamada K.M., 1989. Análisis of the role of glycosylation of the human fibronectin receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 264:18011-18018.

Allavena P., Paganin C., Martin-Padura I., Peri G., Gaboli M., Dejana E., Marchisio P.C. and Mantovani A., 1991. Molecules and structures involved in the adhesion of natural killer cells to vascular endothelium. *Journal of Experimental Medicine* 173:439.

Altruda F., Cervella P., Tarone G., Botta C., Balzac F., Stefanuto G. and Silengo L., 1990. A human integrin β_1 subunit with a unique cytoplasmic domain generated by alternative mRNA processing. *Gene* 95:261-266.

Anton E.S. Kreidberg J.A. and Rakic P., 1999. Distinct functions of α_3 and $\alpha(v)$ integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex. *Neuron* 22:277-289.

Aplin A.E., Howe A., Alahari S.K. and Juliano R.L., 1998. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: The role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules and selectins. *Pharmacological Reviews* 50:197-263.

Argaves W.S., Suzuki S., Thompson K., Pierschbacher M.D. and Ruoslahti E., 1987. Amino acid sequence of the human fibronectin receptor. *Journal of Cell Biology* 105:1183-1190.

Arihiro K., Kaneko M. Fujii S., Inai K. and Yokosaki Y, 2000. Significance of alpha 9 beta 1 and alpha v beta 6 integrin expression in breast carcinoma. *Breast Cancer* 7:19-26.

Bajt M.L. and Loftus J.C., 1994. Mutation of a ligand binding domain of beta 3

integrin. Integral role of oxygenated residues in alpha IIb beta 3 (GPIIb-IIIa) receptor function. *The Journal of Biological Chemistry* 269:20913-20919.

Bajt M.L., Goodman T. and McGuire S. L., 1995. Beta 2 (CD18) mutations abolish ligand recognition by I domain integrins LFA-1 (alpha)(L)beta(2), CD11a/CD18) and MAC-1 (alpha(M)beta(2), CD11b/CD18). *Journal of Biological Chemistry* 270:94-98.

Baker E., Tozer C.E., Pfaff M., Shattil S.J., Loftus J.C. and Ginsberg M.H., 1997. A genetic analysis of integrin function: Glanzmann thrombasthenia *in vitro*. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 94:1973-1978.

Baudoin C., Van der Flier A., Borradori L. and Sonnenberg A., 1996. Genomic organization of the mouse $\beta 1$ gene: conservation of the $\beta 1B$ and $\beta 1C$ integrin splice variants. *Cell Adhesion and Communication* 4:1-11.

Bentley K.L., Bradshaw M.S. and Ruddle F.H., 1993. Physical linkage of the murine Hox-b cluster and nerve growth factor receptor on yeast artificial chromosomes. *Genomics* 18:43-53.

Berton G. and Lowell C.A., 1999. Integrin signalling in neutrophils and macrophages. *Cell Signal* 11:621-635.

Bevilacqua M.P., Nelson R.M., 1993. Selectins. *The Journal of Clinical Investigation* 91:379.

Bodary S.C. and McLean J.W., 1990. The integrin $\beta 1$ subunit associates with the vitronectin receptor αv subunit to form a novel vitronectin receptor in a human embryonic kidney cell line. *The Journal of Biological Chemistry*, 265:5938-5941.

Bofanti R., Furie B.C., Furie B. and Wagner D.D., 1989. PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* 73:1109-1112.

Bonfoco E., Chen W., Paul R., Cheresch D.A. and Cooper N.R., 2000. β_1 integrin antagonism on adherent, differentiated human neuroblastoma cells triggers an apoptotic signaling pathway. *Neuroscience* 101:1145-1152.

Bosman F.T., 1993. Integrins: cell adhesives and modulators of cell function. *Histochemical Journal* 25:469-477.

Bossy B., Bossy-Wetzler E. and Reichardt L.F., 1991. Characterization of integrin alpha 8 subunit: a new integrin beta1-associated subunit, which is prominently expressed on axons and on cells in contact with basal laminae in chick embryos. *The EMBO Journal* 10:2375-2385.

Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

Brakebusch C., Hirsch E., Potocnick A. and Fässler R., 1997. Genetic analysis of β_1 integrin function: confirmed, new and revised roles for a crucial family of cell adhesion molecules. *Journal of Cell Science* 110:2895-2904.

Bray P.F., Rosa J.P., Johnston G.I., Shui D.T., Cook R.G., Lau C., McEver R.P. and Shuman M.A., 1987. Platelet glycoprotein IIb. Chromosomal localization and tissue expression. *The Journal of Clinical Investigation* 80:1812-1817.

Burridge K., Fath K., Kelly T., Nuckolls G. and Turner C.A., 1988. Focal adhesions: transmembrane junction between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annual Review of Cell Biology* 4:487-525.

Byzova T.V. and Plow E.F., 1998. Activation of $\alpha_v\beta_3$ on vascular cells controls recognition of prothombin. *The Journal of Cell Biology* 143:2081-2092.

Calvete J.J., 1999. Platelet integrin GPIIb/IIIa: Structure-Function correlations. An update and lessons from other integrins. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine* 222:29-38.

Calvete J.J., Henschen A. and Rodríguez-González J., 1991. Assignment of disulphide in human GPIIIa. *Biochemical Journal* 274:63-71.

Camper L., Hellman U., and Ludgren-Åkerlund E., 1988. Isolation, cloning, and sequence analysis of the integrin subunit α_{10} , β_1 -associated collagen binding integrin expressed on chondrocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 273:20383-20389.

Castaño H., 1999. Papel de los inhibidores de GPIIbIIIa. *Cardiología Intervencionista "Tópicos de la actualidad"* Symposium.

