



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**La cinasa Lyn modula la respuesta  
inmune innata participando en la  
transducción de señales del receptor  
TLR-4 en células cebadas**

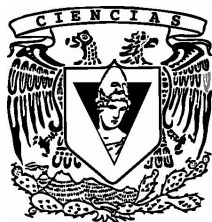
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**Bióloga**

**P R E S E N T A:**

**Adriana Martínez Juárez**



**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dra. Claudia González Espinosa**

**2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*Dedicada a mis padres, hermanos, abuelos (as)...  
tíos (as), primos (as), sobrinos (as).*

## **Agradecimientos**

A mi asesora de tesis:

Dra. Claudia González Espinosa

Al jurado:

Dra. Rocío Salceda Sacanelles, Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, Dra. Marina Macías Silva y Rocío Hernández Alcántara.

A mis compañeros del laboratorio:

Martín Alejandro Ávila Hernández, Jaciel Medina Tamayo, Iris Karina Madera Salcedo, Elizabeth Sánchez Miranda, Jonathan García Roman, Yanek Jiménez G., Químico Alfredo Ibarra, Técnico de laboratorio Armando Resendíz.



Todos los experimentos reportados en esta tesis fueron realizados en el laboratorio # 11 del Departamento de Farmacobiología del CINVESTAV, con el apoyo del donativo de CONACyT # 83079.

La estudiante recibió un apoyo del CONACyT 102830.

Esta tesis es producto de la participación en el Taller de Titulación de la Facultad de Ciencias, Hormonas Mensajeros Químicos Extracelulares y los Mecanismos de Comunicación Celular.

<b>1. Introducción .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Generalidades sobre el sistema inmune y su evolución.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2 Componentes de la respuesta inmune innata conservados</b>	
<b>en la evolución de los animales.....</b>	<b>11</b>
<b>1.3 Resumen.....</b>	<b>13</b>
<b>2. Planteamiento del problema.....</b>	<b>14</b>
<b>3. Antecedentes.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Células cebadas y la inmunidad innata .....</b>	<b>15</b>
<b>3.2 Medidores inmunológicos producidos por las CC de mamíferos.....</b>	<b>20</b>
<b>3.3 Las células cebadas expresan receptores del tipo Toll.....</b>	<b>21</b>
<b>3.3.1 Reconocimiento de patrones moleculares</b>	
<b>asociados a patógenos.....</b>	<b>23</b>
<b>3.3.2 Lipopolisácaridos bacterianos.....</b>	<b>25</b>
<b>3.4 Mecanismo de señalización del receptor TLR-4 .....</b>	<b>27</b>
<b>3.5 El papel de la cinasa de tirosina Lyn en la activación de las células cebadas.....</b>	<b>31</b>
<b>3.5.1 Evidencias de la participación de la cinasa de tirosina</b>	
<b>Lyn en el sistema de transducción de señales del receptor TLR-4.....</b>	<b>32</b>
<b>4. Objetivo general.....</b>	<b>35</b>
<b>5. Hipótesis .....</b>	<b>36</b>
<b>6. Justificación .....</b>	<b>36</b>
<b>7. Alcances.....</b>	<b>37</b>
<b>8. Metodología .....</b>	<b>37</b>
<b>8.1 Ratones .....</b>	<b>37</b>
<b>8.2 Extracción de DNA cromosomal a partir de biopsias de los ratones</b>	
<b>129Sv/SvImJ.....</b>	<b>37</b>

8.3 Establecimiento de genotipos de los ratones 129Sv/SvImJ por PCR.....	38
8.4 Cultivos primarios de células cebadas.....	39
8.5 Ensayo de desgranulación.....	40
8.6 ELISA TNF- $\alpha$ .....	40
8.7 Purificación de RNA .....	41
8.8 Ensayo de retrotranscripción (RT) .....	42
8.9 PCR de citocinas .....	42
8.10 Extracción de proteínas.....	43
8.11 Western Blot.....	43
8.12 Extracción de núcleos.....	45
8.13 Ensayo de Retardamiento de la Movilidad Electroforética (EMSA).....	45
<b>9. Resultados.....</b>	<b>47</b>
<b>9.1 Determinación de los genotipos de los ratones</b>	
Wt y Lyn-/- utilizados en este estudio.....	47
<b>9.2 La cinasa Lyn participa positivamente en la desgranulación de las células</b>	
cebadas inducida por un estímulo con IgE/Antígeno. ....	48
<b>9.3 Los lipopolisacárido de E. coli no inducen la desgranulación</b>	
en las células cebadas. ....	50
<b>9.4 Las células cebadas derivadas de ratones Lyn-/- no</b>	
secretan TNF- $\alpha$ después de un estímulo con lipopolisacáridos de E.coli.....	51
<b>9.5 La cinasa Lyn participa positivamente en la acumulación del mRNA de la</b>	
citocina TNF- $\alpha$ después de la activación del receptor TLR-4 en células cebadas.....	52

9.6 La cinasa Lyn participa positivamente en la activación de la cascada de las MAPK después de estimular al receptor TLR-4 de las células cebas con lipopolisácaridos de E. coli. ....	53
9.7 La cinasa Lyn participa positivamente en la activación de la vía de NFκB después de estimular al receptor TLR-4 de las células cebas con lipopolisácaridos de E.coli. ....	56
10 Discusión .....	61
11. Conclusión .....	70
ANEXO 1 MATERIAL Y SOLUCIONES .....	71
Bibliografía. ....	83

## Abreviaturas

Inglés	Español
• AP-1, activating protein-1	• AP-1, Proteína Activadora-1
• ATF, activating transcription factor	• ATF, Factor de transcripción activador
• ERK, extracellular signal-regulated kinase	• ERK, cinasa regulada por señales extracelulares
• IκB, inhibitor of NF-κB	• IκB, inhibidor de NF-κB
• IRAK, interleukin-1 receptor-associated kinase	• IRAK, cinasa asociada al receptor de interleucina-1
• JNK, c-Jun N- terminal Kinase	• JNK, Cinasa N-terminas c-Jun
• LPS, lipopolysaccharide	• LPS, lipopolisacárido
• MC, Mast cells	• CC, Células Cebadas
• MyD88, myeloid differentiation primary response protein 88	• MyD88, proteína de respuesta temprana a diferenciación mieloide 88
• NF-κB, nuclear factor κB	• NF-κB, Factor Nuclear κB
• TAK1, transforming growth factor-β-activated protein kinase 1	• TAK1, proteína cinasa 1 activada por el factor transformante de crecimiento-β
• TBK1, TANK-binding kinase	• TBK1, cinasa de unión a TANK
• TIR, Toll/interleukin-1 receptor	• TIR, receptor Toll/interleucina-1
• TLR, Toll-like receptor	• TLR, Receptor del tipo Toll
• TNF, tumor necrosis factor	• TNF, Factor de necrosis tumoral
• TRAF6, tumor necrosis factor receptor-associated factor 6	• TRAF6, factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral
• LRR, leucine-rich repeat	• LRR, repeticiones ricas en leucina
• PTK, Protein Tyrosine Kinases	• PTK, Proteínas tirosina cinasas
• PMA, Phorbol Myristate Acetate	• PMA, Forbol Miristato Acetato
• A23187, 4-Bromo-calcimycin	• A23187, 4-Bromo-calciomicina
• DNP-HSA, dinitrophenylated-human serum albumin	• DNP-HSA, albúmina humana acoplada a dinitrofenol
• PAMPs, pathogen-associated molecular patterns	• PAMPs, Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
• RING, real interesting new gen	• RING, realmente interesante nuevo gen
• LAT, Linker for activation of T cells	• LAT, Unión para la activación de células T
• iNOS, inducible nitric oxide synthases	• iNOS, óxido nítrico sintasa inducible
• GAPDH, Glyceraldehyde 3-phosphate	



## 1. Introducción

### ***1.1 Generalidades sobre el sistema inmune y su evolución***

El registro fósil y marcadores radioactivos sugieren que las primeras células eucariontes pudieron haber surgido hace 2700 millones de años y aunque no se conoce con detalle la evolución temprana de los primeros eucariontes, es probable que tomara otros cientos de millones de años la evolución de los organismos multicelulares<sup>1, 2 3</sup>.

Los animales son seres multicelulares, en los cuales sus células están organizadas como unidades funcionales, generalmente como órganos y tejidos, con funciones particulares que sostienen la homeostasis de su organismo. Estructuralmente, las células animales son especializadas, interdependientes, coordinadas en su función y se desarrollan en la embriogénesis<sup>2</sup>.

Durante la evolución de la gran diversidad de animales que existen en el planeta, se han seleccionado muchas estrategias que les permiten sobrevivir y adecuarse a las condiciones del medio ambiente. Un ejemplo de ello es su sistema inmune, el cual está especializado en la defensa contra una infección y detección de daño<sup>4, 5</sup>.

Esta maquinaria ha sido desarrollada durante millones de años y ha estado sometida a una intensa presión de selección, favoreciendo de esta forma los mecanismos que llevan al reconocimiento y a la rápida eliminación de agentes patógenos, que desequilibran la homeostasis y afectan la adecuación del organismo al que infectan. Por lo tanto, el sistema inmune juega un papel fundamental en la sobrevivencia de los animales<sup>6</sup>.

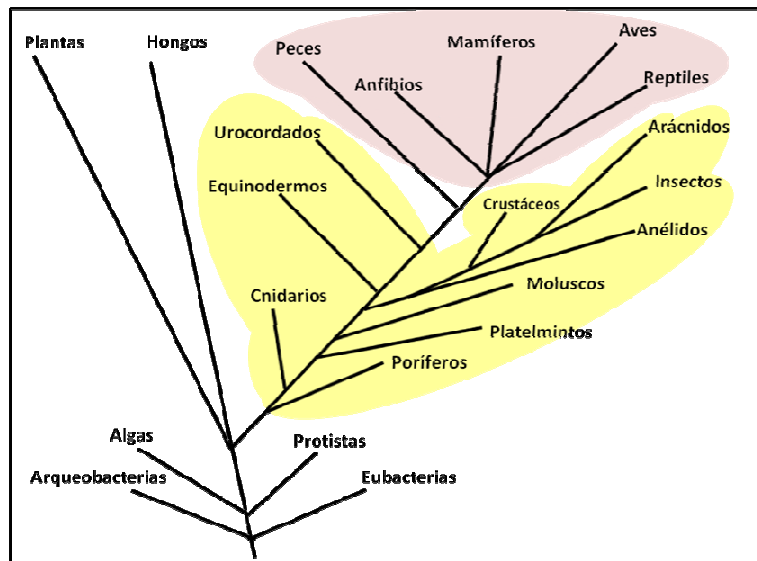
El sistema inmune animal se divide en dos distintos tipos de respuestas que colaboran en contra de una infección<sup>7</sup>: la respuesta temprana o inmunidad innata, que es un tipo de defensa que utiliza células fagocíticas (neutrófilos, monocitos y macrófagos) así como células que liberan mediadores (basófilos, células cebadas y eosinófilos) y componentes moleculares (citocinas, proteínas de fase aguda y el sistema de complemento)<sup>4, 7</sup>.

Por otro lado, la respuesta inmune tardía o inmunidad adquirida involucra la proliferación de células como los linfocitos B y T, que poseen receptores específicos en la superficie celular, que se enlazan al antígeno. Los linfocitos B también secretan inmunoglobulinas específicas para cada antígeno, las cuales ayudan a eliminar patógenos tanto extracelulares como intracelulares. Además, en este tipo de inmunidad están involucradas células especializadas denominadas presentadoras de antígeno, las cuales exponen el antígeno a los linfocitos y colaboran con ellos en la respuesta inmune<sup>4</sup>.

La inmunidad innata es tan antigua como los primeros organismos multicelulares<sup>5,7</sup>. Dado lo anterior, si los animales tuvieron su origen en el Eon Proterozoico; la inmunidad innata pudo haberse originado hace 1200 millones de años<sup>2,3</sup> y, probablemente, el principal mecanismo de defensa en un principio fue el proceso de fagocitosis<sup>6,8</sup>.

En apoyo a lo anterior se han observado elementos de la inmunidad innata tanto en animales invertebrados como en vertebrados; como por ejemplo, se han encontrado fagocitos en invertebrados que son capaces de secretar citocinas parecidas a las secretadas por los macrófagos de los vertebrados<sup>5,7</sup>.

Además otros elementos de la inmunidad innata que también comparten los animales invertebrados con los vertebrados, e incluso con otro tipo de seres vivos como las plantas, son los componentes moleculares de la vía de los receptores del tipo Toll (TLR's)<sup>9</sup>. Por ejemplo, en cnidarios o medusas del género *Hydra* existen moléculas homólogas a las involucradas en la vía clásica de los receptores del tipo Toll de otras especies como insectos y mamíferos<sup>5</sup>. Generalmente, las funciones de este tipo de receptores están asociadas con la resistencia del organismo a infecciones ocasionadas por virus, bacterias y hongos, y por tanto es una vía altamente conservada en la evolución de la inmunidad innata<sup>5,6</sup>.



**Figura 1. Representación grafica de la filogenia del Reino Animalia.** En el sector amarillo se muestran los grupos de los animales que presentan elementos de la inmunidad innata. Los grupos de animales que están encerrados en el sector rosado (Cordados) presentan dos tipos de respuesta inmune: la inmunidad innata y la inmunidad adquirida.

Finalmente el sistema inmune adquirido surge en los vertebrados y se favorece la especialización conforme aparecen las distintas filogenias de los mismos (anfibios, reptiles, aves y mamíferos) <sup>7, 8</sup>. Las características fundamentales de especificidad, memoria, discriminación de lo propio y de lo no propio, la capacidad de autolimitación, se encuentran desde los vertebrados inferiores, mientras que la capacidad del reconocimiento de una gran variedad de antígenos se observa progresivamente en los vertebrados superiores<sup>5, 7</sup>. Por lo tanto, el sistema inmune de los animales ha evolucionado durante millones de años y por medio de la selección natural se ha favorecido el desarrollo de un complejo sistema que integra varias señales ante una infección, y que, a su vez, es producto de la interacción de los animales con el medio ambiente<sup>3</sup>.

## **1.2 Componentes de la respuesta inmune innata conservados en la evolución de los animales.**

La inmunidad innata es filogenéticamente más antigua que la inmunidad adquirida y se encuentra tanto en los animales invertebrados como en los vertebrados <sup>5, 7</sup> (figura 1). Estos dos tipos de inmunidad comparten elementos altamente conservados en el transcurso de la evolución de los animales, tales como: 1) células fagocíticas, las cuales han sido llamadas amibocitos fagocíticos en acelomados, homeocitos en moluscos y artrópodos, celomocitos en anélidos, leucocitos sanguíneos en tunicados y finalmente macrófagos en vertebrados. 2) Moléculas como es el caso de los receptores para patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) y la vía de activación del factor de transcripción NFκB <sup>3, 6, 7, 10</sup>.

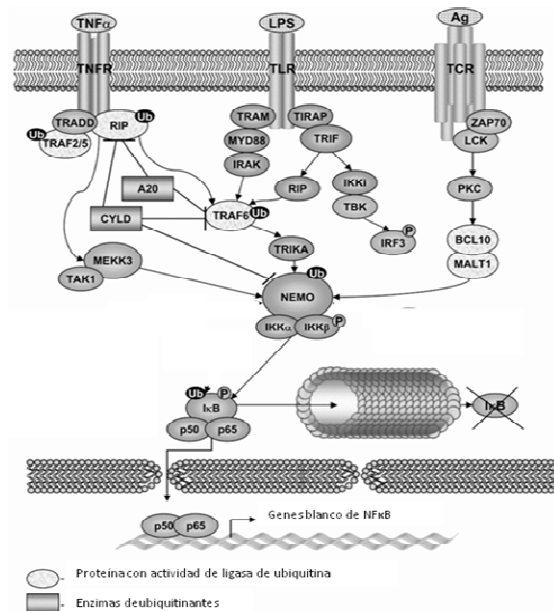
También existe otro tipo celular esencial para la inmunidad innata que es compartido por invertebrados y vertebrados: las células cebadas. Estas células juegan un papel muy importante en la evolución del sistema de defensa de los vertebrados, ya que son las encargadas de secretar mediadores y proteasas que participan en la defensa del hospedero<sup>11</sup>.

Otros elementos de la inmunidad innata altamente conservados en la evolución, son los componentes moleculares de la vía de los receptores del tipo Toll (TLR's), los cuales se expresan en la superficie de las células del sistema inmune de los animales y son fundamentales para montar y regular este tipo de respuesta<sup>3, 6-9</sup>.

Por ejemplo, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* tiene un sistema inmune innato bien desarrollado y comparte con los vertebrados estos receptores de superficie celular, también llamados receptores de reconocimiento a patrones moleculares asociados a patógenos, como lo son las bacterias Gram positivas, Gram Negativas y Hongos <sup>5, 10</sup>.

Los sistemas de transducción de los receptores para patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) están acoplados a la activación de NFκB, lo cual es fundamental para

la inmunidad animal, ya que como se puede observar en la figura 2 se trata de una vía casi universal que lleva a la activación de muchos sistemas de defensa del huésped<sup>11</sup>, tales como la apoptosis de células cancerígenas, la respuesta de los linfocitos al antígeno, así como la activación de la cascada de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitogenos MAPK <sup>10</sup>, las cuales son cinasas de serina/treonina que activan y regulan muchos procesos celulares. Por lo tanto, es una vía altamente conservada en la evolución de los animales que participa en muchos procesos celulares<sup>12</sup>.



**Figura 2. Vías que activan al factor de transcripción NFκB.** En esta figura se muestra la activación del factor de transcripción NFκB a través de distintos receptores tales como: el Receptor para TNF-α, los receptores TLR y los receptores de linfocitos TCR. Modificado de: Terzic J., I.M.-T., F. Ikeda and I. Dikic. Ubiquitin signals in the NF-κB pathway. *Biochemical Society Transactions* **35**, 942-945 (2007).

### 1.3 Resumen

La inmunidad innata es la primera línea de defensa del organismo, se caracteriza por una respuesta colectiva y coordinada de células y moléculas contra agentes patógenos. Los animales carentes de CC mueren rápidamente debido a infecciones bacterianas por organismos Gram-negativos. Las CC expresan al receptor Toll-4 (TLR4), que reconoce lipopolisacáridos bacterianos (LPS). La activación del receptor TLR-4 inicia una compleja red de señalización que requiere del reclutamiento de la molécula MyD88, y de la activación de las cinasas de serina/treonina IRAK 1 y 4, activando a las MAPK y al factor nuclear NFκB, lo cual culmina en la producción de TNF-α y otras citocinas proinflamatorias. El sistema de transducción del TLR-4, al parecer, no requiere de la participación de ninguna cinasa adicional a las IRAKs, sin embargo existen reportes de la fosforilación en residuos de tirosina de varias proteínas después de la activación de este receptor. El objetivo de este trabajo es caracterizar el papel que juega una cinasa de la familia de Src, la cinasa Lyn, en la vía de transducción del receptor TLR-4 en células cebadas de origen murino. Para ello, se realizaron cultivos primarios de CC obtenidas a partir de la médula ósea del fémur de ratones 129S1/SvImJ silvestres (Wt) y deficientes en la cinasa Lyn (Lyn<sup>-/-</sup>). A las cuatro semanas de cultivo las células fueron estimuladas con LPS y se analizó la activación de las MAPK ERK, JNK y p38, así como de proteínas que participan en la vía de transducción de NFκB, tales como IKKα/β e IκB. Finalmente se observó la traslocación nuclear de la subunidad p65 del factor de transcripción NFκB en células Wt y Lyn<sup>-/-</sup> estimuladas por LPS. Los resultados indican que la cinasa Lyn es necesaria para la activación de la cascada de señalización desde el receptor TLR-4 hasta las MAPK y que además, participa en la activación de la vía del factor nuclear NFκB, específicamente, en la translocación nuclear de su subunidad p65.

**Palabras clave:** Células Cebadas, Cinasas de la Familia de Src, Cinasa Lyn, Receptor TLR-4, MAPK, NFκB, Inmunidad Innata, Inflamación.

## **2. Planteamiento del problema**

El sistema inmune innato en los animales es muy importante en la respuesta del hospedero contra patógenos; después de las barreras físicas y químicas es la primera línea de defensa del organismo. En una respuesta de este tipo participan células fagocíticas y productoras de mediadores, dentro de las cuales se encuentran las células cebadas<sup>7, 15</sup>.

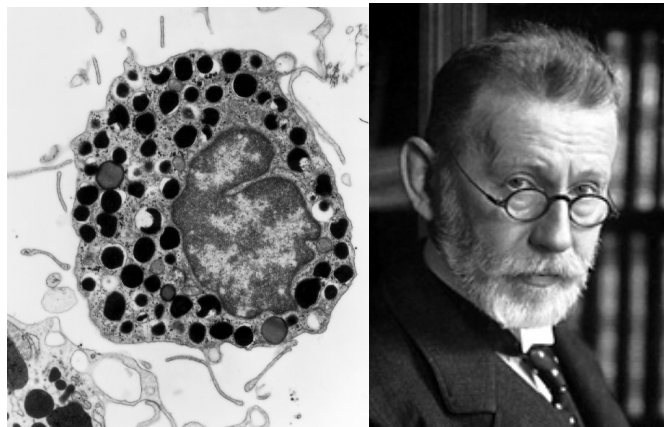
Las células cebadas han sido muy estudiadas por el papel que desempeñan ante las enfermedades alérgicas, sin embargo en los últimos años se han identificado nuevas funciones de este tipo celular y de los mediadores secretados por las mismas<sup>18</sup>.

Una vez que el receptor TLR-4 es activado por su ligando (LPS), en las células cebadas se desencadena una vía de señalización interna que esta mediada por proteínas cinasas de treonina/serina y que culmina en la activación de NFκB<sup>30</sup>. Sin embargo, existe evidencia indirecta de la asociación de una cinasa de tirosina Lyn de la familia Src en este sistema de transducción, aunque su participación aún no está bien caracterizada<sup>38, 39</sup>.

### 3. Antecedentes

#### 3.1 Células cebadas y la inmunidad innata

Las células cebadas son de gran interés para los inmunólogos desde que fueron primeramente descritas por Paul Ehrlich en 1878 en el tejido conectivo de la piel de los mamíferos<sup>11</sup>. Este descubrimiento lo presentó en su trabajo de tesis doctoral en la Universidad de Leipzig, y les dio el nombre de “mästzellen” término que quiere decir “célula bien alimentada”. Sin embargo también se les conoce como células cebadas debido a su alto contenido de gránulos en el citoplasma<sup>13</sup> (figura 3) .



---

Figura 3. A) Se muestra una micrografía electrónica de transmisión de una célula cebada. B) Fotografía de Paul Ehrlich premio nobel en medicina 1908. (Methods in Molecular Biology, vol 315: Mast Cells: Methods and Protocols; edited by G. Krishnaswamy and D.S Chi © Humana Press Inc).