Castel S., Pagan R., García R., Casaroli-Marano R.P., Reina M., Mitjans F., Piulats J and Vilaró S., 2000. Alpha v integrin antagonists induce the disassembly of focal contacts in melanoma cells. *European Journal of Cell Biology* 79:502-512.

Cervella P., Silengo L., Pastore C. and Altruda F., 1993. Human β_1 -integrin gene expression is regulated by two promoter regions. *The Journal of Biological Chemistry* 268:5148-5155.

Charo I.F., Nannizzi L., Phillips D.R., Hsu M.A. and Scarborough R.M., 1991. Inhibition of fibrinogen binding to GPIIb-IIIa by a GPIIIa peptide. *Journal of Biological Chemistry* 266:1415-1421.

Chen N. and Sampson N.S., 1998. Mediation of sperm-egg fusion: evidence that mouse egg $\alpha_6\beta_1$ integrin is the receptor for sperm fertilin β . *Chemistry & Biology* 6:1-10.

Chen N., Chen C.-C. and Lau L.F., 2000. Adhesion of human skin fibroblasts to Cyr61 is mediated through integrin $\alpha_6\beta_1$ and cell surface heparan sulfate proteoglycans.

The Journal of Biological Chemistry 275:24953-24961.

Chen Y.Q, Trikha M., Gao X., Bazar R., Porter A.T., Timar J, Honn K.V., 1997. Ectopic expression of platelet integrin alphaII beta3 in tumor cells from various species and histological origin. *International Journal of Cancer* 72:642-648.

Chevalet C., Gouzy J. and SanCristobal-Gaudy M., 1997. Regional assignment of genetic markers using a somatic cell hybrid panel: a www interactive program available for the pig genome. *Computer Applications in Biosciences* 13:69-73.

Cheville N.F., 1999. Introduction to veterinary pathology. *Iowa State University Press* Second edition, 190-193.

Chitko-McKown C.G. and Blecha F., 1992. Pulmonary intravascular macrophages: a review of immune properties and functions. *Annales de Recherches Veterinaires* 23:201-214.

Collo G., Starr L. and Quaranta V., 1993. A new isoform of the laminin receptor integrin $\alpha 7 \beta 1$ is developmentally regulated in skeletal muscle. *The Journal of Biological Chemistry* 268:19019-19024.

Cooper H.M., Tamura R.N. and Quaranta V., 1991. The major laminin receptor of mouse embryonic stem cells is a novel isoform of the alpha 6 beta 1 integrin. *The Journal of Cell Biology* 115:843-850.

Corbi A.L., Larson R.S., Kisimoto T.K., Springer T.A. and Moeton C.C., 1988. Chromosomal location of the genes encoding the leukocyte adhesion receptors LFA-1, Mac-1 and p150,95. Identification of a gene cluster involved in cell adhesion. *The Journal of Experimental Medicine* 167:1597-1607.

Cotran R.S., Kumar V. and Collins T., 2000. Patología estructural y funcional. *McGraw-Hill Interamericana* Sexta edición, 143-147.

Creamer D., Allen M., Sousa A., Poston R. and Barker J., 1995. Altered

vascular endothelium integrin expression in psoriasis. *American Journal of Pathology* 147:1661-1667.

D'Souza S.E., Ginsberg M.H., Burke T.A. and Plow E.F., 1990. The ligand binding site of the platelet integrin receptor GPIIb-IIIa is proximal to the second calcium binding domain of its alpha subunit. *Journal of Biological Chemistry* 265:3440-3446.

D'Souza S.E., Ginsberg M.H., Burke T.A., Lam S.C.-T. and Plow E.F., 1988. Localization of an Arg-Gly-Asp recognition site within an integrin adhesion receptor. *Science* 242:91-93.

D'Souza S.E., Haas T.A., Piotrowicz R.S., Byers-Ward V., McGrath D.E., Soule H.R., Cierniewski C.S., Plow E.F., Smith J.W., 1994. Ligand and cation binding are dual functions of a discrete segment of the integrin beta 3 subunit: cation displacement is involved in ligand binding. *Cell* 79:659-667.

Dai Y., Vaught T.D., Boone J., Chen S.-H., Phelps C.J., Ball S., Monahan J.A., Jobst P.M., McCreath K.J., Lamborn A.E., Cowell-Lucero J.L., Wells K., Colman A., Polejaeva I.A. and Ayares D.L., 2002. Targeted disruption of the $\alpha 1,3$ -galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nature Biotechnology* 20:251-255.

Darribère T., Guida K., Larjana H., Johnson K.E., Yamada K.M., Thiery J.-P. and Boucaut J.-C., 1990. In vivo analyses of integrin β_1 subunit function in fibronectin matrix assembly. *The Journal of Cell Biology* 110:1813-1823.

Davids B.J., Wu X.-J. and Yoshino T.P., 1999. Cloning of a β integrin cDNA from embryonic cell line derived from the freshwater mollusc, *Biomphalaria glabrata*. *Gene* 228:213-223.

De Strooper B., Van der Schueren B., Jaspers M., Saison M., Spaepen M., Van Leuven F., Van Den Berghe H. and Cassiman J.-J., 1989. Distribution of the β_1 subgroup in human cells and tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 37:299-307.

Dedhar S. and Hannigan G.E., 1996. Integrin cytoplasmic interactions and bi-

directional transmembrane signaling. *Current Opinion of Cell Biology* 8:657-669.

Dedhar S., 1999. Integrins and signal transduction. *Current Opinion in Hematology* 6:37-43.

Dedhar S., Jewell K., Rojiani M. and Gray V., 1992. The receptor for the basement membrane glycoprotein entactin is the integrin $\alpha 3\beta 1$. *Journal of Biological Chemistry* 267:18908-18914.

Delwel G.O., De Melker A.A., Hogervorst F., Jaspars L.H., Fles D.L., Kuikman I., Lindblom A., Paulsson M., Timpl R. and Sonnenberg A., 1994. Distinct and overlapping ligand specificities of the $\alpha 3A\beta 1$ and $\alpha 6A\beta 1$ integrins: recognition of laminin isoforms. *Molecular Biology of Cell* 5:203-215.

DeSimone D.W. and Hynes R.O., 1988. *Xenopus laevis* integrins. Structural conservation and evolutionary divergence of integrin β subunits. *Journal of Biological Chemistry* 263:5333-5340.

Diamond M.S. and Springer T.A., 1994. The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Current Biology* 4:506-517.

Dickeson S.K., Bhattacharyya-Pakrasei M., Mathis N.I., Schlesinger P. H. and Santoro S.A., 1998. Ligand binding results in divalent cation displacement from $\alpha 2\beta 1$ integrin domain: evidence from terbium luminescence spectroscopy. *Biochemistry* 37:11280-11288.

Dickeson S.K., Walsh J.J. and Santoro S.A., 1997. Contributions of the I and EF hand Domains to the divalent cation-dependent collagen binding activity of the alpha 2 beta 1 integrin. *Journal of Biological Chemistry* 272, 7661-7668.

Du X. and Ginsberg M.H., 1997. Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and platelet function. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 78:96-100.

Eklom P., 1996. Receptors for laminins during epithelial morphogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* 8: 700-706.

Eliceiri B.P. and Cheresh D.A., 2000. Role of alpha v integrins during angiogenesis. *Cancer Journal from Scientific American* 6:S245-249.

Elices M.J., Osborn L., Takada Y., Crouse C., Luhowsky S., Hemler M. and Lobb R.R., 1990. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 60:577.

Emsley J., King S.L., Bergelson J.M. and Liddington, R., 1997. Crystal structure of the I domain from integrin $\alpha_2\beta_1$. *Journal of Biological Chemistry* 272:228512-28517.

Ennis E., Isberg R.R. and Shimizu Y., 1993. Very late antigen 4-dependent adhesion and costimulation of resting human cells by the bacterial β_1 integrin ligand invasins. *Journal of Experimental Medicine* 177:207.

Favre A., Guinta M., Gu Y., Corte G. and Grossi C.E., 1992. Localization of a novel integrin of the β_1 subfamily in human tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 40:1291-1298.

Fernández-Ruiz E., Pardo-Manuel de Villena F., Rodríguez de Córdoba S. and Sánchez-Madrid F., 1993. Regional localization of human vitronectin receptor alpha-subunit gene (VNRA) to chromosome 2q31-q32. *Cytogenetics and Cell Genetics* 62:26-28.

Ferrari S., Cannizzaro L.A., Batini R., Huebner K. and Baserga R., 1987. The gene encoding human vimentin is located on short arm of chromosome 10. *The American Journal of Human Genetics* 41:616-626.

Fröncke L., Chowdhary B.P., Schertan H. and Gustavsson I., 1996. A comparative map of the porcine and human genomes demonstrates ZOO-FISH and gene mapping-based chromosomal homologies. *Mammalian Genome* 6:221.

Fujita S., Watanabe M., Kubota T., Teramoto T. and Kitajima M., 1995.

Alteration of expression in integrin β_1 -subunit correlates with invasion and metastasis in colorectal cancer. *Cancer Letters* 91:145-149.

Furuzawa-Carballeda J. y Alcocer-Varela J., 2000. Actualidades de las citocinas y moléculas de adhesión en la artritis reumatoide. *Seminarios de la Fundación Española de Reumatología* 1:273-288.

Gerber D. J., Pereira P., Huang S.Y., Pelletier C. and Tonegawa S., 1996. Expression of α_v and β_3 integrin chains on murine lymphocytes. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 93:14698-14703.

Goldfinger L.E., Hopkinson S.B., deHart G.W., Collawn S., Couchman J.R. and Jones J.C., 1999. The α_3 laminin subunit, $\alpha_6\beta_4$ and $\alpha_3\beta_1$ integrin coordinately regulate wound healing in cultured epithelial cells and in the skin. *Journal of Cell Science* 112:2615-2629.

Goureau A., Yerle M., Scmitz A., Riquet J., Milan D., Pinton P. and Gellin J., 1996. Human and porcine correspondence of chromosome segments using bi-directional chromosome painting. *Genomics* 36:252-262.

Green L., Mould A.P. and Humphries M.J., 1998. The integrin β subunit. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 30:179-184.

Grzesiak J.J. and Pierschbacher M.D., 1995. Shifts in the concentrations of magnesium and calcium in early porcine and rat wound fluids activate the cell migratory response *Journal of Biological Chemistry* 95:227-233.

Guo N., Templeton N.S., Al-Barazi H., Cashel J.A., Sipes J.M., Krutzsch H.C. and Roberts D.D., 2000. Thrombospondin-1 promotes $\alpha_3\beta_1$ integrin-mediated adhesion and neurite-like outgrowth and inhibits proliferation of small cell lung carcinoma cells. *Cancer Research* 60:457-466.

Haas T.A. and Plow E.F., 1994. Integrin-ligand interactions: a year in review. *Current Opinion in Cell Biology* 6:656-662.

Harris E.S., McIntyre T.M., Prescott S.M. and Zimmerman G.A., 2000. The leukocyte integrins. *The Journal of Biological Chemistry* 275:23409-23412.

Hauzenberger D., Klominek J., and Sundqvist K.-G., 1994. Functional specialization of fibronectin-binding β_1 -integrins in T lymphocyte migration. *The Journal of Immunology* 153:960-971.