---

La presencia de las células cebadas ha sido reportada esencialmente en todas las especies de vertebrados<sup>14</sup>. Pero también se han descrito en algunos invertebrados tales como las almejas (Moluscos) y los tunicados (Urocordados). La amplia distribución de este tipo celular en los animales indica que éstas han jugado un papel fundamental en la evolución temprana del sistema inmune innato<sup>11</sup>. Sin embargo, la mayoría de las investigaciones



sobre su función biológica en la inmunidad innata se han realizado en mamíferos, principalmente en modelos murinos<sup>15</sup>.

En mamíferos, las CC derivan de progenitores hematopoyéticos de la médula ósea<sup>16</sup>, los cuales circulan en la sangre migrando posteriormente a los tejidos periféricos, como células inmaduras, antes de sufrir su estado final de diferenciación *in situ*, lo cual incluye el desarrollo de los gránulos maduros<sup>9, 16</sup>. Es importante mencionar que los principales factores de crecimiento para las CC de los roedores *in vivo* son la interleucina 3 (IL-3) y el Stem-cell factor (SCF) también conocido como ligando del receptor Kit.

Una vez localizadas en el tejido donde residirán, las células cebadas pueden sufrir más cambios, resultando en dos subclases de acuerdo al tipo de proteasa contenida en sus gránulos: 1) las células cebadas de mucosas (CCM) las cuales contienen triptasa y 2) las células cebadas del tejido conectivo (CCTC)<sup>11</sup> que además de triptasa contienen otra proteasa llamada quimasa<sup>9</sup>.

Además, las CC de los mamíferos se distribuyen principalmente en todos los tejidos vascularizados, especialmente muy cerca de los sitios donde el cuerpo entra en contacto con el ambiente externo, tales como la mucosa del intestino, vías aéreas, así como la piel. Esta localización estratégica se debe a que son células efectoras que inician y modulan la respuesta inmune innata ante el daño de un tejido o infección<sup>15, 17, 18</sup>.

La activación de las células cebadas resulta en tres tipos de respuesta biológica: 1) la secreción del contenido de sus gránulos a través de un altamente regulado proceso de exocitosis, denominado *desgranulación*; 2) la síntesis y secreción de mediadores lipídicos sintetizados *de novo* y por último 3) la síntesis y secreción de citocinas<sup>7, 13, 19, 20</sup>. Las CC expresan una gran variedad de receptores que les permiten sentir y responder a una gran variedad de estímulos<sup>19</sup> (tabla 1).

Las principales investigaciones sobre el papel biológico que desempeñan estas células en el sistema inmune de los mamíferos, se han realizado debido a su participación en las enfermedades alérgicas<sup>9, 17, 18, 21, 22</sup>. Sin embargo, al parecer, su función original es la

defensa del organismo frente a infecciones bacterianas, parasitarias, fúngicas, virales, eliminar toxinas del hospedero, así como inducir la inflamación asociada con la respuesta inmune innata <sup>7,17, 20</sup>. Además, regulan la respuesta inmune adaptativa a través de la migración, maduración y/o función de las células dendríticas y por la interacción con células B y T <sup>9, 17, 22</sup>.

**Tabla 1. Principales receptores de las CC involucrados en la defensa del organismo**

Clase de receptor	Ejemplo de receptor	Ejemplos de ligandos
<b>Receptores directos para productos de patógenos</b>		
Receptores del tipo Toll	TLR1	Lipopeptido
	TLR2	PGN, zimosan y algunos tipos de LPS
	TLR3	RNA de doble hebra
	TLR4	LPS, proteína F de RSV
	TLR6	PGN y zimosan
	TLR9	DNA bacteriano y DNA con secuencias CpG
Receptores Manosilados	CD48	FimH
<b>Receptores indirectos para productos de respuesta inmune a patógenos</b>		
Fc receptores	FcεRI, FcγRI, FcγRII y FcγRIII	IgE , IgM
Receptores del complemento	CR2, CR4, y CR5, C5aR y C3aR	Componentes de Complemento desconocido
Receptores activados por proteasas	PAR2	Proteasas de Células Cebadas
Receptores citocinas	IL-R1 e IFN-γR	Citocinas inmunoregulatorias
	IL-10 e IL-12R	Citocinas inmunoregulatorias
Receptores de Quimiocinas	CCR3, CCR5 y CXCR4	Quimioatrayentes de células cebadas

CCL, quimiocinas con motivo CC; CXCL, quimiocinas con motivo CXC; FGF2, Factor de crecimiento para fibroblastos; GM-CSF, Factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos; IFN, interferon; IL, interleucina; LIF, factor inhibidor de leucemia; LBT<sub>4</sub>, factor de leucotrieno B<sub>4</sub>; LTC<sub>4</sub>, leucotrieno C<sub>4</sub>; PGD<sub>2</sub>, prostaglandina D<sub>2</sub>; PGE<sub>2</sub>, prostaglandina E<sub>2</sub>; TGF-β, factor transformante de crecimiento-β; TNF, factor de necrosis tumoral; VEGF, factor endotelial de crecimiento vascular. Tomado de: Marshall, J. Mast-cell responses to pathogens. *Nature Reviews Immunology* **4**, 787-799 (2004).

La evidencia directa de la participación de las células cebadas en la inmunidad innata surge hace solamente algunos años, obtenida a través de estudios sobre el papel de estas células en la defensa contra bacterias. Un primer estudio sobre este tema fue el de Leal-Berumen y Marshall en 1994 et al., en el cual estimularon células cebadas del peritoneo de ratas con complejos IgE-antígeno y con LPS, con el objetivo de observar la producción de IL-6 y la liberación de histamina, esta última como marcador de la desgranulación de las CC. Ellos encontraron que los LPS activan a las CC e inducen la producción de IL-6, sin la liberación de histamina. De manera contraria, cuando estimularon las CC con IgE-antígeno, encontraron que se inducía la producción de IL-6 junto con la liberación de histamina <sup>23</sup>. *Por lo tanto, las CC podían producir citocinas en respuesta al LPS sin desgranulación*<sup>19, 21, 23</sup>.

Otra aportación importante en la investigación sobre el papel biológico de estas células estuvo dado gracias al desarrollo de ratones deficientes en células cebadas (ratones W/Wv), así como el desarrollo de estudios importantes en los que se describió que las CC regulan la respuesta inflamatoria, debido a la capacidad de reclutar a los neutrófilos rápidamente a los sitios de infección, a través de la síntesis y/o liberación de mediadores tempranos como el TNF- $\alpha$ <sup>15</sup>.

La importancia de las células cebadas en el incremento de la protección del hospedero, a través de la producción del mediador TNF- $\alpha$ , fue observada en estudios realizados por Malaviya et. al. (1996) y Echtenacher et. al. (1996) <sup>15, 22</sup>. Ambos grupos de investigación usaron la cepa de ratones deficiente en células cebadas (W/Wv), la cual carece del receptor para SCF, un importante factor de crecimiento de los progenitores de las células cebadas. En el primer trabajo se encontró que, en comparación con los ratones normales, las cepas deficientes en células cebadas (W/Wv), no eran capaces de responder a la infección intranasal o intraperitoneal ocasionada por el patógeno *Klebsiella pneumoniae*. Esto se asoció con un defecto en la habilidad de producir TNF- $\alpha$  y de reclutar neutrófilos al sitio de infección. Este estudio probó que la carencia de CC era responsable del decremento en la eliminación de bacterias en los tejidos y de que los ratones tuvieran un

reducido número de otro tipo de células sanguíneas. Sin embargo, la reconstitución de los ratones W/Wv con CC purificadas de ratones normales, ocasionaron que se disminuyeran nuevamente los niveles de bacterias y restauraron la producción de altos niveles de TNF- $\alpha$ , además del restablecimiento del reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección<sup>24</sup>.

En el trabajo de Echtenacher *et. al.*, también se utilizaron ratones deficientes en células cebadas, a los cuales se les indujo una peritonitis a través de modelos de ligamiento cecal. Cuando se realizó este procedimiento observaron que el 100% de los ratones W/Wv morían ante una infección bacteriana; en contraste al 25% de mortalidad de los ratones silvestres, los cuales tenían un número normal de células cebadas y sobrevivían a la sepsis. Finalmente, cuando células cebadas eran reconstituidas en la cavidad peritoneal de los ratones W/Wv, la habilidad de vencer la infección se restauró de manera similar a lo observado en el ratón silvestre<sup>22</sup>. Por lo tanto se demostró que las CC participan en la defensa del huésped ante una infección bacteriana<sup>25</sup>.

Además, en este estudio se sugirió que este efecto en las células cebadas estaba mediado por TNF- $\alpha$ , porque la inyección de un anticuerpo neutralizante para TNF- $\alpha$  suprime la protección dependiente de CC contra una infección en ratones silvestres. Mientras una dosis de TNF- $\alpha$  protegía a ratones W/Wv no reconstituidos del procedimiento de ligamiento cecal y de la peritonitis inducida<sup>25</sup>.

### **3.2 Mediadores inmunológicos producidos por las CC de mamíferos**

Las células cebadas producen tres principales clases de mediadores: 1) los mediadores preformados asociados a los gránulos, principalmente proteasas incluyendo enzimas con actividad parecida a triptasas, quimasas o carboxipeptidasas. 2) Derivados del ácido araquidónico (prostanglandinas y leucotrienos) y 3) una amplia variedad de citocinas y quimiocinas (tabla2)<sup>9</sup>.

Esta gran variedad de mediadores que producen las células cebadas, se debe a su capacidad de responder a una gran variedad de estímulos, lo cual permite el inicio y el mantenimiento apropiado de una respuesta inmune efectiva. Por ejemplo, las células de roedores producen selectivamente TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF) y varias quimiocinas en respuesta a LPS, sin que ocurra la desgranulación. *In vivo* se ha observado que la liberación de estos mediadores reclutan a neutrófilos al sitio donde ha sido inoculado el ratón con LPS<sup>9</sup>. En contraste, el tratamiento de CC murinas con los componentes de la pared celular de bacterias Gram Positivas, lleva a la producción de citocinas tales como IL-4, IL-5, IL-6 y GM-SFC, así como a la inducción de la desgranulación, lo cual resulta en el desarrollo de un edema local y el incremento en la permeabilidad vascular<sup>9</sup>

La cantidad de citocinas y quimiocinas producida por las células cebadas frecuentemente exceden a las producidas por las células efectoras tradicionales, tales como macrófagos y células T<sup>9</sup>. Por lo tanto, las células cebadas tienen la habilidad de distinguir entre diferentes señales asociadas a patógenos y generar respuestas, a través de mediadores, sumamente selectivos en contras de infecciones virales y bacterianas<sup>9</sup>.

**Tabla 2. Principales mediadores secretados por las células cebadas**

Mediadores	Ejemplo de función
<b>Asociados a gránulos</b>	
Histamina y serotonina	Alteran la permeabilidad vascular
Heparina y/ condritina Peptidoglicanos Proteoglicanos y estructuras altamente sulfatadas	Incremento de las quimiocinas y/o citocinas y de la angiogenesis. Almacén de quimiocinas y factores de crecimiento
Enzimas triptasa, quimasa, carboxipeptidasa y otras proteasas	Remodelan el tejido y reclutan células efectoras
TNF, VEGF y FGF2	Recluta células efectoras y eleva la angiogénesis
<b>Derivados lipídicos</b>	
LTC <sub>4</sub> , LTB <sub>4</sub> , PGD <sub>2</sub> y PGE <sub>2</sub>	Recluta células efectoras (eosinófilos y neutrófilos), regula el sistema inmune, cambios vasculares, promueve angiogénesis, edema y broncoconstricción.
Factor activador de plaquetas	Activa células efectoras, eleva angiogénesis e induce inflamación fisiológica
<b>Citocinas</b>	
TNF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, GM-CSF, LIF, IFN- $\beta$	Inducen inflamación
IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-15 e IL-16	Funcionan como citocinas del tipo TH2
IL-8, IL-12 y IFN- $\gamma$	Funcionan como citocinas del tipo TH-1
IL-10, TGF- $\beta$ y VEGF	Regula la inflamación y la angiogenesis
<b>Quimiocinas</b>	
CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11 y CCL20	Recluta células efectoras, incluyendo células dendríticas y regulan la respuesta inmune
CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10 y CXCL11	Recluta células efectoras y regulan la respuesta inmune
<b>Otros</b>	
Óxido nítrico y radicales superóxido	Bactericidas
Péptidos antimicrobianos como la Catelicidina	Bactericidas

C3aR, receptor para el componente 3a de complemento; C5aR, receptor para el componente 5a de complemento; CCR, receptor para quimiocinas-CC; CR, receptor para complemento; CXCR, receptor para quimiocinas CXC; proteína F, proteína de fusión; Fc $\gamma$ RI, receptor de alta afinidad para la inmunoglobulina G; Fc $\gamma$ RII, receptor de baja afinidad para la inmunoglobulina G; Fc $\epsilon$ RI, receptor de alta afinidad para la inmunoglobulina E; IFN- $\gamma$ R, receptor para interferon- $\gamma$ ; IL-1R, receptor de interleucina-1; LPS, lipopolisacáridos; PAR2, receptor 2 activado por proteasas; PGN, peptidoglicano; RSV, virus respiratorio sincitial; TLR, receptor del tipo Toll. Tomado de : Marshall, J. Mast-cell responses to pathogens. *Nature Reviews Immunology* 4, 787-799 (2004).

### **3.3 Las células cebadas expresan receptores del tipo Toll**

La habilidad de las CC para montar una respuesta inmune específica contra los distintos patógenos, depende de la expresión de receptores directos o indirectos (tabla 1) que detectan la presencia de patógenos dañinos y de otras señales de peligro, lo cual desencadena una rápida respuesta selectiva<sup>9, 26</sup>.

Se ha demostrado que las células cebadas expresan en su superficie distintos receptores del tipo Toll (TLR-1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 y 9) que median la activación de una gran variedad de eventos en la respuesta inflamatoria. La evidencia de la participación de estos receptores en la inmunidad innata, fue generada a partir de diversos estudios realizados en cepas de ratones deficientes de los receptores TLR-4 y TLR-2, en los que se demostró que eran esenciales para la producción de distintos mediadores en la respuesta inflamatoria local *in vivo*. Además de que el receptor TLR-4 era esencial para la respuesta a los LPS derivados de *Escherichia coli* (una bacteria Gram negativa) y que el TLR-2 es el principal receptor para la respuesta a peptidoglicanos (PGN) derivados de *Staphylococcus aureus* (una bacteria Gram positiva)<sup>27</sup>.

Por otro lado, en estudios realizados en células cebadas derivadas de cepas de ratones C3H/HeJ mutantes en el receptor TLR-4, se demostró que este receptor es esencial para la producción de citocinas inflamatorias como (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-13) en la cavidad peritoneal de ratones. Además, se ha demostrado que después de la activación del receptor se induce la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B como resultado de la estimulación con LPS figura 2<sup>28</sup>.

Otra evidencia proviene de estudios en modelos de peritonitis bacteriana, en donde los ratones deficientes en células cebadas W/W<sup>v</sup>, fueron reconstituidos con CC deficientes en el receptor TLR-4, lo cual mostró un reducido reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección y una mayor mortalidad en comparación con los ratones que fueron reconstituidos con células cebadas normales. Confirmando que el sólo defecto del

receptor TLR-4 en las células cebadas era suficiente para alterar la respuesta ante una infección bacteriana<sup>9</sup>.

Finalmente, otros receptores del tipo Toll que expresan las células cebadas en su superficie son: el receptor TLR-9 que responde a secuencias ricas en nucleótidos de citosina seguidos de guanina (CpG) contenidos en oligodesoxinucleótidos de DNA de virus. Los receptores TLR-7 y TLR-8 que son cruciales para la respuesta a secuencias de hebra sencilla de RNA involucradas en una infección viral<sup>9</sup>. Los receptores TLR-1 y TLR-6 que forman heterodímeros funcionales con el receptor TLR-2, lo que facilita la respuesta a muchos activadores de las células cebadas, incluyendo PGN y lipopéptidos y por último los receptores TLR-3 que median la activación de células cebadas en la piel de fetos. Por lo tanto, la expresión y función de los receptores TLR en células cebadas juega un papel importante en la respuesta inflamatoria ante una infección<sup>29</sup>.

### ***3.3.1 Reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos***

Los receptores TLR-4 tienen tres características: 1) reconocen componentes microbianos conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que son esenciales para su sobrevivencia y que además están altamente conservados evolutivamente. 2) Estos receptores se expresan constitutivamente en el hospedero y detectan a los patógenos sin importar el estado de su ciclo de vida. Finalmente, 3) son codificados germinalmente, se expresan en todas las células de un determinado tipo y son independientes de la memoria inmunológica<sup>30</sup>.

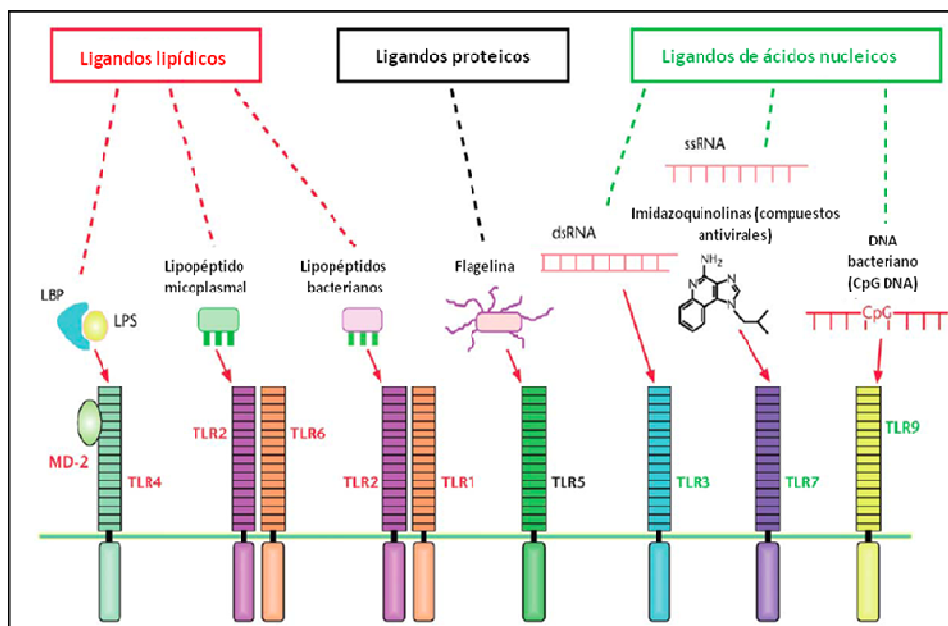
Los TLR como receptores de reconocimiento a patógenos están conservados evolutivamente desde *Caenorhabditis elegans* hasta los mamíferos<sup>10, 30</sup>. Existen 12 miembros de estos receptores identificados hasta el momento en mamíferos<sup>9, 30, 31</sup>.

Tomando como base su secuencia primaria, los TLR pueden ser además divididos en varias subfamilias, cada una puede reconocer PAMPs específicos. Por lo que la subfamilia de



TLR1, TLR2, y TLR6 reconocen lípidos; los receptores TLR7, TLR8 y TLR9 reconocen ácidos nucleicos. Sin embargo, los TLR son promiscuos ya que algunos reconocen a varias estructuras o ligandos que no están estructuralmente relacionados; por ejemplo el TLR4 reconoce una muy divergente colección de estructuras como los LPS, el diterpeno paciltaxel de plantas, la proteína de fusión del virus respiratorio sincial (RSV), fibronectina y proteínas de choque térmico (figura 4)<sup>30</sup>.

Los TLR's 1, 2, 4, 5 y 6 se expresan en la superficie de la célula. Aunque otros como los TLR's 3, 7, 8 y 9 se expresan casi exclusivamente en compartimentos intracelulares como los endosomas y sus ligandos son principalmente ácidos nucleicos, por lo que se requiere de la internalización del endosoma antes de que la señalización sea posible<sup>30, 31</sup>.



**Figura 4.** Se muestran los ligandos de los distintos miembros de la familia de receptores TLR. Modificado de: Kawai T, A.S. TLR signaling. *Nature Cell Death and Differentiation* **13**, 816-825 (2006).

### **3.3.2 Lipopolisácaridos bacterianos**

Algunos de los componentes de la pared celular de las bacterias tales como los lípidos y las lipoproteínas sirven como PAMPs y son la segunda más importante clase de ligandos para los TLR's. Por lo que los LPS de la membrana externa de las bacterias gram negativas son el principal agonista del receptor TLR-4<sup>30, 32</sup>.

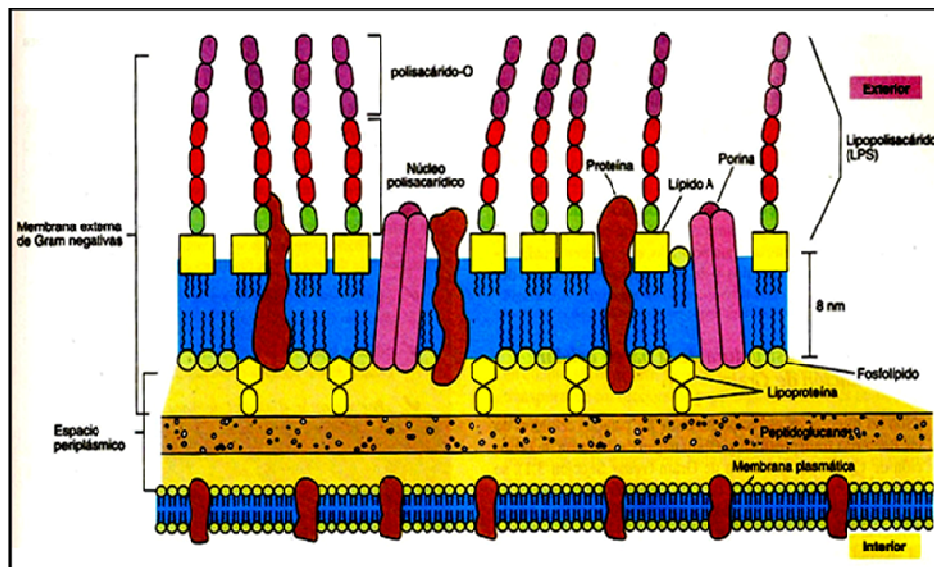
La pared celular de las bacterias Gram negativas cuenta con una capa denominada péptido glicano o mureína, que está formada por dos derivados de azúcares N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico y un pequeño grupo de aminoácidos que incluyen L-alanina, D-alanina, D-glutámico y lisina, o en otros casos ácido diaminopimélico (DAP), además es la responsable de conferir la rigidez. Estos componentes se unen entre sí para formar una estructura que se repite a lo largo de la pared y se denomina tetrapéptido glicano<sup>33</sup>, la cual constituye únicamente el 10% de la pared celular ya que el resto está formada por una capa más compleja de lipopolisácaridos<sup>33</sup>.

La estructura de los lipopolisácaridos puede verse en la figura 5, ésta consta de dos porciones, el núcleo polisacárido y del polisacárido O. El centro del núcleo del polisacárido está compuesto por cetodesoxioctonato (KDO), azúcares de siete carbonos (heptosas), glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina. El polisacárido O está unido al centro o núcleo y consta generalmente de galactosa, glucosa, ramnosa y manosa (todos ellos azúcares de seis carbonos) así como uno o más dideoxiazúcares poco frecuentes como abecucosa, colitosa, paratosa o tivelosa. La repetición de estas secuencias de azúcares da lugar a la formación del polisacárido O<sup>33</sup>.

La parte lipídica del lipopolisácarido conocida como lípido A, no es un glicerolípido, sino por el contrario, la conexión de los ácidos grasos a un disacárido compuesto de N-acetilglucosamina fosfato se hace mediante uniones de éster de amina. El disacárido está unido al núcleo de polisacárido O a través del KDO. Entre los ácidos grasos que se encuentran habitualmente en el lípido A, están el ácido caproico, laúrico, mirístico, palmítico, y esteárico<sup>33</sup>.

Por lo tanto los LPS de *E.coli* consisten de seis cadenas acilo de longitud variable unidas por un enlace a diglucosaminas fosforiladas a su vez enlazadas a la cabeza del grupo (lípidos A) y este se enlaza a una cadena de polisacáridos de longitud y composición variable. La fracción del lípidos A es requerida para activar la vía de señalización del receptor TLR4, en conjunto con el receptor MD2<sup>32</sup>.

Una propiedad biológica de la membrana externa de muchas bacterias Gram negativas, es que resulta habitualmente tóxica para los animales, lo cual se debe principalmente a la capa de lipopolisacáridos, más concretamente al lípidos A. El uso del término endotoxina hace alusión precisamente a este componente tóxico de los LPS<sup>30, 32, 33</sup>.



**Figura 5. Capa de LPS bacteriano.** Disposición del lipopolisacárido, lípidos A, fosfolípidos, porinas y lipoproteínas en bacterias Gram negativas. Tomado de: Madigan T.M., Martinko M. J., Parker J. Brock, *Biology of microorganims*, Edn. 8va. (Spain, PRENTICE HALL,INC, 2001).

### **3.4 Mecanismo de señalización del receptor TLR-4**

El sistema de transducción del receptor TLR-4 puede verse esquematizado en la figura 6. El receptor TLR-4 pertenece a una familia de glicoproteínas integrales de membrana del tipo 1, su región citoplasmática es de aproximadamente 200 aminoácidos, está altamente conservada entre los miembros de esta familia y se le conoce como dominio Toll/IL-1R (TIR). Dentro del dominio TIR las regiones homólogas comprenden tres cajas, las cuales son cruciales para la señalización<sup>21</sup> (figura 6).

Las regiones conservadas de los dominios TIR tienen de cuatro a cinco cadenas de aminoácidos centrales paralelas en conformación  $\beta$ -plegada, rodeadas por cinco  $\alpha$ -hélices de cada lado. Por otra parte, las asas que conectan y unen los elementos de la estructura secundaria son variables, además son regiones divergentes de los dominios TIR que le confieren la especificidad y selectividad al receptor TLR o IL-1R en sus vías de señalización<sup>21</sup>.

En contraste, la región extracelular difiere marcadamente entre los miembros de esta familia. El ectodominio de los TLR tiene de 19 a 25 copias de motivos ricos en repeticiones de Leucina (LRR) en tándem. Cada repetición consiste de 24-29 aminoácidos y contiene secuencias ricas en Leucina XLXXLXX, donde X= cualquier aminoácido. El núcleo de esta estructura secundaria está formado por una secuencia conservada de aminoácidos hidrofóbicos  $X\phi XX\phi X_4FXLX$ , donde  $\phi$  son las repeticiones de un aminoácido hidrofóbico. Además cuentan con una conformación- $\beta$  y una  $\alpha$ -hélice conectadas por asas, de tal forma que este dominio LRR tiene forma de herradura y su superficie cóncava está involucrada directamente en el reconocimiento de patógenos<sup>21</sup> (figura 6).

Para activar la vía de señalización del TLR-4 se requiere de la molécula MD-2 que es una glicoproteína de 160 aminoácidos, la cual interactúa de manera constitutiva con el ectodominio del receptor TLR-4, este complejo se forma en el retículo endoplásmico<sup>21</sup>.

Cuando dos moléculas MD-2 se enlazan directamente a los LPS por medio de su singular dominio de sandwich- $\beta$ , que interacciona con las cadenas acilo del Lípido A de los LPS, se promueve el entrecruzamiento de las dos cadenas del receptor TLR-4, por lo que se dimeriza y ocurre un cambio conformacional que recluta moléculas de señalización río abajo. En este proceso participa de manera inicial el coreceptor CD14 ya que reconoce y facilita la transferencia de los LPS del espacio extracelular al complejo TLR4/MD-2<sup>31, 34</sup> (figura 6).

Después de que la proteína adaptadora MyD88 es reclutada al dominio citoplasmático TIR del receptor TLR-4, esta proteína interacciona con él por medio de su dominio TIR, facilitando la asociación de la cinasa IRAK-4 con el complejo del receptor a través de la interacción de dominios DD de estas dos proteínas<sup>31, 35</sup> (figura 6).

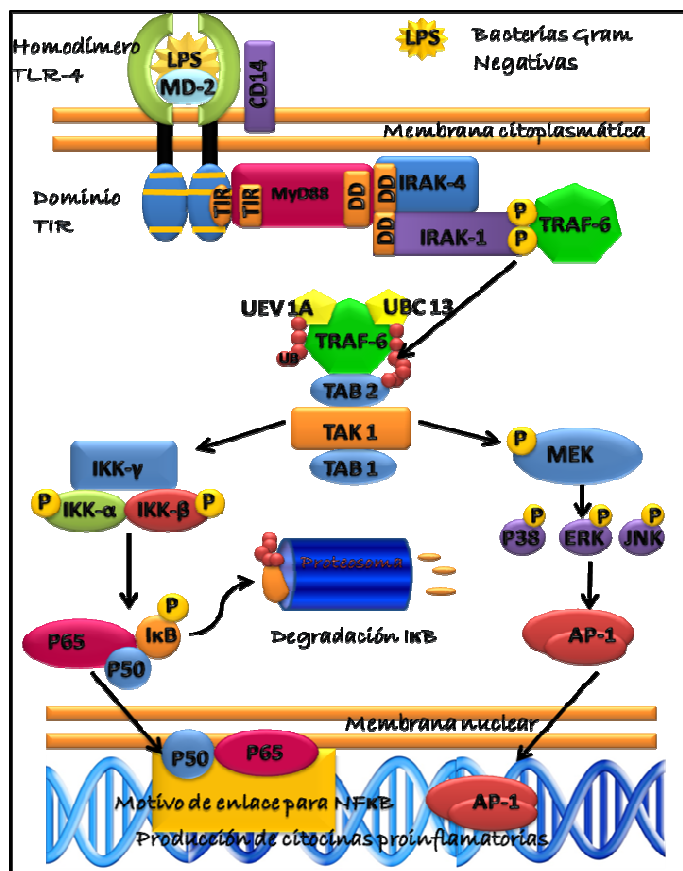
La familia de las IRAK tiene en su extremo amino terminal (N-terminal) un dominio DD y un dominio central de cinasa de treonina/serina. IRAK-1 e IRAK-4 tienen una actividad intrínseca de cinasa, sin embargo IRAK 2 e IRAK M no tienen una actividad de cinasa detectable. Una vez que MyD88 se enlaza a IRAK-4 se facilita la fosforilación de un residuo crucial en el asa de activación de la cinasa de IRAK-1, lo cual induce la actividad de esta cinasa (figura 6)<sup>21, 31</sup>.

Cuando IRAK-1 está activa se autofosforilan residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal, por lo que esta hiperfosforilación de IRAK-1 permite que se reclute la proteína TRAF6. Finalmente, el complejo IRAK-1 y TRAF6 se disocia del receptor e interacciona en la membrana plasmática con otro complejo preformado, el cual consiste de TAK1, TAB1 y TAB2 o TAB3, las cuales se translocan junto con TRAF6 y TAB1 al citoplasma (figura 6)<sup>21, 31</sup>.

TRAF6 consta de una familia de proteínas adaptadoras con seis miembros que se caracterizan por la presencia de un dominio N-terminal enrollada en espiral (conocida como TRAF-N) y un dominio carboxilo terminal (C-terminal) altamente conservado conocido como TRAF-C. La porción N-terminal de la mayoría de las proteínas TRAF contiene una región RING, la cual es fundamental para eventos de señalización río abajo.

Por otra parte el dominio TRAF-C es necesario para la asociación e interacción con el receptor y moléculas río arriba<sup>21</sup>.

Una vez que el complejo IRAK-1/TRAF6/TAK1/TAB1/TAB2 se sitúa en el citoplasma, el dominio N-terminal RING de TRAF6 forma un complejo con las proteínas ligasas de ubiquitina UBC13 e UEV1A, que promueven la síntesis de cadenas de poliubiquitina la lisina 63 de varias proteínas blanco incluyendo a TRAF6<sup>21,31</sup>.



**Figura 6. Sistema de transducción de señales del receptor TLR-4.** El dímero de la proteína MD-2 interacciona con los LPS de la bacterias Gram (-), lo cual facilita la interacción de los LPS con el homodímero del receptor TLR-4. A continuación, río abajo, la proteína adaptadora MyD88 es reclutada al receptor TLR-4, la interacción se encuentra mediada por medio de sus dominios TIR. La proteína MyD88, a su vez, interacciona con las cinasas IRAK-4 e IRAK-1 a través de sus dominios DD/DD, esta interacción promueve la activación de IRAK-4 y la subsecuente fosforilación de IRAK-1 por IRAK-4. La fosforilación de IRAK-1 recluta a la proteína TRAF-6 al complejo del receptor. La interacción de las proteínas anteriores promueve la translocación de TRAF-6 al citoplasma, en donde a su vez interacciona con las proteínas ubiquitina ligasas UEV1A y UBC13, las cuales sintetizan cadenas de ubiquitina en el residuo de lisina 63 de la proteína TRAF-6. Finalmente, en el citoplasma TRAF-6 activa a la proteína TAK1, en este punto hay una bifurcación de la vía de señalización, ya que esta cinasa por una parte activa al complejo IKK-α e IKK-β, esta última, fosforila al secuestrador citoplásmico IκB, promoviendo la translocación de P65 al núcleo. Por otra parte, la fosforilación de TAK1 activa a la vía de las MAPK, permitiendo de esta forma que el factor de transcripción AP-1 se transloque al núcleo. Ambas vías culminan en la producción de citoquinas proinflamatorias.

A su vez, TRAF6 de manera dependiente de la ubiquitinación, activa a TAK1, un miembro de la familia de las MAKKK, esta proteína forma un complejo con TAB1, TAB2 o TAB3. La proteína TAB1 funciona como un activador de TAK1, en contraste, la proteína TAB2 es un adaptador del enlace entre TAK1 y TRAF6. Además las proteínas TAB2 y TAB3 funcionan de manera similar, ya que se enlazan a cadenas de poliubiquitina a través de dominios tipo dedos de zinc, por lo tanto todas estas interacciones son necesarias para la activación de TAK1<sup>21, 31</sup> (figura 6).

Después de que TAK1 es activada en el citoplasma, esta proteína a su vez lleva a la activación del complejo IKK formado por las proteínas cinasas IKK- $\alpha$  e IKK- $\beta$  y una subunidad reguladora (IKK- $\gamma$ ), las cuales fosforilan a I $\kappa$ B en residuos de serina para su ubiquitinación y degradación en el proteosoma 26, lo cual es un proceso seguido de la liberación de NF $\kappa$ B al núcleo y del enlace al sitio I $\kappa$ B específico en el DNA<sup>31, 35</sup>.

NF $\kappa$ B es un factor de transcripción dimérico que pertenece a la familia de proteínas de homología-Rel, los cuales se incluyen p65/RelA, p50/NF $\kappa$ B2, RelB y cRel. NF $\kappa$ B es un heterodímero compuesto por las subunidades p65 y p50 en la mayoría de los tipos celulares. En células no estimuladas, NF $\kappa$ B se encuentra secuestrado en el citoplasma en su forma inactiva, a través de la interacción con el inhibidor I $\kappa$ B<sup>31</sup>.

Por otra parte, la activación de TAK1 también resulta en la activación de las MAPK, incluyendo la cinasa del extremo N-terminal de JUN (JNK)<sup>21</sup>. La Activación del factor de transcripción AP-1 está mediada principalmente por las MAPK, tales como JNK, p38 y ERK. Este proceso lo lleva a cabo TAK 1 a través de la fosforilación de dos miembros de las MAPKK, MKK3 y MKK6, las cuales subsecuentemente activan a ERK, JNK y p38, a través de la activación de MEK1, MEK2 (figura 6)<sup>31</sup>.

Entre la familia de proteínas AP1, se piensa que c-Jun juega un papel muy importante en la respuesta inflamatoria. AP1 tiene una región dimerica básica de zipper de leucina (bZIP),

compuesta por la proteína activada por JUN y c-Fos y la sub-familia Maf, la cual se enlaza a elementos de respuesta a TPA o a elementos de respuesta al AMP cíclico (AMPC)<sup>31</sup>.

### **3.5 El papel de la cinasa de tirosina Lyn en la activación de las células cebadas**

La cinasa Lyn pertenece a la familia de las cinasas Src, ya que comparte con los otros miembros de esta familia dominios altamente conservados, los cuales son: un dominio consecutivo SH3, uno SH2 que reconoce residuos de tirosina fosforilados, y un dominio de tirosina cinasa SH1, el cual requiere ser fosforilado en un residuo de Tyr del segmento terminal para su completa actividad catalítica. El extremo N-terminal es una secuencia miristilada y está involucrada en la asociación de Lyn con la membrana citoplasmática. El extremo C-terminal tiene una tirosina (527) altamente conservada entre los miembros de esta familia, la cual es muy importante en la regulación de su actividad<sup>36</sup> (figura 7).

En las células cebadas, se ha establecido que la cinasa Lyn juega un papel muy importante en la regulación de varios procesos celulares, tales como: la proliferación celular, desgranulación inducida por antígeno y en la producción de citocinas. La evidencia que apoya lo anterior fue generada a partir de estudios de la participación de la cinasa Lyn en el sistema de transducción de señales del receptor de alta afinidad para la IgE, el FcεRI, el cual es el más importante receptor que expresan las células cebadas<sup>37</sup>.

La interacción del receptor FcεRI se realiza por medio del dominio SH2 de la cinasa Lyn y la asociación incrementa la activación del receptor. La activación del receptor incluye eventos de agregación de varios receptores FcεRI, en microdominios denominados dominios lipídicos, llevando a la activación preferencial de la cinasa Lyn, lo cual es suficiente para promover el estado fosforilado del receptor, permitiendo el ensamble de la maquinaria necesaria para transducir la señal que lleva a la desgranulación de las CC<sup>37</sup>.

En este proceso, la cinasa Lyn, junto con Syk median la fosforilación de la molécula adaptadora de unión para la activación de células T (LAT), la cual es crucial para la



coordinación de las vías de señalización río abajo, que son requeridas para la liberación de varios mediadores proinflamatorios<sup>26</sup>.

Por lo tanto, la cinasa Lyn desempeña un papel muy importante en la transducción de señales activadoras de las células cebadas, sin embargo aún no se esclarece si la cinasa Lyn desempeña un papel importante en la activación de receptores de la inmunidad innata<sup>37</sup>.

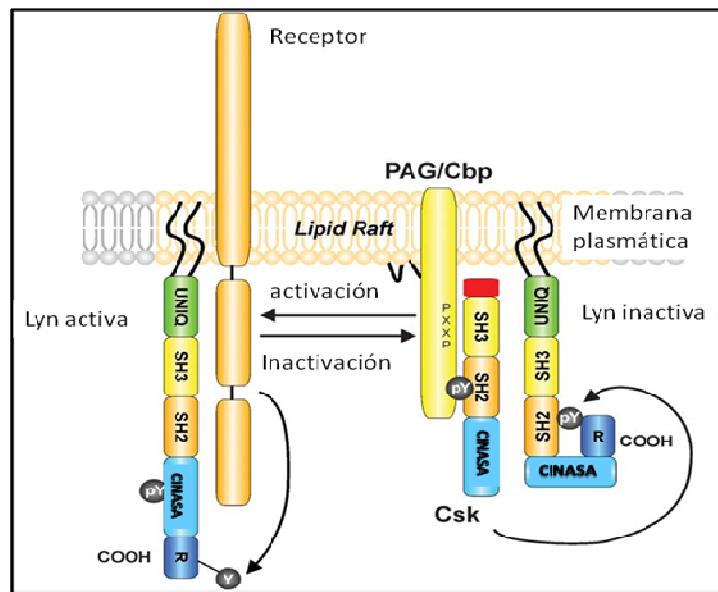
### **5.1 Evidencias de la participación de la cinasa de tirosina Lyn en el sistema de transducción de señales del receptor TLR-4.**

El sistema de transducción de señales del receptor TLR-4 se ha estudiado principalmente en macrófagos y linfocitos, caracterizando primordialmente la participación de cinasas de serina/treonina tales como IRAK 1, 4, y las MAPK<sup>21, 31</sup>. Sin embargo, estudios realizados en monocitos humanos derivados de sangre periférica, macrófagos y en linfocitos B, se ha observado evidencia de la posible participación de cinasas de tirosina de la familia de Src, tales como p53/56 Lyn, p58 Hck y p59 Fgr, en este sistema de transducción de señales<sup>38, 39</sup>.

En un estudio realizado en leucocitos estimulados con LPS, se observó en un ensayo de coinmunoprecipitación que las moléculas CD59, CD55, CD48, CD24 y CD14, que están ancladas a la membrana en regiones de glicofosfatidilinositol (GPI), se encuentran asociadas con proteínas cinasas de la familia Src<sup>34, 38</sup>. Además, en otros trabajos realizados en linfocitos humanos y murinos estimulados con LPS, se encontró que se induce la fosforilación de residuos de tirosina de la proteína p56 Lck, un miembro de la familia de Src<sup>38, 40</sup>.

En un trabajo realizado en monocitos periféricos sanguíneos humanos, se observó que la cinasa Lyn p56/53 se activa en respuesta a los LPS, ya que se observa la fosforilación en

residuos de tirosina de la misma, a partir del primer minuto de estimulación, incrementándose a los 30 minutos<sup>33</sup>. Además, cuando se analizaron los complejos inmunoprecipitados de CD14/Lyn, revelaron que los LPS inducen un incremento en la actividad específica de asociación de la cinasa Lyn a CD14, así como un incremento en la fosforilación de residuos de tirosina de Lyn<sup>38</sup>.



**Figura 7.** Se muestran los dominios que forman parte de la cinasa Lyn, así como sus estados de activación e inactivación. Lyn se localiza en los dominios lipídicos miristilados y palmitilados de la membrana plasmática (ilustrado por el color claro de la membrana). Lyn se mantiene en un estado inactivo a través de la fosforilación de un residuo de tirosina en el dominio regulatorio (R) del extremo carboxilo terminal, mediado por las enzimas Csk. Csk asimismo es regulado por la localización de la membrana a través de la interacción con PAG/Cbp. La fosforilación de la tirosina del carboxilo terminal mantiene a la enzima en una conformación cerrada, a través de una interacción con el dominio SH2. Lyn puede ser activada por desfosforilación en la tirosina reguladora del C-terminal por el receptor CD45. CD45 se muestra en el dominio lipídico actuando en la desfosforilación en la tirosina Y508. (Ashwell and D’Oro, 1999). Modificado de: Yuekang Xu, K.W.H., Nicholas D. Huntington, Margaret L. Hibbs, and David M. Tarlinton. Lyn Tyrosine Kinase: Accentuating the Positive and the Negative. *Immunity* 22, 9-18 (2005).

También, se encontró que Lyn participa en la regulación de la activación de los monocitos vía CD14, lo que induce la producción de citocinas tales como el TNF- $\alpha$  y la IL-1. Para ello los monocitos fueron incubados con herbimicina A, un inhibidor de proteínas cinasas de tirosina de la familia de Src, antes de que fueran tratadas con LPS. Como resultado obtuvieron el bloqueo de la fosforilación de tirosina inducida por el estímulo de LPS, además de la completa inhibición de la modulación río abajo de CD14. Estas

observaciones demostraron que hay una intervención de la cinasa Lyn en el mecanismo de acción de CD14 ante el estímulo de LPS en monocitos<sup>38</sup>.

Para comprobar si Lyn regulaba otras funciones de este sistema de transducción, se midió en el sobrenadante el nivel de las citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 de monocitos que fueron tratados con herbicina A y estimulados con LPS. La inhibición de Lyn y otras cinasas de tirosina bloqueó completamente la secreción de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$ . Por lo que estos resultados demostraron una asociación entre CD14 y la cinasa Lyn en la liberación de algunas citocinas en monocitos sanguíneos inducida por un estímulo con LPS. Estos fueron unos de los primeros datos que demostraron la comunicación entre un receptor anclado a GPI y una cinasa intracelular de la familia de Src, sosteniendo el papel crucial de una cinasa de tirosina en la respuesta pleiotropica de monocitos a endotoxinas<sup>38</sup>.

En otro estudio realizado en 1996 por Herrera-Velit et. al. se observó que los LPS median la activación de la PI3-cinasa (PI3-K), ya que la incubación de los monocitos con esta toxina bacteriana hizo que se activara rápidamente la PI3K y se incrementara el metabolito producido por la misma, PtdIns 3,4,5 *in vitro*<sup>39</sup>.

Por otra parte, también se demostró que la activación de esta cinasa era dependiente del coreceptor CD14, ya que un pretratamiento por treinta minutos con un anticuerpo anti-CD14 bloquea totalmente la producción de PtdIns 3,4,5 ante el estímulo con LPS. Además, algo interesante fue que en esta señal estaba involucrada la cinasa Lyn, ya que al inmunoprecipitarla a partir de lisados celulares de monocitos y examinar su asociación con la actividad de la PI3K, se observó que se incrementaba la interacción entre estas dos proteínas y esta interacción era más abundante justo en el momento en que la cinasa Lyn se encontraba en su punto de máxima actividad, a los 10 minutos<sup>39</sup>.

Finalmente, en otros estudios realizados en macrófagos de origen murino RAW 264.7 tratados *in vitro* con PP1, un inhibidor de la familia de Src, se observó que tenían una

deficiencia en la producción de TNF y en la activación de iNOS, ante un estímulo con LPS, por lo que en esta investigación demostraron que la activación de cinasas de tirosina es esencial para la activación de macrófagos en la producción de mediadores proinflamatorios<sup>41</sup>.

#### **4. Objetivo general**

Investigar el papel que tiene la cinasa Lyn en el sistema de transducción de señales del receptor TLR-4, en células cebadas.