Heijnen H.F.G., Debili N., Vainchencker W., Breton-Gorius J, Geuze H.J. and Sixma J.J, 1998. Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet α -granules. *Blood* 91:2313-2325.

Hemler M.E., 1988. Adhesive protein receptors on hematopoietic cells. *Immunology Today* 9:109-113.

Hemler, M.E., 1990. VLA proteins in the integrin family: structures, functions and their role on leukocytes. *Annual Review of Immunology* 8:365-400.

Higgins D.G. and Sharp P.M., 1989. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Computer Applications in Biosciences* 5:151-153.

Hodivala-Dilke K. M., McHugh K.P., Tsakiris D.A., Rayburn H., Crowley D., Ullman-Cullere M., Ross F.P., Coller B.S., Teitelbaum S. and Hynes R.O., 1998. β_3 -Integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. *The Journal of Clinical Investigation* 103:229-238.

Hogervorst F., Kuikman I, von dem Borne, A.E.G.K., and Sonnenberg, A., 1990. Cloning and sequence analysis of beta-4 cDNA: an integrin subunit that contains a unique 118 kd cytoplasmic domain. *The EMBO Journal* 9:765-770.

Holzknacht Z.E. and Platt J.L., 1995. Identification of porcine endothelial cell membrane antigens recognized by human xenoreactive natural antibodies. *The Journal of Immunology* 154:4565-4575.

Horwitz A.F., 1997. Integrins and Health. *Scientific American* May, 68-75.

Hu D.D., White C.A., Panzer-Knodle S., Page J.D., Nicholson N. and Smith J.W., 1999. A new model of dual interacting ligand binding sites on integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *The Journal of Biological Chemistry* 274:4633-4639.

Huang Y.W., Baluna R. and Vitetta E.S., 1997. Adhesion molecules as targets for cancer therapy. *Histology and Histopathology* 12:467-477.

Hughes P.E., Díaz-González F., Leong L., Wu C., McDonald J.A., Shattil S.J. and Ginsberg M.H., 1996. Breaking the integrin hinge: A defined structural constraint regulates integrin signaling. *Journal of Biological Chemistry* 271:6571-6574.

Humphries M.J., 2000. Integrin cell adhesion receptors and the concept of agonism. *Trends in Pharmacological Sciences* 21:29-32.

Hynes R.O., 1999. Cell adhesion: old and new questions. *Trends in Cell Biology* 9:M33-37.

Hynes R.O. and Zhao Q., 2000. The evolution of cell adhesion. *The Journal of Cell Biology* 150:F89-F95.

Hynes, R.O., 1987. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48:549-550.

Hynes, R.O., 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25.

Jiménez-Clavero M.A., Escribano Romero E. Y Ley V., 2000. La enfermedad vesicular del cerdo: bases moleculares e inmunológicas y diagnóstico de la enfermedad. *Investigaciones Agrarias: Producción y Sanidad Animal* 15:109-123.

Jonjic N., Jilek P., Bernasconi S., Peri G., Martin-Padura I., Cenzuales S., Dejana E. and Mantovani A., 1992. Molecules involved in the adhesion and cytotoxicity of activated monocytes on endothelial cells. *Journal of Immunology* 148:2080.

Joziase D.H. and Oriol R., 1999. Xenotransplantation: the importance of the Gal α 1,3Gal epitope in hyperacute vascular rejection. *Biochimica et Biophysica Acta* 1455:403-418.

Käfer G., Willer A., Ludwig W.-D., Krämer A., Hehlmann R. and Hastka J., 1999. Intracellular expression of CD61 precedes surface expression. *Annals of Hematology* 78:472-474.

Kieffer N. and Phillips, D.R., 1990. Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions. *Annual Review of Cell Biology* 6:329-357.

Kocken J.M., de Heer E., Borel Rinkes I.H.M., Sinaasappel M., Terpstra O.T. and Brujin J.A., 1997. Blocking of $\alpha_1\beta_1$ Integrin strongly improves survival of hepatocytes in allogeneic transplantation. *Laboratory Investigation* 77:19-28.

Koukoulis G.K., Warren W.H., Virtanen I and Gould V.E., 1997. Immunolocalization of integrins in the normal lung and in pulmonary carcinomas. *Human Pathology* 28:1018-1025.

Kozek-Langenecker S.A., Masaki T., Mohammad H., Green W., Mohammad S.F. and Cheung A.K., 1999. Fibrinogen fragments and platelet dysfunction in uremia. *Kidney International* 56:299-305.

Kramer R.H., Cheng Y.F. and Clyman R., 1990. Human microvascular endothelial cells use beta 1 and beta 3 integrin receptor complexes to attach to laminin. *The Journal of Cell Biology* 111:1233-1243.

Kramer R.H., Vu M., Cheng Y.F. and Ramos D.M., 1991. Integrin expression in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Review* 10:49-59.

Kramer R.H., Vu M.P., Cheng Y.F., Ramos D.M., Timpl R. and Waleh N., 1991. Laminin-binding integrin alpha 7 beta 1: functional characterization and expression in normal and malignant melanocytes. *Cell Regulation* 2:805-17.

Kreidberg J.A. and Symons J.M., 2000. Integrins in kidney development, function, and disease. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 279:F233-F242.

Kreidberg J.A., 2000. Function of $\alpha 3\beta 1$ integrin. *Current Opinion in Cell Biology* 12:548-553.

Kreidberg J.A., Donovan M.J., Goldstein S.L., Rennke H., Shepherd K., Jones R.C. and Jaenisch R., 1996. $\alpha 3\beta 1$ integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development* 122:3537-3547.