#### **Objetivos particulares**

- a) Realizar cultivos primarios derivados de médula ósea provenientes tanto de ratones Wt y Lyn<sup>-/-</sup>.
- b) Comparar la desgranulación de células cebadas Wt y Lyn<sup>-/-</sup> estimuladas con LPS, un ligando para el receptor TLR-4.
- c) Observar la secreción de TNF- $\alpha$  en CC estimuladas con LPS a partir de ELISA.
- d) Analizar el RNAm de la citocina TNF- $\alpha$  en células cebadas Wt y Lyn<sup>-/-</sup> estimuladas con LPS, por medio de RT-PCR.
- e) Analizar la fosforilación de distintas proteínas obtenidas de extractos celulares de las células Wt y Lyn<sup>-/-</sup> estimuladas con de LPS, por medio de Western Blot.
- f) Analizar la translocación nuclear de la subunidad P65 en extractos nucleares de CC estimuladas con LPS por medio de un ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA).

#### **5. Hipótesis**

Si la cinasa Lyn participa en el sistema de transducción de señales del receptor TLR-4 en célula cebadas, entonces las células cebadas derivadas de ratones Lyn<sup>-/-</sup> tendrán una respuesta deficiente a la estimulación con LPS.

#### **6. Justificación**

Estudiar la participación de la cinasa Lyn en el sistema de transducción de señales del receptor TLR-4, es muy importante, ya que aún no se ha caracterizado en su totalidad esta vía en las células cebadas.

El presente estudio les sirve también a los interesados en la evolución del sistema inmune, ya que al caracterizar el papel que juega la cinasa Lyn en el sistema de transducción del receptor TLR-4, en las células cebadas de mamíferos, permitirá brindar nuevos elementos a la inmunología comparada, para proveer información sobre la diversificación y similitudes de la vía canónica de los receptores TLR y de la inmunidad innata en vertebrados, específicamente en mamíferos.

En este trabajo se utilizará un nuevo modelo celular para obtener la información del papel que juega la cinasa Lyn en este sistema de transducción, ya que en estudios previos en los que se observó evidencia indirecta de la participación de PTKs en la vía del TLR-4, se utilizaron distintos inhibidores de las PTKs en líneas celulares de monocitos, macrófagos y leucocitos, estimulados con LPS. Sin embargo, para este estudio se emplearon cultivos primarios de CC derivadas de ratones mutantes deficientes de la cinasa Lyn.

Además nuestra investigación es de utilidad en otras áreas del conocimiento como la farmacobiología, ya que este estudio permitirá explicar y entender mejor el proceso de la respuesta inflamatoria, en la cual las células cebadas son muy importantes. Esta investigación contribuirá a visualizar proteínas blanco para la elaboración de nuevos fármacos que regulen esta respuesta.

## **7. Alcances**

El propósito de este trabajo es investigar y comparar distintos puntos de la vía de transducción del receptor TLR-4 en células cebadas Lyn<sup>-/-</sup> y Wt estimuladas con LPS, para de esta manera generar evidencia *in vitro* sobre la participación de la cinasa Lyn en esta vía de señalización, definiéndola de esta manera como una proteína importante para el desarrollo de la respuesta inmune innata.

## **8. Metodología**

### **8.1 Ratones**

Se utilizó la cepa de ratones 129S1/SvImJ silvestres de Jackson Laboratories (Wild type, Wt) No. stock: 002448 y mutantes deficientes en la cinasa Lyn (Lyn knockout, Lyn<sup>-/-</sup>) Numero de Stock: 003204). Los animales fueron mantenidos y se usaron de acuerdo al protocolo aprobado por la Comisión Institucional para el uso y cuidados de animales de Laboratorio (CICUAL; No. de protocolo 383-07).

### **8.2 Extracción de DNA cromosomal a partir de biopsias de los ratones 129Sv/SvImJ.**

En el momento del destete se obtuvo en condiciones asépticas un centímetro terminal de la cola del ratón, utilizando unas tijeras de disección estériles. Este se colocó en tubos de 1.5 ml con tapa de rosca. Posteriormente para digerir este tejido, se agregó a cada muestra 1ml de amortiguador Tris-Cl, EDTA, NaCl, SDS, TE pH 8 (SNET; ver anexo1) adicionado con 10µl de proteasa K 20 mg/ml (SIGMA cat. P2308), la mezcla se incubó en baño maría, en agitación a 57°C durante toda la noche. Al día siguiente cada muestra se agitó en el vortex y se tomaron 500µl de cada digestión, los cuales se transfirieron a tubos nuevos y se les adicionó 500µl de fenol: cloroformo: alcohol isoámilico 25 : 24 : 1 en 10mM de Tris (SIGMA, cat.P3803), esta mezcla se agitó en el vortex durante 3 segundos y fue centrifugada a 200 X g durante 15 minutos. En seguida, se tomaron 400µl de la fase acuosa, los cuales se transfirieron a un tubo nuevo, a continuación se les agregó 400µl de isopropanol frío y se agitó vigorosamente, esta mezcla fue incubada durante 15 minutos en hielo seco, una vez transcurrido el tiempo se centrifugo á 200 X g durante 10 minutos. Cuando se obtuvo la pastilla de DNA se lavó con 1 ml de etanol frío al 70% y nuevamente se incubó en hielo seco durante 5 minutos; después se centrifugó por última vez a 21500 X g durante 5 minutos. La pastilla celular fue resuspendida en 50µl de agua estéril

tratada con DEPC (AMBION, cat. AM9920). Las muestras de DNA se guardaron a -20°C si iban a ser utilizadas de inmediato o a -80° si iban a utilizarse al día siguiente.

### ***8.3 Establecimiento de genotipos de los ratones 129Sv/SvlmJ por PCR***

Las muestras de DNA obtenidas en la sección anterior, fueron calentadas en baño maría a 65°C durante 15 minutos, de acuerdo al protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizaron de  $1 \times 10^{-9}$ g a  $2.5 \times 10^{-9}$ g de DNA geonómico, más una mezcla del conjunto de reactivos para PCR de CLONTECH (cat. 639120), ver anexo 1. Además, a la mezcla también se le agregaron 20µM de los cebadores para el gen de la cinasa Lyn y para el gen de resistencia a la Neomicina (tabla 3). La amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 94°C 3 minutos, 94°C 30 segundos, 58°C 1 minuto, 72°C 1 minuto, 72°C 2 minutos y finalmente 10°C hasta retirar del termociclador. Estas condiciones fueron programadas en el termociclador Mastercycler Gradient de Eppendorf®. Finalmente a cada muestra se le agregaron 2µl de amortiguador de carga para DNA 6X y se corrieron en un gel de agarosa (Invitrogen, cat. 15510019) al 2.5% a 110 V con el amortiguador de corrida Tris-Borato-EDTA 1X (TBE 1X) durante 2 horas 30 minutos (ver anexo 1). Al finalizar la electroforesis el gel se tiñó con bromuro de etidio (Mercury, cat. 5450) por 20 minutos y se observó en el transluminador de luz UV EpiChemiDarkroom. Si el producto de la reacción se observaba en 340pb, correspondía a la amplificación del gen de la cinasa Lyn y por lo tanto los ratones tenían un genotipo silvestre. Si el ratón era deficiente en la cinasa Lyn el producto se observaba en 280pb, lo cual corresponde a la amplificación del gen de resistencia a Neomicina, (ya que en estos ratones se insertó una secuencia que codifica para la proteína que produce resistencia a la neomicina para interrumpir el gene de la cinasa Lyn). Finalmente si el ratón era heterocigoto se observaban ambos productos de la reacción (ver anexo 1).



Tabla 3. Cebadores para el establecimiento de genotipos			
Gen	Cebador	Secuencia	Tamaño esperado
Lyn	Sentido	5' CAT AGC CTG AGT TAG TTC CCT AGC-3'	340pb
	Antisentido	5'TCA CAT ATG AAC ATG TGT GTA CAT GTC-3'	
Resistencia a Neomicina	Sentido	5'CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC-3'	280 pb
	Antisentido	5'AGG TGA GAT GAT GAC AGG AGA TC 3'	

#### 8.4 Cultivos primarios de células cebadas

Se realizaron cultivos primarios de células cebadas murinas derivadas de médula ósea, provenientes de ratones con genotipo Wt y Lyn<sup>-/-</sup>. Para ello la médula ósea obtenida del fémur de un ratón se cultivó en medio RPMI-1640 (SIGMA, cat. R4130-1L) complementado con L-glutamina (SIGMA, cat. R4130), con 10% de suero fetal bovino (FBS; GIBCO, BRL cat. 261400779) e IL-3 de origen murino (Preprotech, cat. 213-13X), para que fueran diferenciadas a células cebadas (ver anexo 1). Los cultivos fueron alimentados semanalmente y mantenidos en una incubadora BINDER<sup>®</sup> a 37°C con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Cuando los cultivos cumplieron el mes de edad, las células fueron empleadas para realizar diversos experimentos.

#### 8.5 Ensayo de desgranulación

En general se usaron 2X10<sup>6</sup> células en el ensayo por tratamiento en un mililitro de amortiguador Tyrode's-BSA (ver anexo 1) durante estimulación. Las células fueron sensibilizadas con 3X10<sup>-9</sup>g de IgE por millón de células a 37°C durante 1 hora. A continuación las células fueron estimuladas durante una hora a 37°C con distintas concentraciones del antígeno dinitrofenol-suero humano de albúmina (DNP-HSA; SIGMA cat. A6661). Por otra parte se estimularon 2X10<sup>6</sup> células por tratamiento con distintas concentraciones de LPS del serotipo *E.coli* 026:B6 (SIGMA, cat. L8274) y con distintas

concentraciones de A23187 adicionado con forbol miristato acetato (PMA), durante una hora. Una vez transcurrido el tiempo de estimulación se centrifugaron a 21500 X g durante 15 minutos a 4°C, después se retiró el sobrenadante y se guardó en el REVCO a -80° C, se realizó lo mismo con las pastillas celulares. Al día siguiente se determinó el porcentaje de liberación de la enzima  $\beta$ -hexosaminidasa; para ello se tomaron 250  $\mu$ l del sobrenadante de cada muestra y se colocaron en un pozo de una placa para ELISA, además también se le agregó a cada pozo 30  $\mu$ l de p-NAG (ver anexo 1). Posteriormente la mezcla anterior se incubó durante una hora a 37°C y finalmente la reacción fue detenida con 120 $\mu$ l del amortiguador NaCO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>. Por último, se midió la reacción en el lector para ELISA SUNRISE® a 405nm. Los valores se graficaron como porcentaje de liberación de la enzima de la  $\beta$ -hexosaminidasa y fueron estandarizados de acuerdo con el valor del basal.

### **8.6 ELISA TNF- $\alpha$**

Para determinar la secreción de la citocina TNF- $\alpha$  se utilizaron 1.8X10<sup>6</sup> células Wt y Lyn<sup>-/-</sup>, las cuales fueron estimuladas con distintas concentraciones de LPS y con 9X10<sup>-9</sup>g/ml de antígeno (DNP-HSA) como control positivo. Las células fueron incubadas durante 12 horas a 37°C. Posteriormente al transcurrir este tiempo de estimulación se centrifugaron a 19000 X g y se recolectó el sobrenadante. Finalmente se determinó la concentración de esta citocina de acuerdo a las instrucciones del conjunto de reactivos para ELISA.

### **8.7 Purificación de RNA**

Para la extracción de RNA se utilizaron las pastillas celulares obtenidas en la estimulación celular con DNP-HSA (SIGMA, cat. A6661) y con distintas concentraciones de LPS del serotipo *E.coli* 026:B6 (SIGMA, cat. L8274), del ensayo de desgranulación. El botón celular se homogenizó con 1ml del reactivo TRI-Reagent (SIGMA, cat. T9424) pipeteando vigorosamente durante 5 minutos. Posteriormente el homegenizado se transfirió a un tubo nuevo con tapa de rosca y se le añadieron 200 $\mu$ l de cloroformo, los cuales se

mezclaron en el vortex. Después se permitió que se separaran las fases durante 15 minutos a temperatura ambiente, una vez que transcurrió el tiempo las muestras fueron centrifugadas a 19000 X g a 4°C durante 15 minutos. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo estéril, se les añadieron 3µl de Glucógeno (SIGMA cat. 9510), se mezclaron en el vortex y en seguida se agregaron 500µl de isopropanol frío (SIGMA, cat. I9516), a continuación se permitió que la mezcla se precipitara durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo las muestras fueron centrifugadas a 19000 X g 10 minutos a 4°C y se les retiró el sobrenadante. A continuación, el botón de RNA se lavó con 1ml de etanol (J.T. Baker, cat 9014-02) al 75% frío y nuevamente fueron centrifugadas bajo las mismas condiciones. Por último se dejó que el botón de RNA se secase a temperatura ambiente aproximadamente 10 minutos y se resuspendió en una solución de mantenimiento para RNA (AMBION cat. AM7010). Para calcular la concentración de RNA total por muestra y tomar la misma cantidad de RNA en cada tubo; por lo que se tomaron 2µl por punto los cuales se diluyeron en 98µl de agua estéril y por último se cuantificó la cantidad de µg/µl de RNA en el espectrofotómetro de Eppendorf biophotometer® con una densidad óptica de 260 nm, esto se hizo con el objeto de tomar la misma cantidad de RNA total en los experimentos siguientes. Finalmente las muestras se almacenaron a -80°C en el REVCO hasta su uso.

### ***8.8 Ensayo de retrotranscripción (RT)***

Para la síntesis de cDNA se utilizó el RNA total obtenido anteriormente de los botones celulares, para esto se tomaron 5µg/µl de RNA total, los cuales se agregaron a tubos estériles de 1.5ml con tapa de rosca, además se les adicionaron 2µl de una mezcla del equipo de reactivos Life Technologies SuperScript first-strand syntesis system de Invitrogen (cat. 11904018). Posteriormente las muestras fueron incubadas a 65°C durante 5 minutos, una vez transcurrido el tiempo estas fueron colocadas durante 1 minuto en hielo. A continuación se procedió a terminar la reacción para ello se preparó otra mezcla de acuerdo con las instrucciones de empleo de los reactivos. A cada una de las muestras se les agregaron 9µl de la mezcla anterior y se incubaron durante 2 minutos a 42°C. Después se les agregó 1µl SuperScript II RT a cada tubo y fueron incubadas a 42°C

durante 50 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se colocaron las muestras en baño maría a 70°C durante 15 minutos y enseguida se colocaron en hielo. Por último, las muestras fueron colectadas por centrifugación y se les agregó 1µl de RNasa H de Invitrogen (cat. 18021071) con la cual fueron incubadas durante 20 minutos a 37°C. Finalmente las muestras fueron guardadas a -80°C hasta su uso.

### **8.9 PCR de citocinas**

Para la realización de la PCR se añadieron 2µl del cDNA obtenido anteriormente de cada una de las muestras de RNA total, en seguida se le añadieron 9µl de la mezcla de reactivos para PCR de SIGMA más 1µl de cada uno de los cebadores sentido y antisentido de TNF-α. Se mezcló vigorosamente y fueron colectadas por centrifugación. Por último se colocaron en el termociclador y se amplificaron utilizando el programa de citocinas (ver Anexo 1). Las muestras amplificadas fueron corridas en un gel de agarosa al 2.5 % a 110V con amortiguador de corrida TBE 1X durante 2 horas y treinta minutos. Posteriormente se tiñó el gel con bromuro de etidio para ser visualizado en el transluminador UV EpiChemiDarkroom.

### **8.10 Extracción de proteínas**

5X10<sup>6</sup> células cebadas Wt y Lyn<sup>-/-</sup> por tratamiento fueron estimuladas con 1µg/ml de LPS del serotipo O26:B6 de *E.coli* (SIGMA, cat. L8274), en un curso temporal 30 minutos. Por otra parte se estimularon 5X10<sup>6</sup> células con 100mM de A23187 adicionado con 1µM de forbol miristato acetato (PMA) durante 15 minutos. Una vez terminada la estimulación celular, las muestras fueron centrifugadas a 860 X g durante 4 minutos a temperatura ambiente. Enseguida se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 250µl del amortiguador Tyroides/BSA (ver anexo 1). A continuación las células fueron lisadas agregando 250µl del amortiguador de lisis Laemmli 2X (SIGMA, cat S3401). Finalmente, las muestras fueron agitadas en el vortex y colocadas a ebullición durante 3

minutos, se repitió este proceso tres veces. Las muestras fueron guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **8.11 Western Blot**

Las proteínas totales obtenidas de los lisados celulares, fueron separadas por medio de una electroforesis de proteínas en un gel de poliacrilamida al 10% con dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE), de acuerdo al protocolo de Invitrogen (ver anexo 1). Las muestras fueron corridas a 50mA en un amortiguador de TRIS-Glicina-SDS con un pH 8.3 (ver anexo 1) durante 2 horas 30 minutos. Una vez que finalizó la electroforesis se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF (PerkinElmer, Polyscreen, cat. NEF1002001PK). El sándwich de transferencia se realizó de acuerdo al protocolo de Invitrogen y se empleó un amortiguador TRIS-Glicina-Metanol con un pH 8.3 frío (ver anexo 1). Este proceso se realizó a 25V con 200mA de corriente durante 2 horas 40 minutos en frío. Al finalizar la transferencia se bloqueó la membrana de PVDF con leche descremada al 10% (Svelty de Nestlé) durante 1 h. Al finalizar el paso anterior se analizó la fosforilación de distintas proteínas utilizando los anticuerpos primarios enlistados en la tabla 4. Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  en agitación. Al día siguiente la membrana de PVDF se lavó tres veces durante 15 minutos con 20ml del amortiguador TBS-T 1X (ver anexo 1). A continuación se incubó la membrana con el anticuerpo secundario acoplado a HRP durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron nuevamente las membranas con 20 ml de TBS-T 1X durante 15 minutos cuatro veces y se procedió a la detección de la proteína por medio de las soluciones para la reacción de quimioluminiscencia BM Chemiluminiscense Western Blotting Mouse/ Rabbit de ROCHE (cat.11520709001). Finalmente las membranas fueron expuestas a placas de rayos X de KODAK de 1 a 15 minutos.

**Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados para en el Western blot.**

<b>Proteína</b>	<b>Casa comercial y No. de catalogo del anticuerpo</b>	<b>Epítotope que reconoce</b>
<b>p-p38</b>	<b>Cell Signaling Cat. 9211S</b>	<b>Thr 180/Tyr 182 fosforiladas</b>
<b>p-ERK</b>	<b>Santa Cruz biotechnology Cat. Sc-101761</b>	<b>Tyr 204 fosforilada</b>
<b>p-JNK</b>	<b>Santa Cruz biotechnology Cat. Sc-6254</b>	<b>Thr 183/ Tyr 185 fosforiladas</b>
<b>p-IKKα/β</b>	<b>Santa Cruz biotechnology Cat. Sc-23470</b>	<b>Ser 180 Ser 181 fosforilada</b>
<b>p-IκB</b>	<b>Santa Cruz biotechnology Cat. sc- 8404</b>	<b>Ser 32 fosforilada</b>
<b>p38 Total</b>	<b>Santa Cruz biotechnology Cat.sc-5335</b>	<b>C-terminal de P38 sin fosforilar</b>
<b>ERK Total</b>	<b>Santa Cruz biotechnology Cat. sc-154</b>	<b>C-terminal de ERK sin fosforilar</b>
<b>Lyn</b>	<b>Santa Cruz biotechnology Cat. Sc-15</b>	<b>N-Terminal sin fosforilar</b>

### **8.12 Extracción de núcleos**

Se realizó un curso temporal de 15, 30 y 60 minutos con  $1 \times 10^7$  de células cebadas Wt y Lyn<sup>-/-</sup> por tratamiento, estas fueron estimuladas con  $1 \mu\text{g/ml}$  de LPS del serotipo 026:B6 de *E.coli*. Aparte,  $1 \times 10^7$  células Wt y Lyn<sup>-/-</sup> sencibilizadas con IgE fueron estimuladas con DNP-HSA como control positivo. Una vez transcurrido el tiempo de estimulación se centrifugaron las muestras a 380 X g durante 10 minutos a 4°C. En seguida, el botón celular fue resuspendido en 5ml de amortiguador PBS/PIB 1X estéril y frío (ver anexo 1). Nuevamente las muestras fueron centrifugadas a 380 X g durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente se decantaron las muestras y fueron resuspendidas en 1ml de amortiguador HB helado para luego ser transferidas a tubos de 1.5ml con tapa de rosca

fríos. Las muestras se colocaron en hielo durante 15 a 20 minutos, lo cual permitió que las células sufrieran hemolisis. A continuación se añadieron 50µl de Igepal (SIGMA, cat.043K0654) al 10% y las muestras fueron pipeteadas moderadamente. Después el homogenado se centrifugó por un minuto a 9500 X g a 4°C y se decantó. Posteriormente se resuspendió el botón nuclear en 50µl del amortiguador completo de lisis del conjunto de reactivos de TransAM (cat.40296) y esta mezcla se colocó en agitación a 4°C sobre un agitador de plataforma durante 35 minutos. Por último las muestras fueron centrifugadas a 190 rcf X g durante 10 minutos a 4°C y se tomaron los 50µl del sobrenadante (extracto nuclear), el cual fue transferido a tubos Ependorf fríos para PCR. Finalmente las muestras se guardaron a – 80°C hasta su uso.

### **8.13 Ensayo de Retardamiento de la Movilidad Electroforética (EMSA)**

A continuación, se cuantificó la concentración de proteínas en los extractos nucleares utilizando un conjunto de reactivos de Bio-Rad (cat. 500-0007). Cantidades equivalentes de proteínas se llevaron a un volumen de 5µl de los extractos nucleares, obtenidos en la sección anterior, los cuales se incubaron en presencia del oligo NFκB marcado con biotina, de acuerdo a las instrucciones de empleo de los reactivos de Light Shift EMSA (PIERCE, cat. 20148X) ver anexo 1. La reacción se dejó incubando por 20 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar el paso anterior se agregaron 3 µl por muestra de amortiguador de carga 5X y enseguida se cargó el volumen final en un gel de Acrilamida/Bis 29:1 al 6% (ver anexo 1). La electroforesis se realizó a 70 V con el amortiguador de corrida TBE 0.5 X pH 8, durante 2 horas y treinta minutos, cuando se observó que el azul de bromofenol de las muestras había migrado aproximadamente entre 2/3 y 3/4 partes de longitud del gel. Una vez finalizada la electroforesis se realizó la transferencia a una membrana de Nylon (Hybond-N, Nucleic Acid Transfer membranes, cat. RPN303B) hidratada previamente en TBE 0.5 X durante 10 minutos. La transferencia se realizó a 380 mA durante 60 minutos en amortiguador TBE 0.5X frío. Una vez finalizado el proceso anterior, se realizó el entrecruzamiento del DNA a la membrana con luz UV a 120mJ/cm<sup>2</sup> por 1 minuto en el equipo UV cross-linker UVP Laboratory Products HL-2000 HybriLinker<sup>®</sup> equipado con

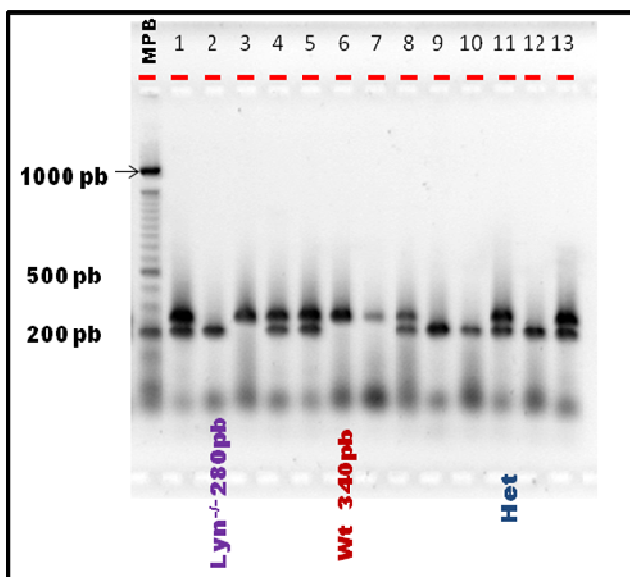
254nm bulbs. La detección de los complejos proteína/oligo NFκB biotinilados se realizó por quimioluminiscencia, por lo que la membrana se bloqueó con 10ml del amortiguador de bloqueo 4X del conjunto de reactivo para EMSA Light Shift de PIERCE (cat. 20148X) durante 10 minutos. Posteriormente se decantó la solución anterior y la membrana fue incubada con 10ml de la solución de bloqueo adicionada con 22μl del estabilizador de estreptavidina conjugada con peroxidasa, durante 15 minutos. Después la membrana se transfirió a un nuevo contenedor y se lavó con 20ml de amortiguador de lavado 1X (ver anexo 1) tres veces durante 5 minutos y una cuarta durante 10 minutos. Nuevamente la membrana se cambió a un nuevo contenedor y se le añadieron 10 ml de amortiguador para el equilibrio del sustrato con la cual se incubó durante 5 minutos. Enseguida la membrana se transfirió a un contenedor limpio y se le agregaron 3ml de la solución activadora del sustrato durante 5 minutos a toda la membrana. Finalmente se quitó el exceso de solución y la membrana fue expuesta a placas de rayos X de 1 a 5 minutos.



## 9. Resultados

### 9.1 Determinación de los genotipos de los ratones *Wt* y *Lyn*<sup>-/-</sup> utilizados en este estudio

Para determinar los genotipos de los ratones que fueron utilizados en esta tesis se tomaron  $2 \times 10^9$  g del DNA extraído a partir de una biopsia de la cola de los ratones. Con ese DNA se amplificó por PCR el gen de la cinasa *Lyn* y el gen de resistencia a Neomicina de cada muestra. El tamaño del producto de la PCR debía ser de 280 pb, cuando correspondía a un ratón con un genotipo mutante *Lyn*<sup>-/-</sup>, ya que el tamaño de este fragmento de DNA corresponde al gen de resistencia a Neomicina (figura 7). Cuando la amplificación del DNA genómico tenía como resultado un producto de 340pb, el cual correspondía al gen de la cinasa *Lyn*, los ratones tenían un genotipo *Wt*. Por otra parte cuando el resultado de la reacción de PCR eran ambos productos, el genotipo del ratón correspondía a un heterocigoto (figura 1). Una vez determinado el genotipo de los animales se procedió a realizar cultivos celulares de CC derivadas de médula ósea, las cuales fueron diferenciadas en medio de cultivo con IL-3 durante 3 semanas. Según el protocolo descrito en materiales y métodos.



**Figura 7. Genotipos de los Ratones 129Sv/SvImJ *Wt* y *Lyn*<sup>-/-</sup>.** Se amplificaron muestras de DNA genómico obtenidas a partir de tejido del ratón, las cuales fueron corridas en un gel de agarosa al 2.5%. Los productos de la reacción de PCR de 340pb corresponden al genotipo *Wt*. Los productos de la reacción con 280pb corresponden al genotipo *Lyn*<sup>-/-</sup>. Ambos productos de la reacción corresponden a un genotipo heterocigoto.

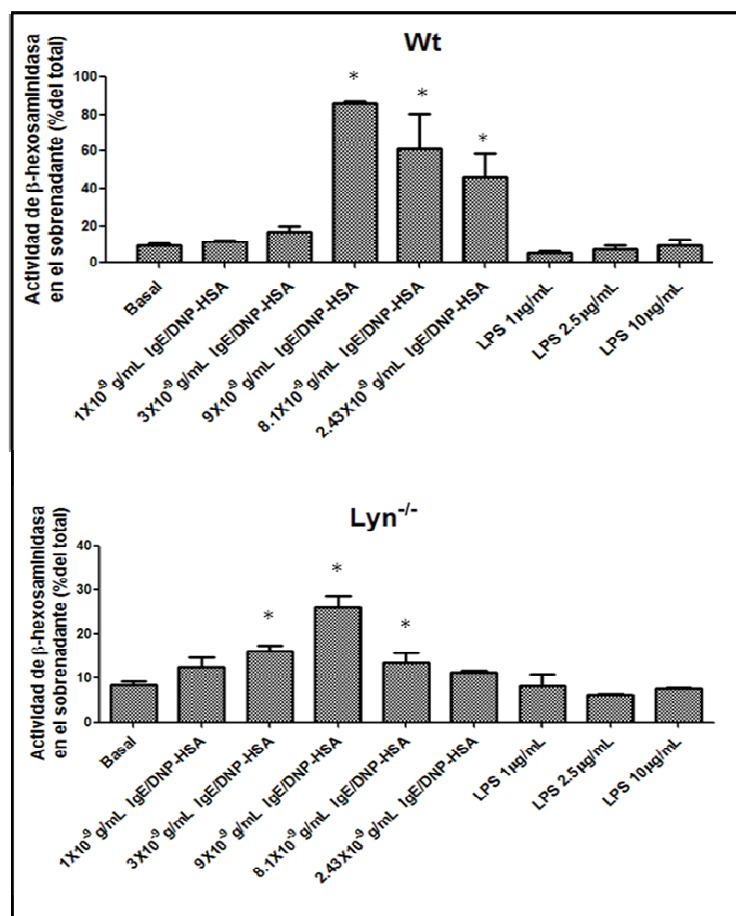
## **9.2 La cinasa Lyn participa positivamente en la desgranulación de las células cebadas inducida por un estímulo con IgE/Antígeno.**

Cuando los cultivos celulares cumplieron un mes de edad, se realizó una curva de dosis - respuesta determinando la desgranulación en respuesta a la estimulación antigénica. Antes de añadir el antígeno, las células fueron sensibilizadas con  $3 \times 10^{-9}$  g de IgE por millón de células durante 1 hora, con el fin de prepararlas para la estimulación del receptor FcεRI. Una vez transcurrido el tiempo de sensibilización se procedió a estimular a las células con distintas concentraciones de antígeno (DNP-HSA). Estas fueron:  $9 \times 10^{-9}$  g/ml,  $8.1 \times 10^{-9}$  g/ml y  $2.43 \times 10^{-9}$  g/ml. Para medir el porcentaje de desgranulación se cuantificó el porcentaje de liberación de la enzima β-hexosaminidasa en el sobrenadante de las células estimuladas.

Los resultados pueden observarse en la figura 9, donde se aprecia que las CC con un genotipo Wt que fueron estimuladas con  $9 \times 10^{-9}$  g/ml del antígeno DNP-HSA tuvieron un porcentaje de desgranulación de 76.4% ( $\pm 3.3$  %). Cuando las células fueron estimuladas con  $8.1 \times 10^{-9}$  g/ml del antígeno, el porcentaje de desgranulación fue de 48.2% ( $\pm 14.3$  %). Finalmente el porcentaje de desgranulación de las células estimuladas con  $2.43 \times 10^{-9}$  g/ml del antígeno fue de 38.3% ( $\pm 6.5$ %). El punto más alto en la desgranulación se obtuvo a los  $9 \times 10^{-9}$  g/ml, lo cual corresponde con lo anteriormente reportado para este tipo celular (figura 8A).

En cuanto a la desgranulación de las células Lyn<sup>-/-</sup> cuando fueron estimuladas con  $9 \times 10^{-9}$  g/ml del antígeno, el porcentaje de desgranulación fue 21.87% ( $\pm 2.8$ %). Para las células que fueron estimuladas con  $8.1 \times 10^{-9}$  g/ml de antígeno, el porcentaje de desgranulación que se obtuvo fue de 11.30% ( $\pm 0.61$ %). Por último al estimular a las células con  $2.43 \times 10^{-9}$  g/ml del antígeno fue de 3.18% ( $\pm 3.2$ %). Con base en los resultados anteriores se puede observar que el punto máximo de desgranulación se obtuvo cuando las células fueron estimuladas con  $9 \times 10^{-9}$  g/ml. Los datos obtenidos en este experimento control están de acuerdo a lo reportado anteriormente (figura 8B).

Finalmente, al comparar el porcentaje de desgranulación en los dos distintos genotipos se observa que las CC  $Lyn^{-/-}$  desgranulan un 54.6% menos que las CC Wt cuando son estimuladas con  $9 \times 10^{-9}$  g/ml, un 36.9% menos cuando son estimuladas con  $8.1 \times 10^{-9}$  g/ml y un 35.12% menos cuando son estimuladas con  $2.43 \times 10^{-9}$  g/ml de antígeno DNP-HSA. Por lo tanto las células provenientes de los animales  $Lyn^{-/-}$  desgranulan menos que las células provenientes de animales Wt después de la estimulación del receptor FcεRI. Los datos son representativos de tres experimentos.



**Figura 8. A) Liberación de la enzima  $\beta$ -Hexosaminidasa en CC WT  $Lyn^{-/-}$ .** Las células fueron estimuladas con  $9 \times 10^{-9}$  g/ml,  $8.1 \times 10^{-9}$  g/ml y  $2.43 \times 10^{-9}$  g/ml de antígeno DNP-HSA y con 1 µg/ml, 2.5 µg/ml y 10 µg/ml de LPS. **B) Liberación de la enzima  $\beta$ -hexosaminidasa en CC  $Lyn^{-/-}$ .** Las células fueron estimuladas de igual forma que las Wt. n=3. Se muestran valores promedio  $\pm$  error estándar. \*Diferencia significativa comparada con el basal de cada genotipo ( $p < 0.001$ ) determinada por un análisis de varianza ANOVA de dos vías, seguida por la prueba de Tukey.

### **9.3 Los lipopolisacárido de *E. coli* no inducen la desgranulación en las células cebadas.**

Una vez que se comprobó que las CC Wt y Lyn<sup>-/-</sup> respondían de manera similar a lo ya reportado con anterioridad para un estímulo antigénico, se procedió a probar si los LPS de *E.coli* activan la desgranulación de las CC a través del receptor TLR-4. Estos experimentos fueron realizados para reproducir el hallazgo hecho por Volaluk Supajatura et. al. en el 2002, quien encontró que un estímulo con LPS no era capaz de inducir la desgranulación de CC.

Se estimularon células Wt y Lyn<sup>-/-</sup> con 1µg/ml, 2.5 µg/ml y con 10 µg/ml de LPS durante una hora. Al terminar el tiempo de estimulación se midió en el sobrenadante el porcentaje de liberación de la enzima β-hexosaminidasa. Como se puede observar en la figura 8A, en las CC con un genotipo Wt no se induce la desgranulación, ya que el porcentaje de liberación de esta enzima fue de 0.3% (± 0.2%), 0.46% (±0.5) y 0.8% (±0.7) respectivamente, estos valores son cercanos al basal.

En cuanto al genotipo Lyn<sup>-/-</sup> tampoco se induce la desgranulación ya que los valores del porcentaje de desgranulación fueron cercanos al basal (figura 8B) y fueron los siguientes: con un estímulo de 1µg/ml de LPS fue de 0% (± 0%), con un estímulo de 2.5 µg/ml de LPS fue de 0.6 % (± 1.3%) y cuando fueron estimuladas con 10µg/ml fue 1.3% (± 2%).

Finalmente no hubo diferencia significativa al comparar cada valor del porcentaje de desgranulación obtenido en la estimulación con LPS con respecto al valor del basal (p<0.001), en ambos tipos celulares.

Por lo tanto estos resultados muestran que la activación del receptor TLR-4 no induce desgranulación en las CC Wt y Lyn<sup>-/-</sup>, aunque sean estimuladas con altas concentraciones de LPS. De esta forma en esta primera serie de experimentos fuimos capaces de determinar el genotipo de los ratones, obtener células cebadas funcionales y comprobar lo reportado por otros autores acerca del defecto que las células Lyn<sup>-/-</sup> tienen en la

desgranulación ante un estímulo antigénico. También, pudimos reproducir la observación de que los LPS no inducen la desgranulación de las células cebadas.

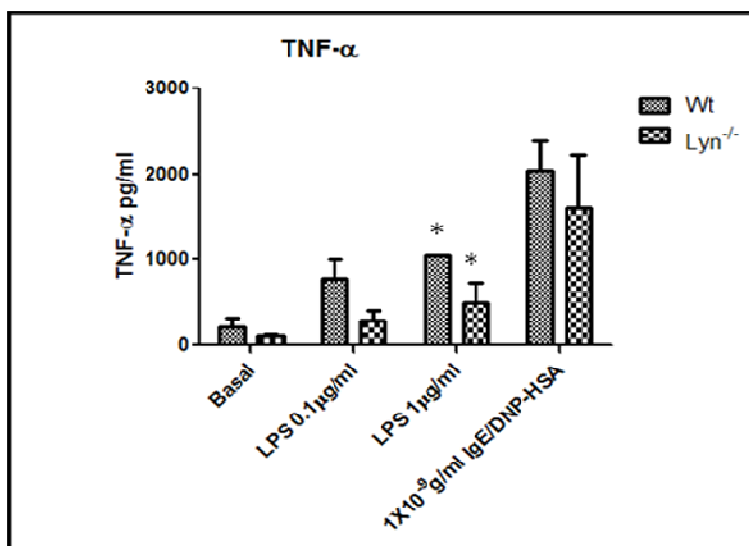
#### ***9.4 Las células cebadas derivadas de ratones $Lyn^{-/-}$ no secretan TNF- $\alpha$ después de un estímulo con lipopolisacáridos de *E.coli*.***

Con los controles anteriores listos, procedimos a analizar los parámetros de secreción de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$  en células Wt y  $Lyn^{-/-}$ . Para ello las células fueron estimuladas con 0.1  $\mu\text{g/ml}$  de LPS y con 1 $\mu\text{g/ml}$  de LPS. Como control positivo de la secreción de TNF- $\alpha$  las CC Wt y  $Lyn^{-/-}$  fueron estimuladas con  $9 \times 10^{-9} \text{g/ml}$  de antígeno (DNP-HSA) y con 100nM A23187/1 $\mu\text{M}$  PMA durante 1 hora.

En la figura 9, se puede observar que los LPS inducen la secreción de TNF- $\alpha$  en las células Wt con valores de 766.9 pg/ml ( $\pm 335.02$  pg) en el estímulo con 0.1  $\mu\text{g/ml}$  y de 1047pg/ml ( $\pm 2.89$  pg/ml) cuando fueron estimuladas con 1 $\mu\text{g/ml}$  de LPS. En contraste, las células  $Lyn^{-/-}$  secretan menos TNF- $\alpha$ , ya que cuando son estimuladas con 0.1 $\mu\text{g/ml}$  y 1 $\mu\text{g/ml}$  de LPS, los valores de la secreción fueron de 499 pg/ml ( $\pm 167.5$  pg/ml) y de 501 pg/ml ( $\pm 312.5$  pg/ml) respectivamente, o sea, la mitad de los valores en comparación a los obtenidos en las CC Wt (figura 9). Se observó diferencia significativa al comparar los valores de la secreción de TNF- $\alpha$ , en ambos tipos celulares, cuando fueron estimulados con 1 $\mu\text{g/ml}$  de LPS ( $p < 0.05$ ).

En cuanto a los valores obtenidos para el estímulo de IgE/ antígeno (DNP-HSA), se observa que las células Wt secretan 1367pg/ml ( $\pm 501.9$ pg/ml) los cuales son valores muy parecidos a los de las células  $Lyn^{-/-}$  con una secreción de 1610pg/ml  $\pm 862.6$  pg/ml, no hubo diferencia significativa al comparar los valores de ambos genotipos (figura 9). Por otra parte, en datos obtenidos en nuestro laboratorio, se ha observado que cuando las células  $Lyn^{-/-}$  son estimuladas con A23187/PMA secretan más TNF- $\alpha$  que las células Wt, los datos no se muestran (Ávila-Hernández, M, 2009).

Por lo tanto, en conjunto los datos anteriores muestran que las CC  $Lyn^{-/-}$  son capaces de secretar TNF- $\alpha$  de manera similar a las células Wt, cuando son estimuladas con IgE/antígeno y A23187/PMA; sin embargo las células  $Lyn^{-/-}$  secretan menos TNF- $\alpha$  en comparación con las células Wt cuando son estimuladas con LPS.



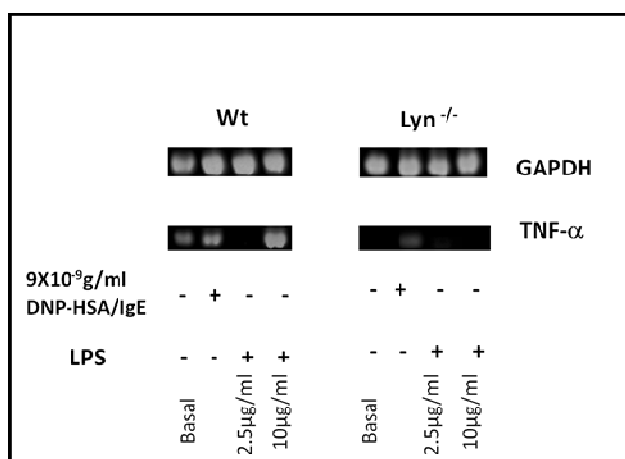
**Figura 9. Secreción de TNF- $\alpha$  en CC Wt y  $Lyn^{-/-}$ .** A)  $1.8 \times 10^6$  células fueron estimuladas con 0.1  $\mu$ g/ml y 1  $\mu$ g/ml de LPS y como control positivo las CC fueron estimuladas con  $9 \times 10^{-9}$  g/ml durante una hora como control positivo de que las células  $Lyn^{-/-}$  son capaces de secretar la citocina TNF- $\alpha$  ante un estímulo que no requiere de receptor. N=3. Se muestra promedio  $\pm$  error estándar.\*Diferencia significativa comparada con en el grupo Wt ( $p < 0.05$ ) determinada por un análisis de varianza ANOVA de dos vías, seguida por la prueba de Tukey.

### ***9.5 La cinasa Lyn participa positivamente en la acumulación del mRNA de la citocina TNF- $\alpha$ después de la activación del receptor TLR-4 en células cebadas.***

A continuación analizamos la síntesis de citocinas estimuladas por los LPS en células Wt y  $Lyn^{-/-}$ , midiendo la expresión del mensajero de TNF- $\alpha$  por RT-PCR. El cDNA utilizado de la amplificación fue obtenido a partir de RNA total de CC Wt y  $Lyn^{-/-}$  que fueron estimuladas con 2.5  $\mu$ g/ml y 10  $\mu$ g/ml de LPS durante una hora. Como control positivo de que las células sí eran capaces de activarse con otro estímulo se utilizó para la amplificación de

TNF- $\alpha$ , el cDNA obtenido a partir de las células Wt y Lyn<sup>-/-</sup> estimuladas con 9X10<sup>-9</sup>g/ml de IgE/antígeno (DNP-HSA).

Como se puede observar en la figura 9, se encontró que las CC Wt al ser estimuladas con 10 $\mu$ g/ml de LPS sintetizan y acumulan el RNA mensajero de TNF- $\alpha$ . De manera contraria en las CC Lyn<sup>-/-</sup>, no se observa la producción del mRNA de TNF- $\alpha$ . Por lo tanto, estos resultados indican la cinasa Lyn es una proteína que participa en la acumulación del mensajero de TNF- $\alpha$  en las CC murinas, al activar al receptor TLR-4 con LPS.

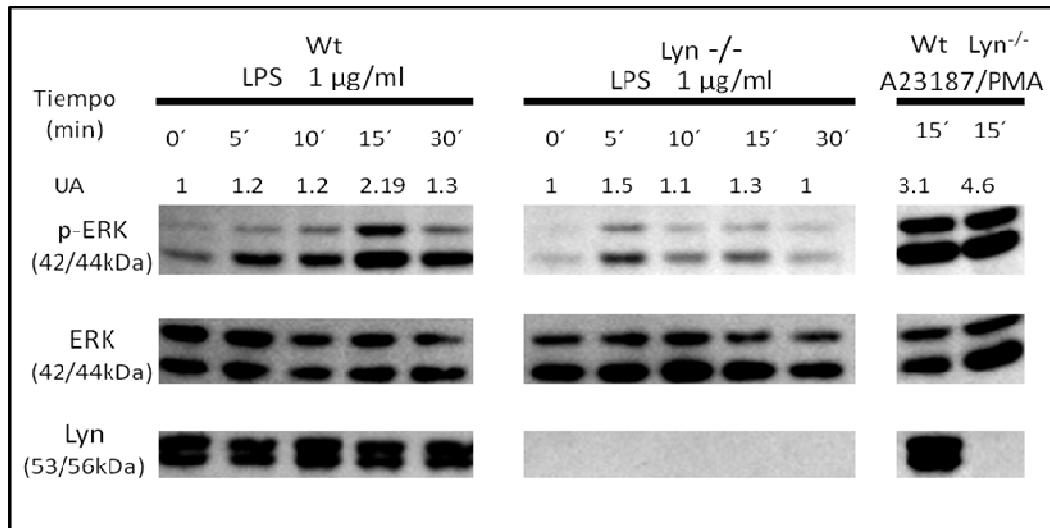


**Figura 10. Expresión de mRNA de TNF- $\alpha$  en CC.** Del lado izquierdo se muestran las CC Wt, las cuales fueron estimuladas con 2.5 $\mu$ g/ml y 10 $\mu$ g/ml de LPS. Del lado derecho se muestran las CC Lyn<sup>-/-</sup> que fueron estimuladas con de la misma manera que las células Wt. Como control de que se obtuvo la misma cantidad de cDNA del RNA total se amplificó el gen constitutivo GAPDH.

### **9.6 La cinasa Lyn participa positivamente en la activación de la cascada de las MAPK después de estimular al receptor TLR-4 de las células cebadas con lipopolisacáridos de E. coli.**

Las MAPK's han sido implicadas en la producción de la citocina TNF- $\alpha$  inducida por la estimulación con LPS. Existen tres subfamilias de MAPK bien caracterizadas tales como: p38, ERK1/2 y Jun-N terminal (JNK) las cuales se fosforilan al estimular al receptor TLR-4 con LPS. Nosotros realizamos un curso temporal de 0, 5, 10, 15 y 30 minutos para analizar la activación de las tres MAPKs en respuesta al LPS.