Kumar C.S., James I.E., Wong A., Mwangi V., Field J.A., Nuthulaganti P., Connor J., Eichman C., Ali F., Hwang S.M., Rieman D.J., Drake F.H. and Gowen M., 1997. Cloning and characterization of a novel integrin β_3 subunit. *The Journal of Biological Chemistry* 27:16390-16397.

Kunicki T.J., Orzechowski R., Annis D. and Honda Y., 1993. Variability of integrin $\alpha 2\beta 1$ activity on human platelets. *Blood* 9:2693-2703.

Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

LaFlamme S.E., Homan S.M., Bodeau A.L. and Mastrangelo A.M., 1997. Integrin cytoplasmic domains as connectors to the cells signal transduction apparatus. *Matrix Biology* 16:153-163.

Lang L.H., 2000. Missing proteins in the uterus tied to infertility in women with endometriosis. *News Services* 352:29-30.

Languino L.R. and Ruoslahti E., 1992. An alternative form of the integrin β_1 subunit with a variant cytoplasmic domain. *The Journal of Biological Chemistry* 267:7116-7120.

Lee J.-K., Schook L.B. and Rutherford M.S., 1996. Molecular cloning and characterization of porcine CD18 leukocyte adhesion molecule. *Xenotransplantation* 3:222-230.

Lee J.-O., Bankston L.A., Arnaout M.A. and Liddington R.C., 1995. Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure* 3:1333-1340.

Lehnert K., Ni J., Leung E., Gough S., Morris C.M., Liu D., Wang S.X., Langley R. and Krissansen G.W. 1999. The integrin alpha 10 subunit: expression pattern, partial gene structure, and chromosomal localization. *Cytogenetics and Cell Genetics* 87: 238-44.

Lerea K.M., Cordero K.P., Sakariassen K.S., Kirk I and Friend V.A., 1999. Phosphorylation sites in the integrin β_3 cytoplasmic domain in intact platelets. *The Journal of Biological Chemistry* 274:1914-1919.

Leyton L., Schneider P., Labra C.V., Ruëgg C., Hetz C.A., Quest A.F.G. and Bron C., 2001. Thy-1 binds to integrin β_3 on astrocytes and triggers formation of focal contact sites. *Current Biology* 11:1028-1038.

Li B.-S., Zhang L., Gu J., Amin N.D., and Pant H.C., 2000. Integrin $\alpha_1\beta_1$ -mediated activation of cyclin-dependent kinase 5 activity is involved in neurite outgrowth and human neurofilament protein H Lys-ser-Pro tail domain phosphorylation. *The Journal of Neuroscience* 20:6055-6062.

Linfor J. and Berger T., 2000. Potential role of alpha v and beta1 integrins as oocyte adhesion molecules during fertilization in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility* 120:65-72.

Lipscomb D.L., Bourne C. and Boudreaux M.K., 1999. DNA sequence of the canine platelet β_3 gene from cDNA: Comparison of canine and mouse β_3 to segments that encode alloantigenic sites and functional domains of β_3 in human beings. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 134:313-321.

Llanes D., Morera L., Garrido J.J. and Barbancho M, 2001. CD61 (Glycoprotein IIIa (GPIIIa); Integrin β_3 subunit). *Encyclopedia of Molecular Medicine*, Thomas Creighton (Ed.), John Wiley & Sons 653-654.

Loeser R.F., 2000. Chondrocyte integrin expression and function. *Biorheology* 37:109-116.

Loftus J.C., O'Toole T.E., Plow E.F., Glass A., Frelinger A.L. III and Ginsberg M.H., 1990. A β_3 integrin mutation abolishes ligand binding and alters divalent cation-dependent conformation. *Science* 249:915-918.

MacLaren L.A. and Wideman A.G., 1995. Fibronectin receptors in preimplantation development: cloning, expression, and localization of alpha 5 beta 1 integrin subunits in bovine trophoblast. *Biology of Reproduction* 53:153-165.

Malek-Hedayat S. and Rome L.H., 1995. Cloning and sequence of the cDNA encoding the rat oligodendrocyte integrin β_1 subunit. *Gene* 158:287-290.

Marcantonio E.E. and Hynes R., 1988. Antibodies to the conserved cytoplasmic domain of the integrin beta 1 subunit react with proteins in vertebrates, invertebrates and fungi. *Journal of Cell Biology* 106:1765-1772.

Mateo A., Pintado C.O., Pérez de la Lastra J.M. Dusinsky R., Simon M., Naessens J. and Llanes D, 1996. Ruminant cluster CD41/CD61. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 52:251-253.

Michishita M, Videm V. and Arnaout M.A., 1993. A novel divalent cation-binding site in the A domain of the β_2 integrin CR3 (CD11b/CD18) is essential for ligand binding. *Cell* 72:857-867.

Milner R., Edwards G., Streuli C. and Ffrench-Constant, 1996. A role in migration for the $\alpha\beta_1$ integrin expressed on oligodendrocyte precursors. *The Journal of Neuroscience*, 16:7240-7252.

Mimura H., Cao X., Ross F.P., Chiba M. and Teitelbaum S.L., 1994. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 transcriptionally activates the beta 3-integrin subunit gene in avian osteoclast precursors. *Endocrinology* 134:1061-1066.

Moreno A., Lucena C., López A., Garrido J.J., Pérez de la Lastra J.M. and Llanes D., 2002. Immunohistochemical analysis of β_3 integrin (CD61): expression in pig tissues and human tumors. *Histology and Histopathology* 17:347-352.

Mould A.P., Akiyama S.K. and Humphries M.J., 1996. The inhibitory anti- β_1 integrin monoclonal antibody 13 recognizes an epitope that is attenuated by ligand occupancy. *The Journal of Biological Chemistry* 271:20365-20374.