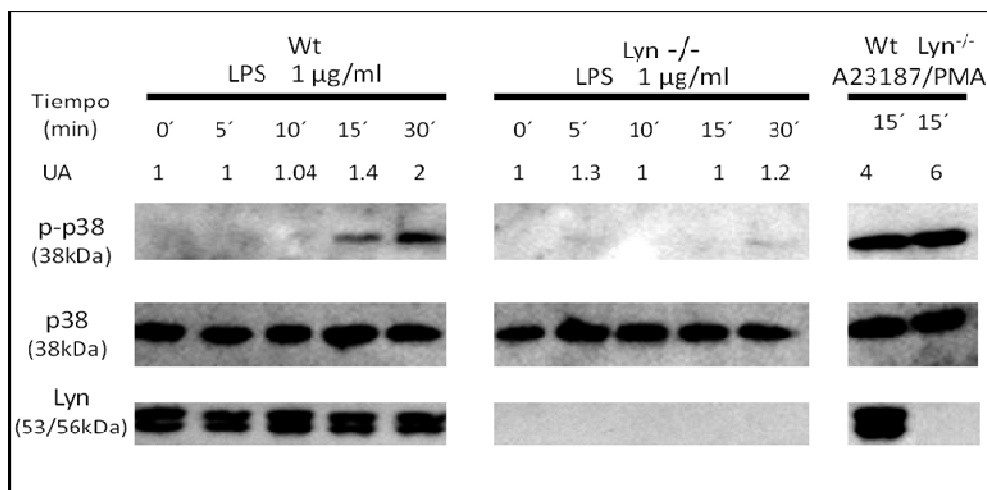
**ERK 1/2.** Como se puede observar en el inmunoblot anti-p ERK (figura 11) la fosforilación de esta proteína se incrementa a partir de los 5 minutos 1.2 veces por arriba del basal, alcanzando a los 15 minutos su máxima actividad (2.19 veces) y la respuesta se mantiene a los 30 minutos (1.3 veces) en las CC Wt. En CC  $Lyn^{-/-}$ , se observa un defecto en la activación de ERK, ya que se incrementa su fosforilación a los 5 minutos 1.5 veces arriba del basal, pero disminuye rápidamente la señal. Es importante señalar que existe una diferencia en el basal de fosforilación de ERK entre las células Wt y  $Lyn^{-/-}$ . El valor de fosforilación de ERK en las células  $Lyn^{-/-}$  a los 15 minutos se induce 1.8 veces menos que en las células Wt. Se rasuró dos veces la misma membrana de PDVF y se detectaron nuevamente en ella a ERK total y la cinasa Lyn como controles. Como control de que la actividad de esta proteína puede ser inducida en las células  $Lyn^{-/-}$ , ambos tipos celulares se estimularon con la mezcla de A23187/1 $\mu$ MPMA, en el inmunoblot se observa que con este estímulo ERK alcanza una actividad similar en ambos tipos celulares,  $Lyn^{-/-}$  (4.6 veces) que en las Wt (3.1 veces).



**Figura 11. Defecto de las CC  $Lyn^{-/-}$  en la activación de ERK 42/44.**  $5 \times 10^6$  millones de CC Wt y  $Lyn^{-/-}$  fueron tratadas con 1 $\mu$ g/ml de LPS de *E.coli*, en un curso temporal de 0, 5, 10, 15 y 30 min. Como control se estimularon  $5 \times 10^6$  células de ambos genotipos con A23187/PMA. Las células fueron lisadas y se realizó una SDS-PAGE. Se realizó la transferencia a una membrana de PVDF y se inmunodetectó a p-ERK, se rasuró la membrana y fue utilizada para inmunodetectar a ERK total, nuevamente se realizó el mismo procedimiento y se inmunodetectó la cinasa Lyn. La imagen es representativa de tres experimentos realizados con cultivos independientes. Los valores de inducción están calculados con respecto al tiempo 0' de cada genotipo. UA= Unidades Arbitrarias.



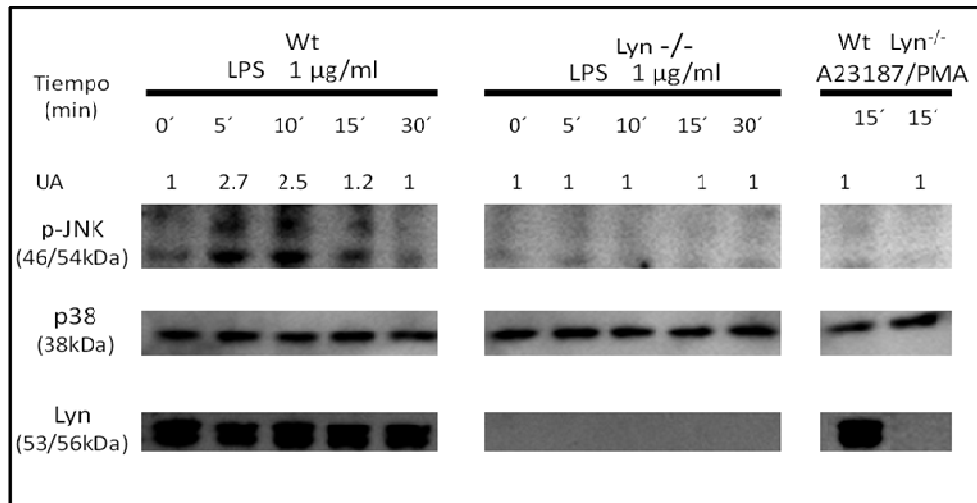
**p38.** Esta MAPK también muestra un defecto en su activación en las CC *Lyn*<sup>-/-</sup>, ya que como se puede observar en el inmunoblot de la figura 12, esta proteína se fosforila a partir de los 15 minutos 1.4 veces arriba del basal y alcanza su máxima fosforilación a los 30 minutos, 2 veces arriba del basal. Sin embargo, en las CC *Lyn*<sup>-/-</sup>, p38 tiene una fosforilación muy cercana a la condición basal a lo largo de todo el curso temporal. En cuanto al estímulo control con A23187/PMA la activación fue mayor en las células *Lyn*<sup>-/-</sup> (6 veces arriba del basal) que en las Wt (4 veces arriba del basal).



**Figura 12. Defecto de las CC *Lyn*<sup>-/-</sup> en la fosforilación de p38.** 5X10<sup>6</sup> millones de CC Wt y *Lyn*<sup>-/-</sup> fueron tratadas con 1µg/ml de LPS de *E.coli*, en un curso temporal de 0,5, 10, 15 y 30 min. Como control se estimularon células de ambos genotipos con A23187/PMA. Las células fueron lisadas y separadas por una SDS-PAGE y transferidas a una membrana de PVDF. Se inmunodetectó a p-p38, se rasuró la membrana y fue utilizada para inmunodetectar a p38 total. Los datos fueron obtenidos a partir de la densitometría del escaneo del inmunoblot. La figura es representativa de tres experimentos realizados con cultivos independientes. Los valores de inducción están calculados con respecto al tiempo 0' de cada genotipo. UA= Unidades Arbitrarias.

**JNK.** Finalmente, en la figura 13 se muestra el inmunoblot anti-p JNK. La fosforilación de esta proteína se incrementa a partir de los 5 minutos 2.7 veces arriba del basal, alcanzando su máxima actividad a los 10 minutos (2.5 veces arriba del basal) disminuyendo a los 15 minutos (1.2 veces arriba del basal) en las CC Wt. En cuanto a las CC *Lyn*<sup>-/-</sup>, se observa un defecto en su activación, ya que se mantiene con valores cercanos

al basal durante todo el curso temporal. Como control de que esta proteína puede ser fosforilada en ambos tipos celulares se estimularon con ionoforo A23187/PMA, sin embargo no se indujo la fosforilación de JNK ante este estímulo. Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que la cinasa Lyn juega un papel muy importante en elevar la activación de la cascada de las MAPK.



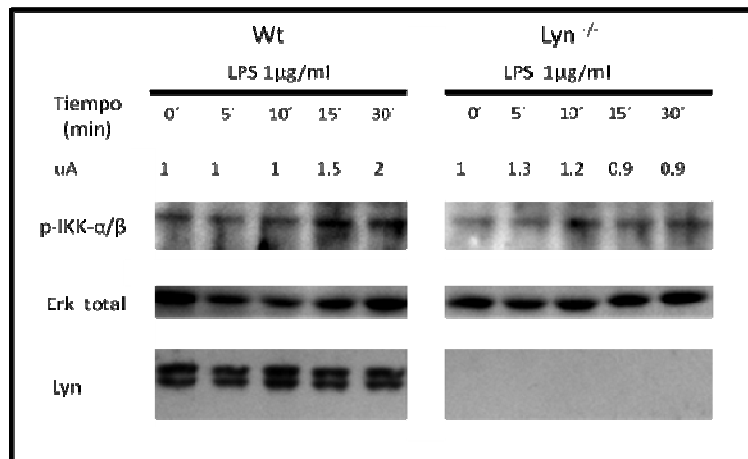
**Figura 13. Activación de JNK p54/45 en CC Wt y Lyn<sup>-/-</sup>.** A) 5X10<sup>6</sup> millones de CC Wt y Lyn<sup>-/-</sup> fueron tratadas con 1µg/ml de LPS de E.coli, en un curso temporal de 0,5, 10, 15 y 30 min. Después se lisaron las células y se realizó una SDS-PAGE. El gel se transfirió a una membrana de PVDF en la cual se inmunodetectó anti p-JNK, se rasuró la membrana y fue utilizada para inmunodetectar a p38 total, nuevamente se realizó el mismo procedimiento y se inmunodetectó la cinasa Lyn. Control se estimularon células de ambos genotipos con A23187/PMA. La imagen es representativa de tres experimentos realizados con cultivos independientes, los valores de inducción están calculados con el tiempo cero de cada genotipo. UA= Unidades Arbitrarias.

### **9.7 La cinasa Lyn participa positivamente en la activación de la vía de NFκB después de estimular al receptor TLR-4 de las células cebadas con lipopolisácaridos de E.coli.**

Como las CC Lyn<sup>-/-</sup> tienen una deficiencia en la producción y secreción de TNF-α, así como en la activación de las distintas vías de las MAPK, ante un estímulo con LPS, decidimos examinar si la de activación de la vía de NFκB, inducida por el receptor TLR-4, está afectada por la ausencia de la cinasa Lyn. Se realizó un curso temporal estimulando CC Wt y Lyn<sup>-/-</sup> con 1µg/ml de LPS, para observar la fosforilación de IKKα/β y la fosforilación de IκB

por Western Blot. Por otra parte se examinó la translocación al núcleo de p65 por medio de un ensayo de retardamiento de movilidad electroforética (EMSA).

**IKK $\alpha/\beta$ .** En la figura 14 se muestra un inmunoblot utilizando un anticuerpo dirigido contra p-IKK $\alpha/\beta$  en el cual se observa que en las CC Wt se incrementa su fosforilación a partir de los 15 minutos (1.5 veces) alcanzando su valor máximo a los 30 minutos (2 veces arriba del basal). En contraste, en las CC Lyn<sup>-/-</sup> se incrementa su fosforilación a los 5 minutos (1.3 veces arriba del basal), sin embargo la fosforilación de esta proteína decae rápidamente. Como control de carga se realizó un inmunoblot anti-ERK total y la cinasa Lyn como confirmación del genotipo.

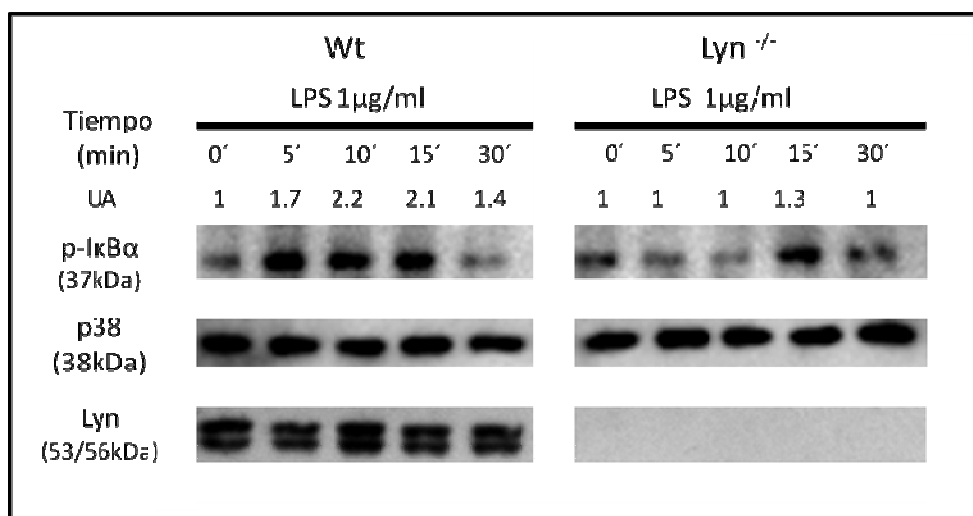


**Figura 14. Defecto de las CC Lyn<sup>-/-</sup> en la proteína IKK $\alpha/\beta$ .** 5X10<sup>6</sup> millones de CC Wt y Lyn<sup>-/-</sup> fueron tratadas con 1 $\mu$ g/ml de LPS de *E.coli*, en un curso temporal de 0, 5, 10, 15 y 30 min. Las células fueron lisadas y separadas por una SDS-PAGE y transferidas a una membrana de PVDF. Se inmunodetectó a p-IKK $\alpha/\beta$ , después se rasuró la membrana y nuevamente se utilizó para inmunodetectar a ERK total y a la cinasa Lyn. La imagen es representativa de tres experimentos. La figura es representativa de tres experimentos realizados con cultivos independientes. Los valores de inducción están calculados con respecto al tiempo 0' de cada genotipo. UA=Unidades Arbitrarias.

**I $\kappa$ B.** En la figura 15 se muestra un inmunoblot utilizando un anticuerpo dirigido contra anti-p-I $\kappa$ B. Cuando las CC Wt son estimuladas con LPS se observa un incremento en la fosforilación y por lo tanto la degradación vía proteosoma de esta proteína, a partir de los 5 minutos (1.7 veces arriba del basal) y se mantiene a los 10 (2.2 veces arriba del basal) y 15 (1.5 veces arriba del basal) minutos disminuyendo la fosforilación a los 30 minutos,

después del estímulo. En cuanto a las CC  $Lyn^{-/-}$  se mantienen valores de fosforilación cercanos al basal a lo largo de todo el curso temporal. Por lo tanto, estos resultados demuestran que las CC  $Lyn^{-/-}$  tienen un defecto en la inducción de la degradación de I $\kappa$ B. Como control de carga se observa a p38 y se detectó a la cinasa Lyn como control de que las células correspondían al genotipo indicado.

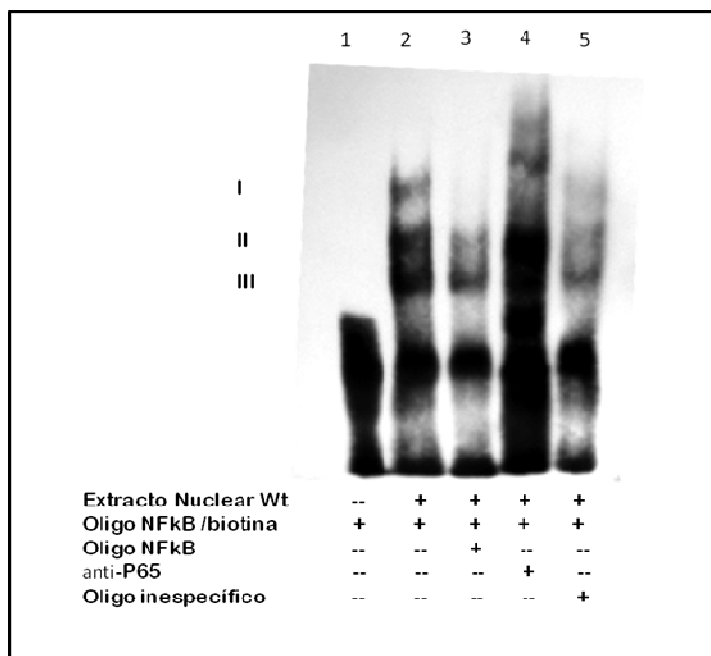
**EMSA.** Finalmente, una vez que se observó que IKK $\alpha/\beta$  tenía un defecto en su fosforilación y por lo tanto en la fosforilación y degradación de I $\kappa$ B, decidimos examinar si p65, una de las subunidades del complejo NF $\kappa$ B involucrada en la producción de TNF- $\alpha$ , se translocaba al núcleo en ambos tipos celulares. Para ello se estimularon CC  $Lyn^{-/-}$  y Wt con LPS durante 15, 30 y 60 minutos, la condición basal no fue estimulada. Finalmente se realizó la extracción de los núcleos de las células y se realizó un EMSA.



**Figura 15. Defecto de las CC  $Lyn^{-/-}$  en la proteína I $\kappa$ B.** A.  $5 \times 10^6$  millones de CC Wt y  $Lyn^{-/-}$  fueron tratadas con 1 $\mu$ g/ml de LPS de, en un curso temporal de 0, 5, 10, 15 y 30 min. Las células fueron lisadas y posteriormente separadas por una SDS-PAGE. La transferencia se realizó a una membrana de PVDF. Se inmunodetectó a I $\kappa$ B, se rasuró la membrana y fue utilizada para inmunodetectar a P38 total y la cinasa Lyn. La imagen es representativa de tres experimentos. La figura es representativa de tres experimentos realizados con cultivos independientes. Los valores de inducción están calculados con respecto al tiempo 0' de cada genotipo. UA= Unidades Arbitrarias.

En la figura 16 se observa un gel control del ensayo de retardamiento de la subunidad p65, el cual se realizó con extractos nucleares de CC Wt, ya que nosotros queríamos averiguar si el complejo que induce el tratamiento con 1µg/ml de LPS contenía esa subunidad de NFκB. En el carril 1 se observa el oligo de NFκB marcado con biotina sin extracto nuclear y por lo tanto no se forma ningún complejo. En el carril 2 se observa el extracto nuclear de las CC Wt más el oligo marcado con biotina de NFκB, por lo que se observa la formación de tres complejos a los cuales llamamos complejo I, II y III.

En el carril 3, se observa que al agregar un oligo específico de NFκB que no está marcado con biotina, el complejo I desaparece en su totalidad y disminuyen los complejos II y III. En el carril 4 se observa que un anticuerpo dirigido contra p65 (anti-p65) retarda al complejo I, por lo tanto, en ese complejo se encuentra la subunidad p65 de NFκB. Finalmente si se agrega un oligo inespecífico a los extractos nucleares Wt no desaparece el complejo I (p65). Por lo tanto, en las células utilizadas, el complejo I es el que contiene a p65, por lo que un estímulo con LPS induce la translocación de p65 al núcleo donde esta proteína se une a secuencias específicas activando la transcripción de citocinas.



**Figura 16. Gel control para el EMSA de p65.** Se realizaron extractos nucleares de 1X10<sup>7</sup> millones de células Wt, las cuales habían sido estimuladas con 1µg/ml de LPS. Posteriormente se observó la formación de complejos o no por medio de un oligo específico NFκB marcado con biotina, un oligo específico para NFκB, el cual se encuentra en todos los carriles. En el carril 3 se observa la competencia del oligo específico para NFκB marcado con bitina contra un oligo NFκB no marcado con biotina y en el carril 5 la competencia contra un oligo inespecífico. En el carril 4 se observa el oligo NFκB marcado con biotina más un anticuerpo dirigido contra p65 (**anti-p65**). Finalmente las muestras fueron corridas en un gel de Bis/Acrilamida al 6%.

En la figura 17 A se muestra la imagen del gel del ensayo de EMSA de los extractos nucleares obtenidos de CC Wt y  $Lyn^{-/-}$  que fueron estimuladas con  $1\mu\text{g/ml}$  de LPS. En las CC Wt se puede observar la formación del complejo I (p65) a los 15 minutos después del estímulo, la cual se incrementa significativamente a los 30 y 60 minutos, alcanzando su máximo enlace al DNA a los 30 minutos en comparación con el basal. Sin embargo en las CC  $Lyn^{-/-}$  no hay una formación de este complejo en ninguno de los tiempos.

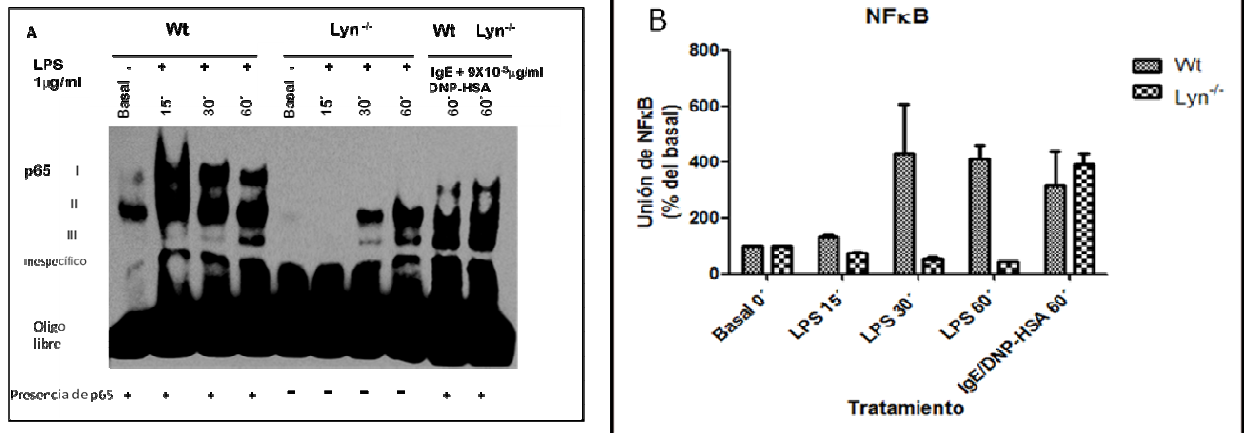
La figura 17 B muestra la gráfica de unión de NF $\kappa$ B, realizada con los valores densitométricos del complejo p65, los cuales fueron empleados para obtener el porcentaje de formación del complejo a partir del porcentaje del basal. En las células Wt el porcentaje de formación del complejo p65 fue a los 15 minutos de  $131.035\% (\pm 8.02\%)$ , a los 30 minutos de  $433.5\% (\pm 174.65\%)$  y a los 60 minutos de  $413.69\% (\pm 47.7\%)$ . Por otra parte, en las CC  $Lyn^{-/-}$  a los 15 minutos el porcentaje de formación del complejo fue de  $75.72\% (\pm 30.2\%)$ , a los 30 minutos de  $54.45\% (\pm 74.14)$  y finalmente a los 60 minutos de  $43.74\% (\pm 39.9\%)$  los cuales son valores cercanos al basal. Como control positivo de la formación del complejo p65 se utilizaron CC Wt y CC  $Lyn^{-/-}$  estimuladas con  $9 \times 10^{-9}\text{g/ml}$  de IgE/DNP-HSA, los valores obtenidos fueron  $317.49\% (\pm 123.14)$  y  $391.31\% (\pm 530.2)$  respectivamente, los cuales son muy similares entre sí.