Neff S. and Baxt B., 2001. The ability of integrin $\alpha_v\beta_3$ to function as a receptor for foot-and-mouth disease virus is not dependent on the presence of complete subunit cytoplasmic domains. *Journal of Virology* 75:527-532.

Newman P.J. and Valentin N., 1995. Human platelets alloantigens: recent findings, new perspectives. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 74:234-239.

Newman P.J., Derbes R.S. and Aster R.H., 1989. The human platelet alloantigens, PlA1 and PlA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *The Journal of Clinical Investigation* 83:1778-1781.

Nunes M., Peelman L., Vaiman M., Bourgeaux N. and Chardon P., 1994. Characterization of six new loci within the swine major histocompatibility complex class III region. *Biochemical Journal* 274:63.

Nurden A.T., 1995. Polymorphisms of human platelet membrane glycoproteins: structure and clinical significance. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 74:345-351.

Ohno S., Noshiro M., Makira S., Kawamoto T., Shen M., Yan W., Kawashima-Ohya Y., Fujimoto T., Tanne K. and Kato Y., 1999. RGD-CAP (β ig-h3) enhances the spreading of chondrocytes and fibroblasts via integrin $\alpha 1\beta 1$. *Biochimica et Biophysica Acta* 145:196-205.

Palacín Forgue A., 1984. Técnicas Inmunohistoquímicas-Aspectos Teórico-prácticos, *Atom S.A.*

Palmer E.L., Ruegg C., Ferrando R., Pytela R. and Sheppard D., 1993. Sequence and tissue distribution of the integrin alpha 9 subunit, a novel partner of beta 1 that is widely distributed in epithelia and muscle. *The Journal of Cell Biology* 123:1289-1297.

Parkes R.J. and Hart S.L., 2000. Adhesion molecules and gene transfer. *Advanced Drug Delivery Reviews* 44:135-152.

Pastoret P.P., Griebel P., Bazin H. and Govaerts A., 1998. Immunology of the pig. *Handbook of vertebrate immunology, Academic Press* 373-385.

Pérez de la Lastra J.M., Moreno A., Pérez J. and Llanes D., 1997. Characterization of the porcine homologue to human platelet glycoprotein IIb-IIIa (CD41/CD61) by a monoclonal antibody. *Tissue Antigens* 49:588-594.

Phillips D.R., Charo I.F., Parise L.V. and Fitzgerald L.A., 1988. The platelet membrane Glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 71:831-843.

Phillips D.R., Charo, I. F., and Scarborough, R.M., 1991. GPIIb-IIIa: the responsive integrin. *Cell* 65:359-362.

Pinkstaff J.K., Detterich J., Lynch G., and Gall C., 1999. Integrin subunit gene expression is regionally differentiated in adult brain. *The Journal of Neuroscience* 19:1541-1556.

Pinton P., Schibler L., Cribiu E., Gellin J and Yerle M., 2000. Localization of 113 anchor loci in pigs: improvement of the comparative map for humans, pigs and goats. *Mammalian Genome* 11:306-315.

Platt J.L. and Bach F.H., 1991. The barrier to xenotransplantation. *Transplantation* 52:937-947.

Plow E.F. and Byzova T., 1999. The biology of glycoprotein IIb-IIIa. *Coronary Artery Disease* 10:547-551.

Plow E.F., Haas T.A., Zhang L., Loftus J. and Smith J.W., 2000. Ligand binding to integrins. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 21785-21788.

Pytela R., Pierchbacher M.D. and Ruoslahti E., 1985. Identification and isolation of a 140 kD cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor *Cell* 40:191-198.

Reszka A.A., Hayashi Y. and Horwitz A.F., 1992. Identification of amino acid sequences in the integrin beta 1 cytoplasmic implicated in cytoskeletal association. *The Journal of Cell Biology* 117:1321-1330.

Richard C., Thibaudeau K., Charreau B., Loirat M.J., Naulet J., Blanchard D., Soulillou J.P. and Bouhours J.F., 1998. Characterization of a murine monoclonal antibody specific for swine beta 1 integrin. *Xenotransplantation* 5:75-83.

Rodan S.B. and Rodan G.A., 1997. Integrin function in osteoclasts. *Journal of Endocrinology* 154:S47-S56.

Ross F.P., Chappel J., Álvarez J.I., Sander D., Butler W. T., Farach-Carson M.C., Mintz K.A., Robey P.G., Teitelbaum S.L. and Cheresch D.A., 1993. Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha V beta 3 potentiate bone resorption. *Journal of Biological Chemistry* 268:9901-9907.

Ruoslahti E. and Pierschbacher M.D., 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238:491-497.

Ruoslahti E., 1995. Integrin signaling and matrix assembly. *Tumor Biology* 17:117-124.

Ruoslahti E., 1996. RGD and others recognition sequences for integrins. *Annual Review of Cell Biology* 12:697-715.

Rutishauser V. & Goridid C., 1986. N-CAM: the molecule and its genetics. *Trends in Genetics* 2:72-6.

Sánchez-Aparicio P., Ferreira O.C., Jr. and García-Pardo A., 1993. $\alpha 4\beta 1$ recognition of the Hep II domain of fibronectin is constitutive on some hemopoietic cells but requires activation on others. *Journal of Immunology* 150:3506.

Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R., 1992. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.1977. *Biotechnology* 24:104-108.

Santoro S.A. and Lawing W.J., Jr., 1987. Competition for related but nonidentical binding sites on the glycoprotein IIb-IIIa complex by peptides derived from platelet adhesive proteins. *Cell* 48:867-873.

Santoso S., Kalb R., Kroll H., Kiefel V., Mueller-Eckhart C and Newman P.J., 1994. A point mutation leads to an unpaired cysteine residue and a molecular weight polymorfism of a functional platelet beta 3 integrin subunit. The Sra alloantigen system of GPIIIa. *The Journal of Biological Chemistry* 269:8439-8444.

Schaffner-Reckinger E., Gouon V., Melchior C., Plancon S. and Kieffer N., 1998. Distint involvement of β_3 integrin cytoplasmic domain tyrosine residues 747 and 756 in integrin-mediated cytoskeletal assembly and phosphorylation signaling. *Journal of Biological Chemistry* 273:12623-12632.

Schleimer R.P., Sterbinsky S.A., Kaiser J., Bickel C.A., Klunk D.A., Tomioka K., Newman W., Luscinskas F.W., Gimbrone M.A., Jr., McIntyre B.W. and Bochner B.S., 1992. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium: Association with expression of VCAM-1. *Journal of Immunology* 148:1086.

Schnapp L.M., Hatch N., Ramos D.M. and Klimanskaya I.R., 1995. The human integrin $\alpha 8\beta 1$ functions as a receptor for tenascin, fibronectin, and vitronectin. *The Journal of Biological Chemistry* 29:23196-23202.

Schoenwaelder S.M. and Burridge K., 1999. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Current Opinion of Cell Biology* 11:274-286.

Schwartz M.A., Schaller M.D. and Ginsberg M.H., 1995. Integrins: Emerging paradigms of signal transduction. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 11:549-599.

Senger D.R., Claffey K.P., Benes J.E., Perruzzi C.A., Sergiou A.P. and Detmar M., 1997. Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: Regulation through $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins. *Cell Biology* 94:13612-13617.

Shang X.-Z. and Issekutz A.C., 1997. $\beta 2$ (CD18) and $\beta 1$ (CD29) integrin mechanisms in migration of human polymorphonuclear leucocytes and monocytes through lung fibroblast barriers: shared and distinct mechanisms. *Immunology* 92:527-535.

Shattil J.S, Kashiwagi H. and Pampori N., 1998. Integrin signaling: The platelet paradigm. *Blood* 91:2645-2657.

Shattil J.S. and Ginsberg M.H., 1997. Integrin signaling in vascular biology. *Journal of Clinical Investigation* 10:1-5.

Sheetz M.P. et al., 1998. Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes. *Trends in Cell Biology* 8:51-54.

Shulman M., Wilde C. D. and Kohler G., (1978). A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature* 276:269-270.

Singh B., Fu C. and Bhattacharya J., 2000. Vascular expression of $\alpha v\beta 3$ integrin in lung and other organs. *American Journal of Physiology* 278:L217-L226.

Singh B., Rawlings N. and Kaur A., 2001. Expression of integrin $\alpha v\beta 3$ in pig, dog and cattle. *Histology and Histopathology* 16:1037-1046.

Smith J.W., Piotrowicz R.S. and Mathis D., 1994. A mechanism for divalent

cation regulation of beta3-integrins. *Journal of Biological Chemistry* 269:960-967.

Smith L.L., Cheung H.-K., Ling L.E., Chen J., Sheppard D., Pytela R. and Giachelli, 1996. Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by $\alpha_9\beta_1$ integrin. *The Journal of Biological Chemistry* 271:28485-28491.

Smith W.J., Taylor D.J. and Penny R.H.C., 1990. Atlas en color de patología porcina. *Interamericana McGraw-Hill* 1^o Edición en Español/2^a Edición en Inglés, página 91.

Sosnoski D.M., Emanuel B.S., Hawkins A.L., van Tuinen P., Ledbetter D.H., Nussbaum R.L., Kaos F.T., Schwartz E., Phillips D., Bennett J.S. et al., 1988. Chromosomal localization of the genes for the vitronectin receptors alpha subunits and for platelet glycoproteins IIb and IIIa. *Journal of Clinical Investigation* 81:1993-1998.

Springer T.A., 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346:425-434.

Suehiro K., Smith J.W. and Plow E.F., 1996. The ligand recognition specificity of β_3 integrins. *The Journal of Biological Chemistry* 271:10365-10371.

Takada Y., Elices M.J., Crouse C, Hemler M.E., 1989. The primary structure of α_4 subunit of VLA-4: homology to other integrins and possible cell-cell adhesion function. *EMBO Journal* 8:1361-1368.

Takada Y., Ylänne J., Mandelman D., Puzon W. and Ginsberg M.H., 1992. A point mutation of integrin β_1 subunit blocks binding of $\alpha_5\beta_1$ to fibronectin and invasin but not recruitment to adhesion plaques. *The Journal of Cell Biology* 119:913-921.

Takeichi M., 1988. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 102:639-55.

Tamkum J.W., DeSimone D.W., Fonda D., Patel R.S., Buck C., Horwitz A.F. and Hynes R.O., 1986. Structure of integrin, a glycoprotein involved in the

transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 46:271-282.

Thibaudeau K., Borche L., Soulillou J.P. and Blanchard D., 1996. Characterization of porcine platelet glycoproteins recognized by human natural “ant-gal” antibodies. *Blood* 87:4636-4642.

Thornton M.A. and Poncz M., 1999. Characterization of murine platelet α IIb gene and encoded cDNA. *Blood* 94:3947-3951.

Topol E.J., Byzova T. and Plow E.F., 1999. Platelet GPIIb-IIIa blockers. *The Lancet* 353:227-231.

Tosser-Klopp G., Mulsant P. and Yerle M, 1998. Regional localizations of VIM, HSD3b, ACTA1 and PGM1 in pigs. *Animal Genetics* 29:23-26.