Nuestros resultados sugieren que p65 es el complejo que está involucrado en la síntesis de TNF- $\alpha$  en las CC Wt ante el estímulo con LPS, ya que existe una ausencia total de este complejo en las CC  $Lyn^{-/-}$ . Finalmente con estos resultados se puede concluir que en las CC  $Lyn^{-/-}$  no se activa la vía de NF $\kappa$ B ante el estímulo de LPS.

## **10. Discusión**

Las células cebadas juegan un papel importante en la respuesta inmune innata ante una infección ocasionada por bacterias Gram negativas, y ésta es, probablemente, una de las razones por las que este tipo celular está altamente conservado en la evolución del sistema inmune. Las células cebadas están presentes en grupos tan antiguos como los tunicados y a lo largo de toda la filogenia de los vertebrados. Además, este tipo celular es

de gran importancia en muchos procesos fisiológicos, dentro de los cuales se encuentra la regulación de la respuesta inmune innata y de la respuesta adaptativa<sup>11</sup>.



**Figura 17. Defecto de las CC Lyn<sup>-/-</sup> en la translocación de p65.** A Se realizaron extractos nucleares de 1X10<sup>7</sup> millones de células Wt y Lyn<sup>-/-</sup>, las cuales habían sido estimuladas con 1µg/ml de LPS. Posteriormente se observó la formación de complejos por medio de un oligo específico NFκB marcado con biotina. Finalmente las muestras fueron corridas y transferidas a una membrana de nitrocelulosa para la detección. B Se muestra una gráfica obtenida con los valores de densitometría de la unión de NFκB a los 15 minutos, 30 minutos y 60 minutos, además de el estímulo control de IgE/DNP-HSA 9X10<sup>-9</sup>g/ml durante 60 minutos. Se muestran valores promedio ± error estándar.

Muchas investigaciones han demostrado que las células cebadas responden a los LPS de las bacterias Gram negativas, mediante los receptores TLR y específicamente, a través del receptor TLR-4. Asimismo, la vía de señalización del TLR-4 se encuentra conservada en la evolución de los organismos pluricelulares, y probablemente se debe a que permite la producción de importantes mediadores para la defensa en contra de patógenos.

En nuestra investigación encontramos que en la vía de transducción del TLR-4 participa la cinasa de tirosina Lyn como una proteína fundamental para la señalización que lleva a la

producción de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$  en CC mucosales murinas. Esta cinasa miembro de la familia de Src, se encuentra en todos los metazoarios y juega un papel importante en distintos procesos celulares, tales como: apoptosis, crecimiento, diferenciación, adhesión y la respuesta inflamatoria<sup>36,42</sup>.

En nuestro proyecto utilizamos CC derivadas de ratones Lyn<sup>-/-</sup> (figura 7) para caracterizar el papel de la cinasa Lyn en el sistema de transducción de señales del receptor TLR-4. Por lo que antes de comenzar nuestra investigación, realizamos algunos controles necesarios para caracterizar las células cebadas de los ratones Lyn<sup>-/-</sup>.

Primero, se analizaron los genotipos de los ratones por PCR utilizando DNA extraído a partir de biopsias de la cola y se realizó una citometría de flujo de los cultivos celulares (no se muestran los datos), con la cual se comprobó que nuestras CC derivadas de ratones Lyn<sup>-/-</sup> expresaban el receptor de superficie Fc $\epsilon$ RI en cantidades equivalentes a las células Wt (los datos no se muestran). La expresión de este receptor Fc $\epsilon$ RI se utiliza como parámetro de que las células en cultivo se diferencian correctamente.

También se realizó la estimulación con ionóforo A23187/PMA (los datos no se muestran), lo cual nos sirvió como control para sugerir que las células Lyn<sup>-/-</sup> no tenían un defecto en su maduración, ya que responden de manera similar a las CC Wt.

Diversas investigaciones han demostrado que la cinasa Lyn es un regulador negativo de la proliferación, ya que un estímulo con IL-3 y SCF activan las vías de sobrevivencia, Akt, y las proliferativas, ERK. Es importante mencionar que la fosforilación de Akt es más prolongada en las células Lyn<sup>-/-</sup> al igual que la fosforilación de ERK. Estos datos concuerdan con la forma en se comportan las CC Lyn<sup>-/-</sup> empleadas en esta investigación<sup>42</sup>.

Posteriormente, se estudió la desgranulación inducida por antígeno en BMMCs derivadas de ratones Wt y Lyn<sup>-/-</sup>. De esta forma, se comprobó que las células utilizadas en este trabajo, responden a la estimulación dependiente de complejos IgE-antígeno de acuerdo a lo reportado previamente en otras investigaciones realizadas con CC obtenidas de esta cepa de ratones<sup>26</sup>. Una vez que se logró reproducir los hallazgos de que la cinasa Lyn juega un papel importante en la desgranulación dependiente del receptor Fc $\epsilon$ RI, se procedió a



caracterizar el papel de la cinasa Lyn en el sistema de transducción de señales del receptor TLR-4. Para ello, se realizó una citometría de flujo del receptor TLR-4 (no se muestran los datos), en la cual se observó que las CC Wt y Lyn<sup>-/-</sup> expresan en su superficie a este receptor de manera similar y por lo tanto ambos tipos celulares son capaces de responder al estímulo con LPS de *E.coli*. La presencia de receptores TLR en la superficie de las células cebadas derivadas de médula ósea ya había sido reportada<sup>25, 26</sup>. Con este experimento, sólo nos aseguramos de que la ausencia de Lyn no afectara la expresión del receptor TLR-4.

A continuación, las CC Lyn<sup>-/-</sup> y Wt fueron estimuladas con diversas concentraciones de LPS, como ha sido reportado, ninguna de las concentraciones probadas de LPS fue capaz de inducir la desgranulación de las BMMC, ni en Wt ni en Lyn<sup>-/-</sup> (figura 8A y 8B).

La desgranulación y la producción de citocinas son procesos que están dissociados cuando las células cebadas son estimuladas con LPS. Se ha reportado que los LPS inducen la producción de TNF- $\alpha$  en células cebadas, nosotros encontramos que las células Wt producen el RNAm para la citocina TNF- $\alpha$  ante un estímulo con LPS, pero las CC Lyn<sup>-/-</sup> tienen un defecto en la producción del RNAm de esta citocina (figura 9). Estos resultados son novedosos e interesantes porque sugieren que la cinasa Lyn participa en la acumulación del RNAm de la citocina TNF- $\alpha$  después de la estimulación del receptor TLR-4.

También observamos un defecto en la secreción de la citocina TNF- $\alpha$  en células Lyn<sup>-/-</sup>, ya que la secreción de esta proteína fue menor a la observada en las células Wt (figura 10). Estos datos concuerdan con la baja acumulación del RNAm de la citocina TNF- $\alpha$  observada en las células Lyn<sup>-/-</sup>. Además, es importante señalar que el defecto en la secreción de esta citocina no se debe a que las células Lyn<sup>-/-</sup> carezcan de la maquinaria necesaria para realizar este proceso, ya que este tipo celular es capaz de secretar cantidades de TNF- $\alpha$  semejantes a las observadas en células Wt ante un estímulo con un ionóforo 100nM A23187/ 1 $\mu$ M PMA (los datos no se muestran).

Nuestros datos son similares a los encontrados en un estudio realizado por Smolinska Nicole et. Al 2004 en macrófagos humanos, en el cual se observó que si éstos eran tratados con inhibidores selectivos de las cinasas de la familia de Src como el PP2, mostraban una inhibición de la producción y secreción de TNF- $\alpha$  inducida por LPS. Los efectos de los inhibidores de cinasas de la familia de Src también han sido observados midiendo el RNAm de otras citocinas, tales como la IL-10<sup>41</sup>.

En conjunto estos datos sugieren que las CC responden ante los LPS mediante un sistema de transducción donde participa la cinasa Lyn, ya que es necesaria para transducir las señales que regulan la producción de la citocina TNF- $\alpha$ .

Se ha reportado que la síntesis de TNF- $\alpha$  requiere de la participación de las MAPK. Cuando nosotros examinamos esta vía encontramos que las CC Lyn<sup>-/-</sup> tienen un defecto en la activación de las tres familias de las MAP cinasas ERK1/2 (figura 11), p38 (figura 12) y JNK (figura 14) en comparación con las CC Wt. No obstante, ante un estímulo con un ionóforo A23187/PMA, las células Lyn<sup>-/-</sup> responden de manera similar a las células Wt, en la fosforilación de ERK, p38.

La participación de cinasas de la familia de Src en la activación de las MAPK ante un estímulo con LPS, ha sido observada previamente en macrófagos y se ha realizado utilizando inhibidores farmacológicos de las cinasas de tirosina como el PP1<sup>37</sup>. Sin embargo, el uso de estos inhibidores no arroja los mismos resultados, por ejemplo, en macrófagos humanos, el inhibidor PP2 sólo produce un efecto débil sobre la MAPK p38<sup>41</sup>.

El papel de la cascada de las MAPK/SAPK2 en la inflamación comenzó a definirse varios años atrás por el efecto anti-inflamatorio del inhibidor de p38, el SB203580, lo cual generó evidencia de que esta cascada de cinasas era un componente esencial para la señalización temprana de la respuesta inflamatoria y por lo tanto, estas cinasas podrían ser blancos de la terapia anti-inflamatoria<sup>43</sup>.

Muchos substratos directos de ERK 1/2, p38 y JNK son factores de transcripción, tal es el caso de NF $\kappa$ B y AP-1, los cuales son activados debido al estímulo por los LPS y es una vía utilizada por casi todos los TLR en la respuesta inflamatoria dependiente de MyD88<sup>31</sup>. Sin

embargo, además de factores de transcripción, las MAPK tienen otros sustratos, por ejemplo ERK y p38 son capaces de activar a un grupo de cinasas llamadas MKs (MAPK-activated protein kinases) entre las cuales se encuentran las proteínas MK2 y MK3 (también llamadas MAPKAP-K2 y MAPKAP-K3). También se encuentran otros sustratos como las cinasas MSK1, MSK2 (mitogen-and stress-activated kinases), las cinasas MNK1 y MNK2 (MAPK interacting kinases) y las cinasas Rsk1, Rsk2, Rsk3 y Rsk4 (p90 ribosomal S6 kinase)<sup>43, 44</sup>.

De manera interesante, los ratones deficientes en la proteína de serina/treonina MK2 (MAPK activated protein kinase 2) muestran una reducción de la biosíntesis de citocinas como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 e IL-6, por lo que esta proteína dependiente de p38 está involucrada en la regulación de la síntesis de citocinas ante un estímulo con LPS. Por lo tanto, es posible sugerir que la deficiencia en la activación de la vía de las MAPK en los ratones *Lyn*<sup>-/-</sup> también está asociada al defecto en la síntesis de la citocina TNF- $\alpha$ .

Los factores de transcripción más importantes que participan en la respuesta inflamatoria desencadenada por los LPS son NF $\kappa$ B y AP-1. Estos factores se encuentran fuertemente regulados en muchos procesos patológicos y biológicos. La actividad de NF $\kappa$ B está regulada principalmente por los inhibidores conocidos como I $\kappa$ B, los cuales se encuentran en el citoplasma formando complejos inactivos entre NF $\kappa$ B e I $\kappa$ B<sup>45</sup>. Cuando las CC son estimuladas con LPS y se activa la vía canónica del receptor TLR, la subunidad de la cinasa IKK- $\beta$  fosforila a I $\kappa$ B lo cual lleva a su degradación vía proteosoma y a la liberación de la subunidad p65 al núcleo lo cual permite el enlace al sitio promotor de *Tnf*- $\alpha$ <sup>31, 46</sup>.

Distintas investigaciones indican que la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B no requiere de la participación de cinasas de la familia de Src<sup>41</sup>. Sin embargo, nosotros encontramos que las CC *Lyn*<sup>-/-</sup> tienen un defecto en la activación de la vía de señalización de NF $\kappa$ B, ya que no se induce la fosforilación de IKK- $\alpha/\beta$  (figura 14) y ni la degradación del secuestrador citoplasmático I $\kappa$ B (figura 15). Finalmente, encontramos mediante un ensayo de retardamiento de migración electroforética, que la subunidad p65 no se une a su secuencia específica en las CC *Lyn*<sup>-/-</sup> en el núcleo en las CC *Lyn*<sup>-/-</sup> (figura 17). Ninguno de

esos elementos de activación se encuentran afectados en las células Wt. Sin embargo, ante un estímulo con IgE/antígeno (como control), sí se induce la translocación nuclear de la subunidad p65 en ambos tipos celulares.

Nuestros resultados indican que la cinasa Lyn participa río arriba de las MAPK y de IKK $\alpha$ / $\beta$  en la vía de transducción del receptor TLR-4, dado que en las CC Lyn<sup>-/-</sup> no se activó ninguno de los elementos principales que llevan a la activación de la subunidad p65 de NF $\kappa$ B y por lo tanto a la síntesis de TNF- $\alpha$ .

La cinasa Lyn tiene un dominio SH3, uno SH2 que reconocen residuos de tirosina fosforilados, y un dominio de tirosina cinasa SH1, el cual requiere ser fosforilado en un residuo de Tyr del segmento terminal para su completa actividad catalítica. El extremo amino terminal es una secuencia miristilada y está involucrada en la asociación de Lyn con la membrana citoplasmática. En cambio, el extremo carboxilo tiene una tirosina (527) altamente conservada entre los miembros de esta familia, la cual es muy importante en la regulación de su actividad<sup>36</sup>.

Estudios elaborados en células cebadas Lyn<sup>-/-</sup> transfectadas con distintas construcciones de la cinasa Lyn, en las cuales fueron removidos algunos dominios específicos de la misma, han demostrado que los dominios SH2 y SH3 están involucrados en el reclutamiento de Lyn a los receptores fosforilados. Los receptores estudiados, sin embargo, han sido aquellos que contienen secuencias ITAM<sup>37</sup>.

Debido a lo anterior, la cinasa Lyn es una proteína que juega un papel muy importante en la señalización de muchos receptores. Por ejemplo, en la respuesta inmune adquirida, esta cinasa participa en el sistema de transducción del receptor Fc $\epsilon$ RI de CC, se ha observado que esta cinasa es necesaria para la fosforilación del receptor, lo cual, a su vez, depende del dominio SH2. Además, la cinasa Lyn interacciona con el dominio ITAM del receptor y también fosforila a las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$ , las cuales están encargadas de inducir la transducción de señales del mismo<sup>37</sup>.

Aún se desconoce si esta cinasa puede tener un papel en la regulación de la respuesta inmune innata. Sin embargo, existe evidencia indirecta sobre la posible participación de

quinasas de tirosina en la respuesta inmune innata mediada por los TLR, tal es el caso de un estudio realizado en monocitos sanguíneos, que fueron tratados con inhibidores de tirosina cinasas antes de ser estimulados con LPS. En este trabajo encontraron que había un defecto en la producción y secreción de la citocina IL-8, así como en la activación del factor de transcripción NFκB, lo cual era una consecuencia de la inhibición de la fosforilación de residuos de tirosina del receptor TLR-4. Por lo tanto, demostraron que los LPS inducen la fosforilación de residuos de tirosina del receptor TLR-4<sup>47</sup>.

Otros estudios han demostrado que la cinasa Lyn está asociada al coreceptor CD14 del receptor TLR-4<sup>39</sup> en sistemas celulares transfectados con Lyn y el receptor TLR-4. Por lo tanto, una hipótesis de cómo participaría la cinasa Lyn en el sistema de transducción de señales del receptor TLR-4, es que, una vez que se unen los LPS a la proteína MD2 y se forma el complejo LPS/MD2/TLR-4/CD14, puede ser que se promueva una conformación que facilite la interacción de Lyn con el receptor e induzca la fosforilación en residuos de tirosina del mismo, lo cual desencadenaría una respuesta rápida de la cascada de señalización que culmina en la activación del factor de transcripción NFκB (figura 18).

En una investigación realizada en células HEK 293T que fueron transfectadas con una construcción del receptor CD4/TLR-4 de humano, la cual tiene mutaciones en residuos de tirosina del mismo (Y674A y Y68A), se demostró que se afecta la capacidad de incrementar la fosforilación de p38 y JNK, así como la degradación de IκB y la activación de NFκB; además, éstas deficiencias se correlacionan con alteraciones de la interacción de MyD88 con el receptor TLR-4, así como el decremento de IRAK-1 activa que interacciona con el receptor<sup>48</sup>.

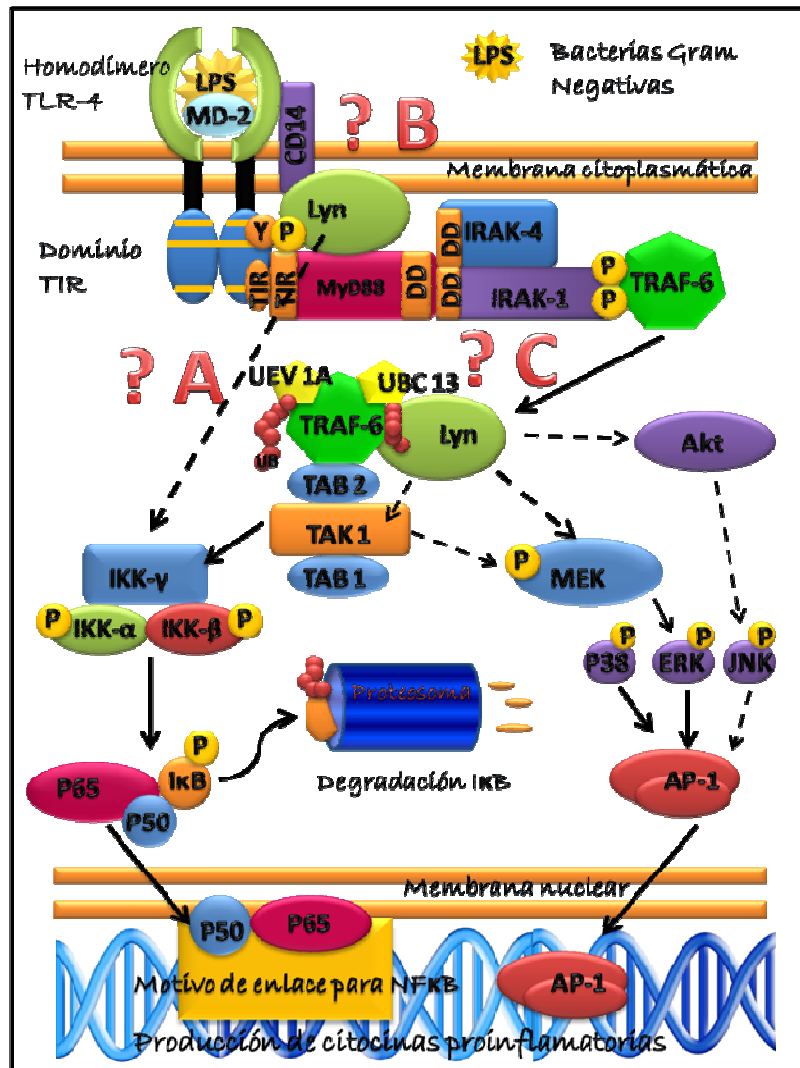
Otra hipótesis de cómo puede participar la cinasa Lyn en el sistema de transducción de señales del receptor TLR-4 es la siguiente: si el receptor es fosforilado en residuos de tirosina, entonces la cinasa Lyn puede ser reclutada al mismo por medio de su dominio SH2; por lo tanto, la cinasa Lyn interaccionaría con la proteína adaptadora TRAF-6, mediando río abajo la activación de las vías NFκB y AP-1.

TRAF-6 es una proteína muy importante en la señalización de los receptores del tipo Toll, ya que es un mediador común de la superfamilia de TLR-IL-R1, el cual es ubiquitinado en el residuo de Lisina 63 y de esta forma media la activación de la proteína IKK, además por otra parte media la activación de la vía de las MAPK a través de TAK1. Por lo tanto, juega un papel importante en la bifurcación de la cascada de señalización.

Se ha generado evidencia de que las cinasas de la familia de Src, pueden interactuar con TRAF-6 en la activación de la vía de las MAPK; ya que en una investigación realizada sobre la coexpresión de TRAF-6 en osteoblastos, se encontró que esta proteína interactúa con la cinasa Src en la inducción de la activación del factor de transcripción AP-1, a través de la vía de señalización PI3K/Akt/JNK, en el receptor para Interleucina-1 (IL-R1). Este receptor es un miembro de la super-familia de receptores TLR-IL-R1 a la cual también pertenece el receptor TLR-4<sup>49</sup>.

En nuestros resultados encontramos que JNK es una cinasa afectada por la ausencia de la cinasa Lyn, además también observamos un defecto en la fosforilación de Akt en los residuos de serina y treonina (los resultados no se muestran). Por lo que, en futuras investigaciones, resultaría interesante estudiar el papel de la cinasa Lyn en la regulación de la activación de la vía de PI3K/Akt ante un estímulo con LPS. De esta forma, se esclarecería si el defecto observado en JNK se debe a que TRAF-6 y Lyn juegan un papel importante la activación de esta vía.

La cinasa Lyn es muy importante en la regulación de muchos de los procesos del sistema inmune, como la proliferación, la desgranulación y síntesis de mediadores a través de varios inmunoreceptores del sistema inmune. En esta tesis, se presenta evidencia que indica que en las células cebadas la cinasa Lyn juega un papel importante en la activación río arriba de las MAPK, en el sistema de transducción de señales del receptor TLR-4. Por lo que con los resultados obtenidos se demuestra que la cinasa Lyn es importante en la respuesta inmune innata y por lo tanto el proceso de fosforilación en residuos de tirosina es fundamental para la activación de esta vía.



**Figura 18. La participación de la cinasa Lyn en la vía de transducción de señales del receptor TLR-4.** Los signos de interrogación muestran los posibles puntos en donde la cinasa Lyn puede estar jugando un papel importante en la vía de transducción del receptor TLR-4. De izquierda a derecha el primer signo de interrogación: **A)** la cinasa Lyn podría activar directamente de alguna forma la vía de NFκB, fosforilando algunas proteínas aún no descritas en la vía, o bien fosforilando directamente al complejo de IKKα/β. A continuación en **B)** la cinasa Lyn podría estar interaccionando en la membrana con el coreceptor CD14 y/o el receptor TLR-4, de tal forma que regule la activación del receptor TLR-4, o bien, una vez que el receptor es activado la cinasa Lyn sea reclutada hacia los dominios del mismo, de tal forma que regule la transducción de señales río abajo hacia la activación de la vía de las MAPK y de NFκB. Por último en **C)** después de que el receptor TLR-4 es activado y las proteínas MyD88, IRAK-1, IRAK-4, TRAF-6 son reclutadas hacia el mismo, la cinasa Lyn puede formar un complejo con TRAF-6 translocándose hacia el citoplasma, regulando las señales río abajo de la misma, ya sea fosforilando a la proteína TAK1 y activando la vía de las MAPK y finalmente culminando en la activación del factor de transcripción AP-1, y/o bien, que la cinasa Lyn participe en la activación del factor de transcripción vía de PI3K/Akt/JNK.