Tozer E.C., Liddington R.C., Sutcliffe M.J., Smeeton A.H. and Loftus J.C., 1996. Ligand binding to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ is dependent on a MIDAS-like domain in the β_3 subunit. *The Journal of Biological Chemistry* 271:21978-21984.

Tschoepe D., Roesen P., Kaufmann L., Schauseil S., Kehrel B., Ostermann H. and Gries F.A., 1990. Evidence for abnormal platelet glycoprotein expression in diabetes mellitus. *European Journal of Clinical Investigation* 20:166-170.

Tuckell D.S., Brass A. and Humphries M.J., 1992. Homology modelling of integrin EF-hand. Evidence for widespread use of a conserved cation-binding site. *Biochemical Journal* 285:325-331.

van Kooyk Y., van de Wiel-van Kemenade E., Weder P., Huijbens R.J.F. and Figdor C.G., 1993. Lymphocyte function-associated antigen 1 dominates very late antigen 4 in binding of activated T cells to endothelium. *The Journal of Experimental Medicine* 177:185.

Varner J.A. and Cheresch D.A., 1996. Integrins and cancer. *Current opinion in Cell Biology* 8:724-730.

Velasco-Velázquez M.A., Molina-Guarneros J.A., Mendoza-Patiño N., López J.S. and Mandoki J.J., 1999. Integrinas y moléculas asociadas a integrinas: blancos para el desarrollo de terapias antimetastásicas. *Revista de Investigación Clínica* 51:183-193.

Velling T., Kusche-Gullberg M., Sejersen T. and Gullberg D., 1999. cDNA cloning and chromosomal localization of human α_{11} integrin. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 25735-25742.

Vetvicka V., Thornton B.P. and Ross G.D., 1996. Soluble β -glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3B-opsonized target cells. *Journal of Clinical Investigation* 98:50-61.

Villa-García M., Li L., Riely G. and Bray P.F., 1994. Isolation and characterization of a TATA-less promoter for the human integrin gene. *Blood* 83:668-676.

Vink J., Thomas L., Etoh T., Bruijn J.A., Mihm M.C., Gattoni-Celli S. and Byers H.R., 1993. Role of beta-1 integrins in organ specific adhesion of melanoma cells in vitro. *Laboratory Investigation* 68:192-203.

Vogel B.E., Tarone G., Giancotti F.G., Gailit J. and Ruoslahti E., 1990. A novel fibronectin receptor with an unexpected subunit composition ($\alpha_v\beta_1$). *The Journal of Biological Chemistry* 265:5934-5937.

Wall C.D., Conley P.B., Armendariz-Borunda J., Sudarshan C., Wagner J.E., Raghov R. and Jennings L.K., 1997. Expression of $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin (GPIIb-IIIa) in myeloid cell lines and normal CD34+/CD33+ bone marrow cells. *Blood cells, Molecules, and Diseases* 30:361-376.

Walsh, F.S. and Doherty, P., 1997. Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annual Review of Cell Developmental Biology* 13:425-456.

Wang R., Furihata K., McFarland J.G., Friedman K., Aster R.H. and Newman P.J., 1992. An amino acid polymorphism within the RGD binding domain of platelet membrane glycoprotein IIIa is responsible for the formation of the Pen^a/Pen^b alloantigen system. *The Journal of Clinical Investigation* 90:2038-2043.

Wang R., McFarland J.G., Kekomaki R. and Newman P.J., 1993. Amino acid 489 is coded by a mutational “hot pot” on the beta 3 integrin chain: the CA/TU human platelet alloantigen system. *Blood* 82:3386-3391.

Wang R., Stromer M.H. and Huiatt T.W., 1998. Integrin expression in developing smooth muscle cells. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 46:119-125.

Wang R.N., Paraskevas S. and Rosenberg L., 1999. Characterization of integrin expression in islets isolated from hamster, canine, porcine and human pancreas. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 47:499-506.

Weiss E.J., Bray P.F., Tayback M., Schulman S.P., Kickler T.S., Becker L.C. et al., 1996. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *The New England Journal of Medicine* 334:1090-1099.

Williams A.F. & Barclay A.N., 1988. The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Annual Review of Immunology*. 6:381-406.

Yabkowitz R. Dixit V.M., Guo N., Roberts D.D. and Shimizu Y., 1993. Activated T-cell adhesion to thrombospondin is mediated by the $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) and $\alpha 5\beta 1$ (VLA-5) integrins. *Journal of Immunology* 151:149.

Yamada K.M. and Miyamoto S., 1995. Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Current Opinion in Cell Biology* 7:681-689.

Yap A.S. et al., 1997. Molecular and functional analysis of cadherins-based

adherens junctions. *Annual Review of Cell Developmental Biology* 13:119-146.

Yee K.O., Rooney M.M., Giachelli C.M., Lord S.T. and Schwartz S.M., 1998. Role of β_1 and β_3 integrins in human smooth muscle cell adhesion to and contraction of fibrin clots in vitro. *Circulation Research* 83:231-251.

Yerle M., Echard G., Robic A., Mairal A., Dubut-Fontana C., Riquet J., Pinton P., Milan D., Lahbib-Mansais Y., Gellin J., 1996. A somatic cell hybrid panel for pig regional gene mapping characterized by molecular cytogenetics. *Cytogenetics and Cell Genetics* 73:194-202.

Yerle M., Lahbib-Mansais Y., Pinton P., Goureau A, Milan D. and Gellin J, 1997. The cytogenetic map of the domestic pig (*Sus scrofa domestica*). *Mammalian Genome* 8:592-607.

Zutter M.M., 1991. Immunolocalization of integrin receptors in normal lymphoid tissues. *Blood* 77: 2231-2236.