## **11. Conclusión**

Nuestros resultados muestran que la cinasa Lyn juega un papel importante en la activación de la vía de transducción del receptor TLR-4 *in vitro*, ya que las células derivadas de ratones Lyn<sup>-/-</sup> tienen un defecto en la activación de esta vía y en la producción de TNF- $\alpha$ . Sin embargo, aun es necesario continuar las investigaciones con el fin de sugerir su localización en la vía de transducción del receptor TLR-4.



## ANEXO 1 MATERIAL Y SOLUCIONES

### SNET

Para preparar 1 litro de esta solución se mezclan los siguientes reactivos: 12.144g de Tris-HCl 20mM pH 8 (SIGMA, cat.T1503), 5mL de EDTA 5Mm (SIGMA, cat. E7889), 11.7g de NaCl 400Mm (SIGMA,S9888), 0.5g de SDS 1% (Bio-Rad, cat. 161-0301). La solución se afora en 500mL con agua destilada estéril mili Q y se ajusta el pH a 8. Guardar a temperatura ambiente.

### Proteasa K

Se pesan 20mg de proteasa K (SIGMA, cat. P2308) y se diluyen en 1ml de agua estéril. La alícuotas se guardan a – 20°C.

### Mezcla para PCR

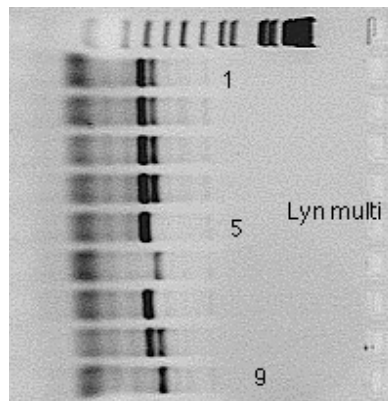
Para realizar la amplificación de secuencias de DNA genómico de ratón con el kit para PCR de CLONTECH (cat. 639120) se sigue la receta de la tabla 5.

Tabla 5. Mezcla para la Reacción de cadena de la polimerasa en el establecimiento de genotipos.

INGREDIENTES	Cantidad por muestra
H <sub>2</sub> O	5.65
Buffer 10 X de Mg	0.96
MgCl <sub>2</sub> 25Mm	1.2
dNTP's 2.5mM	0.96
Primer sentido Neo 20 μM	0.3
Primer antisentido Neo 20μM	0.3
Primer sentido del gen Lyn 20μM	0.3
Primer antisentido del gen Lyn 20μM	0.3
Taq polymerase (5U/ul)	0.03

Para amplificar los genes se prepara una sola mezcla con todos los ingredientes anteriores y la cantidad depende del número de muestras que van a ser analizadas, por lo tanto el volumen final es de 10 $\mu$ l.

### Productos de la PCR del establecimiento de genotipos



- 1) Heterocigoto = 340 bp and 280 bp
- 5) Mutante Lyn = 280 bp
- 9) Silvestre = 340 bp

### TBE 5X

Para preparar 1 litro de este amortiguador se mezclan los siguientes componentes: 54 g de Tris/Base (SIGMA, cat. T1503), 27.5g de Ácido bórico y 20mL de EDTA 0.5M pH 8 (SIGMA, cat. E7889). Finalmente se afora la solución hasta un 1l con agua estéril destilada y se ajusta el pH a 8.

### TBE 1X

Para preparar el TBE 1X se toman 200ml de la solución anterior y se disuelven en 800 ml de agua estéril destilada.

### TBE 0.5X

Para preparar el TBE 0.5X se toman 100ml del amortiguador TBE 5X y se disuelven en 800 ml de agua estéril destilada.

#### **Amortiguador de carga para muestras de DNA 6X**

Para preparar este amortiguador se mezclan los siguientes componentes: 25mg de Azul de bromofenol (0.25%), 25mg de Cianol de xileno (0.25%), 3 mL de Glicerol al 30%. Por último se aforan en 7ml de agua estéril llevándolo a un volumen final de 10ml.

#### **Gel de agarosa al 2%**

Para preparar un gel de agarosa (Invotrogen, cat. 15510019) al 2%, se pesan 2g de agarosa y se disuelven en 100ml de TBE 1X. La mezcla se deja enfriar a temperatura ambiente hasta que se gelifique.

#### **Medio de cultivo**

Para preparar el medio de cultivo se disuelve un sobre de medio RPMI-1640 de SIGMA (cat. R4130-1l) en 1l de agua biodestilada y se mide el pH. Una vez que el pH del medio de cultivo tiene el valor fisiológico normal, se le agregan los siguientes reactivos: 12ml de L-Glutamina (SIGMA, cat. R4130), 12 ml de 1U/ml de penicilina-0.1 mg/ml de estreptomina (GIBCO, cat. 10378-016), 25 ml de amortiguador Heppes 1M pH 7.7 (SIGMA, H7006), 10 ml de 1X amino ácidos no esenciales (NEAA 100X, Biofluids, cat. 332-100), 5ml de Piruvato de sodio (stock 100 mM, Biofluids, cat. 33-100), 175 µl de β-mercaptoetanol 50µM (SIGMA, cat. M6250), 100ml de Suero Fetal Bovino al 100% (FBS; GIBCO, BRL, cat. 261400779), 20ng/ml de IL-3 (PeProtech, cat. 213-13X), y 10ml de antimicótico (stock 100X Gibco, cat. 15240062). Finalmente el medio de cultivo se esteriliza por medio de filtración a través de una membrana milipore 0.2µm y se guarda a 4°C.

#### **Amortiguador Tirodes-BSA**

Para preparar un litro de este amortiguador se mezclan los siguientes reactivos: 7.88 g de NaCl (SIGMA, cat. S9888), 0.372 g de KCl, 0.203 g de MgCl<sub>2</sub>, 0.264 g de CaCl<sub>2</sub>, 1.009 g de Glucosa, Hepes 1M pH 7.0 y 0.5 g de Albúmina. Se ajustó el pH a 7.4 y se afora en un litro con agua destilada estéril y se guarda a 4°C.

#### **p-NAG 1mM (Para-nitrofenil-N-Acetil-βD-glucosamina).**

Para preparar esta solución se mezclan 13.25ml de ácido cítrico 0.1M y 11.625 ml de citrato de sodio y se ajusta el pH a 4.5. Finalmente se disuelven 8.5 mg de p-NAG y se ajusta el volumen a 25 ml con agua estéril destilada.

#### **Solución NaCO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>**

Para realizar este amortiguador se mezclan 1.059g de NaCO<sub>3</sub> más 840 g de NaHCO<sub>3</sub>, los cuales se disuelven en 100ml de agua estéril destilada.

#### **Síntesis de la primera hebra de cDNA**

Para la síntesis de la primera hebra de cDNA se realiza una mezcla de acuerdo con las instrucciones del kit Life Technologies SuperScript first-strand synthesis system Invitrogen (cat. 11904018), la cual se muestra en la tabla 6.

<b>Tabla 6. Mezcla para la síntesis de cDNA a partir de RNA total.</b>	
<b>Componente</b>	<b>Cantidad por una muestra</b>
<b>5µg de RNA total</b>	<b>**n-µl</b>
<b>10mM dNTP mix</b>	<b>1µl</b>
<b>Oligo (dT)<sub>12-18</sub> (0.5 µg/µl)</b>	<b>1µl</b>
<b>Agua tratada con DEPC</b>	<b>Llevar a 10µl</b>

\*\*Los µl de RNA total que se toma depende de la cantidad en µg/µl que se tienen en cada muestra, los cuales deben ser cuantificados previamente en el espectrofotómetro.

#### **Remoción del RNA de las muestras**

Para remover el RNA de las muestras se realiza una mezcla de acuerdo con las instrucciones del kit de Life Technologies SuperScript first-strand synthesis system Invitrogen (cat. 11904018), la cual se muestra en la tabla 7.

**Tabla 7. Mezcla para la remoción de RNA de las muestras con la primera hebra de cDNA**

Componente	Cantidad por muestra
Buffer 10 X RT	2µl
MgCl <sub>2</sub> 25Mm	4µl
0.1 M DTT	2µl
RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor	1µl

#### **Amplificación de la secuencia de blanco (TNF-α) a partir de cDNA.**

Para realizar la amplificación de la secuencia blanco a partir de cDNA se realiza una mezcla de acuerdo con el instructivo del kit para PCR (CLONTECH, cat. 639120), la cual se muestra en la tabla 8.

**Tabla 8. Mezcla para la amplificación del gen blanco a partir de cDNA.**

Componentes	Cantidad por muestra
Buffer 10X de Mg	5µl
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1.5µl
10 mM dNTP mix	1µl
Primer sentido 10 µM	1µl
Primer antisentido 10 µM	1µl
Taq DNA Polimerasa (5units/µl)	0.4µl
Agua estéril	38.1µl
Volumen final	50µl

#### **Programa de amplificación para citocinas**

Mantener a 96°C durante 1 minuto; 2 ciclos 96°C por 1min 60°C por 4min; 28 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 2.5min, 72°C por 4 min; mantener a 70°C por 10 minutos y mantener a 4°C toda la noche.

#### **Amortiguador Laemmli 2X**

Para preparar 1 ml de Laemmli 2X de SIGMA, se añaden 20µl/ml de o-vanadato 100nM (SIGMA, cat. S-6508) y 20µl de β-mercaptoetanol (SIGMA, cat. M6250), una vez que está lista la mezcla se coloca en el baño María a 100°C durante 5 minutos.

#### **Acrilamida/BIS al 50%**

Para preparar la Acrilamida/BIS (29:1) se agregan 48.3g de Acrilamida (GIBCO BRL, cat. 1S512-031) más 1.7g de BIS (SIGMA, cat. M7279). Finalmente la solución se afora a 100ml con agua estéril destilada.

#### **Amortiguador del Gel separador 1M Tris-HCL pH 8.8**

Para hacer este amortiguador se añaden 30.3 g de Tris (SIGMA, T1503) en 150 ml de agua y se ajusta el pH a 8.8 con HCl. Por último, se afora a 250 ml con agua estéril destilada.

#### **SDS (Sodio-Dodecil-Sulfato) al 10 %**

Para preparar esta solución se disuelve 10 g de SDS (GIBCO BRL, cat. HS113) en 100ml de agua estéril destilada.

#### **Amortiguador para el gel concentrador 0.375M Tris HCl pH 6.8**

Para realizar esta solución se disuelven 11.4g de Tris-base (SIGMA, cat. T15031) en 150 ml de agua destilada y se ajusta el pH a 6.8 con HCl, finalmente se afora en 250ml con agua estéril destilada.

#### **Catalizador**

Para realizar esta solución se disuelven 100mg de Persulfato de Amonio (SIGMA, cat. A-3678) en 2ml de agua estéril destilada.

#### **Sacarosa al 50%**

Para preparar esta solución se disuelven 50g de sacarosa (SIGMA, cat. 51888) en 100ml de agua estéril destilada.

### **Gel separador de acrilamida al 10 %**

Para prepara el gel al 10% se mezclan los reactivos que se enlistan en la tabla 9 de acuerdo con el protocolo incluido en la cámara de electroforesis de Invitrogen life technologies®.

**Tabla 9. Mezcla para preparar el gel separador para una SDS-PAGE.**

<b>Solución</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Acrilamida al 50%</b>	5.0ml
<b>Buffer 1M Tris-HCl para el gel separador</b>	9.4ml
<b>SDS al 10%</b>	250µl
<b>Sacarosa al 50%</b>	4.0ml
<b>H2O</b>	5.8ml
<b>TEMED**</b>	6.25µl
<b>Catalizador**</b>	625µl

\*\*Agregar al final.

### **Gel concentrador de acrilamida al 4%**

Para preparar un gel al 4% se mezclan los reactivos enlistados en la tabla 10, de acuerdo con el protocolo incluido en la cámara de electroforesis de Invitrogen life technologies®.

**Tabla 10. Mezcla para preparar el gel concentrador para la SDS-PAGE.**

<b>Solución</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Acrilamida al 50%</b>	1.0ml
<b>Buffer 0.375M Tris HCl pH 6.8 para gel concentrador</b>	4.2ml
<b>SDS al 10%</b>	125µl
<b>H2O</b>	6.3ml
<b>TEMED**</b>	5.0µl
<b>Catalizador **</b>	1.0MI

\*\* Agregar al final.

### **Amortiguador de corrida Tris-Glicina 10X**

Para hacer esta solución se mezclan los siguientes reactivos: 29g de Tris (SIGMA, cat. T15031), 144g de Glicina (SIGMA, cat. G8898), 10g de SDS (GIBCO BRL, cat. T-9284), finalmente ajustar el pH a 8.3 y aforar en 1l en agua estéril destilada.

#### **Amortiguador de corrida 1X**

Para preparar un litro de amortiguador de corrida 1X se toman 100ml de amortiguador de corrida 10X y se disuelven en 900ml de agua estéril destilada.

#### **Amortiguador de transferencia Tris-Glicina 25X**

Para preparar esta solución disolver los siguientes reactivos en agua destilada estéril: 18.2g de Tris-Base 12mM (SIGMA, cat. T15031) y 90.0g de Glicina 96mM (SIGMA, cat. G8898), mezclar hasta que estén totalmente disueltos y aforar a 500ml. El pH de la solución es 8.3 y no ajustar con un ácido o base.

#### **Amortiguador de transferencia 1X**

Para preparar un litro de esta solución se mezclan los siguientes reactivos: 40ml de Amortiguador Tris-Glicina 25X, 200ml de metanol (J.T. Baker, cat.9070-03) y 760ml de agua destilada.

#### **TBS-T 1X**

Para preparar 1l de este amortiguador se mezclan 6g de Tris (SIGMA, cat. T15031) más 9g de NaCl, finalmente adicionar 1ml de Tween 20 SIGMA, y ajustar el pH a 7.5.

#### **Amortiguador Re-Probing**

Para preparar 500ml de este amortiguador se mezclan 100ml de SDS al 10%(GIBCO BRL, cat. T-9284), 32.1 ml de Tris 1M pH7.5 (SIGMA, cat. T15031), ajustar el pH a 6.7 y aforar con agua estéril destilada a un volumen de 500ml.

#### **Metodología para rasurar la membrana**



Colocar la membrana de PVDF en un recipiente con tapa y agregar 30 ml por membrana de Buffer de stripping (para preparar con  $\beta$ -mercapto-etanol). Adicionar 210 $\mu$ l de  $\beta$ -mercapto-etanol y homogenizarlo. Mantener a 65°C durante 30 minutos, transcurrido el tiempo anterior enjuagar con abundante agua de la llave. Finalmente lavar 2 veces durante 5 a 10 minutos con TBST 1X.

#### **Acrilamida/Bis 29:1 al 30%**

Para preparar la Acrilamida/Bis 29:1 agregar 29g de Acrilamida (GIBCO BRL, cat. 1S512-031) más 1g de Bis (SIGMA, cat. M7279) en 70 ml de agua estéril destilada, la mezcla se vacía cuidadosamente en un frasco ámbar. Guardar a temperatura ambiente.

#### **Amortiguador PBS 10X.**

Para preparar este amortiguador disolver 3.55g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> más 0.61g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y ajustar el pH a 7.5. Enseguida agregar 21.9g de NaCl 1.5M (SIGMA, cat. S9888) y 0.5g de KCl 17mM, ajustar el volumen a 250ml con agua estéril destilada.

#### **Amortiguador PBS 1X**

Para preparar este amortiguador disolver 10ml del amortiguador PBS 10X en 90ml de agua estéril destilada, una vez listo el amortiguador, esterilizar a través de un filtro de 0.2 $\mu$ m, guardar a 4°C.

#### **PBI (Phosphate Inhibitor Buffer)**

Para preparar este amortiguador mezclar los siguientes reactivos: 52mg de NaF 125mM (Aldrich Chemical, cat. 11701BI), 0.55g de  $\beta$ -glicerofosfato 250mM, 1.15g de para-nitrofenil fosfato 250mM (PNPP, BioChemika, cat. 7176) y 31mg de NaVO<sub>3</sub> 25mM (SIGMA, S-6508), ajustar el volumen a 10 ml con agua destilada estéril. Una vez que se finaliza la mezcla incubar la solución a 50°C durante 5 minutos y después se guardó a -20°C.

#### **PBS/PBI**

Para preparar este amortiguador mezclar 0.5ml del amortiguador PBI y 10ml del amortiguador PBS.

#### **Amortiguador Hipotónico (HB)**

Para preparar esta solución mezclar los siguientes reactivos: 0.24g de Hepes 20mM con un pH de 7.5, 12mg de NaF 5mM (Aldrich Chemical, 11701BI), 5µl de una solución 0.1M de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 10µM y 10µl de una solución 0.5 M de EDTA 0.1mM (SIGMA, cat. E7889). Ajustar el pH a 7.5 con 1N de NaOH y llevar a un volumen final de 50ml con agua destilada estéril. Después esterilizar la solución a través de un filtro de 0.2µm y guardar a -4°C.

#### **Igepal 10%**

Para preparar esta solución se disolver 100µl de Igepal (SIGMA, cat. 043K654) en 1000µl de agua estéril.

#### **Amortiguador completo de Lisis**

Este amortiguador realiza de acuerdo con las instrucciones de Kit de TrasAM (cat.40296), por lo que se mezclan los reactivos contenidos en el kit de la siguiente manera: 1ml de Buffer lisis más 1µl de DTT más 10µl de inhibidor proteasas.

#### **Gel de Acrilamida/Bis al 6%.**

Para preparar un gel de Acrilamida/Bis al 6% mezclan los reactivos enlistados en la tabla 11.

<b>Tabla 11. Reactivos para prepara un Gel de Acrilamida al 6%</b>	
<b>Solución</b>	<b>Cantidad</b>
<b>TBE 5X</b>	<b>2.5ml</b>
<b>Acrilamida /Bis 29:1</b>	<b>5ml</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>17.35ml</b>
<b>TEMED</b>	<b>11µl</b>
<b>Persulfato</b>	<b>150µl</b>
<b>Volumen final</b>	<b>25ml</b>

### **Binding reactions**

Para realizar este ensayo hacer la mezcla de acuerdo con el protocolo del kit EMSA/LightShift Chemiluminescent, el cual se muestra en la tabla 12.

<b>Tabla 12. Reactivos para el Ensayo de unión del oligo NFκB</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Cantidad por muestra</b>
<b>Agua pura</b>	<b>7.5µl</b>
<b>Binding buffer 10X</b>	<b>2µl</b>
<b>1µg/µl Poly (dI°dC)</b>	<b>0.5µl</b>
<b>Glicerol 50%</b>	<b>1µl</b>
<b>NP-40 %</b>	<b>1µl</b>
<b>KCL 1M</b>	<b>1µl</b>
<b>MgCl<sub>2</sub>100mM</b>	<b>1µl</b>

### **Control para del EMSA**

Para hacer el control de que el oligo marcado con Biotina de NFκB compite por el sitio de unión de la subunidad p65, se realizó un ensayo de binding reactions de acuerdo al protocolo de la sección anterior y los tratamientos fueron los siguientes: el primero contenía sólo el oligo de NFκB marcado con biotina. El segundo el oligo de NFκB marcado con biotina más 5μl del extracto nuclear. El tercero el oligo de NFκB marcado con biotina más 5μl del extracto nuclear más un oligo frío específico para NFκB. El cuarto contenía el oligo de NFκB marcado con biotina más 5μl del extracto nuclear más un anticuerpo dirigido contra la subunidad p65 de NFκB. El último tratamiento contenía el oligo de NFκB marcado con biotina más 5μl el extracto nuclear más un oligo inespecífico. Finalmente se hizo un gel de Acrilamida/bis al 6% de acuerdo al protocolo de material y métodos.

## Bibliografía.

1. Sherwood Romer, A. Major Steps in Vertebrate Evolution. *SCIENCE* **158**, 1629-1636 (1967).
2. Brusca C., R., and Brusca J. Gary *Invertebrates* Edn. 2nd. (Sinauer Associates, Inc, Publishers, 2002).
3. Hemmrich G, M.D., Bosch TC. The evolution of immunity: a low-life perspective. *TRENDS in Immunology* **28**, 449-454 (2007).
4. Delves, P.J., & Roitt Ivan M. The immune System. *Advances in Immunology* **343**, 37-49 (2000).
5. Janeway, C.A. *Immunobiology : the immune system in health and disease* Edn. 6th (Garland, New York 2005).
6. Rast JP, M.-S.C. Marine invertebrate genome sequences and our evolving understanding of animal immunity. *Biological bolletin* **214**, 274-283 (2008).
7. Abbas, A.K. *Cellular and molecular immunology*, Edn. 5 th. (Elsevier Saunders, Philadelphia, Pennsylvania; 2005).
8. Gail, B.G.a.H.S. Immunity and the Vertebrates. *Scientific American* 60-66 (1996).
9. Marshall, J. Mast-cell responses to pathogens. *Nature Reviews Immunology* **4**, 787-799 (2004).
10. Cooper EL, K.E., Cossarizza A. Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff. *BioEssays* **24**, 319-333 (2002).
11. Pejler, G., Abrink, M., Ringvall, M. and Wernersson, S. in *Advances in Immunology*, Vol. 95. (ed. Elsevier) 167-181 (Swedish, University of Agricultural Sciences, Swedish; 2007).
12. Terzic J., I.M.-T., F. Ikeda and I. Dikic. Ubiquitin signals in the NF-κB pathway. *Biochemical Society Transactions* **35**, 942-945 (2007).
13. Vyas, H., Krishnaswamy, G. *Paul Ehrlich's "Mastzellen" From Aniline Dyes to DNA Chip Arrays*, Vol. 315. (Humana Press Inc., Totowa; 2004).
14. Mulero I, S.M., Meseguer J, García-Ayala A, Mulero V. Histamine is stored in mast cells of most evolutionarily advanced fish and regulates the fish inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 19434-19439 (2007).
15. Metz M, S.F., Maurer M. Mast cell functions in the innate skin immune system. *Immunobiology* **213**, 251-260 (2007).
16. Krishnaswamy Guha, A.O., and Chi S. David *The Human mast cell*, Vol. 315. (Humana Press Inc, Totowa, NJ; 2005).
17. Kalesnikoff J, G.S. New developments in mast cell biology. *Nature immunology* **9**, 1215-1223 (2008).
18. Bischoff, S. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nature Reviews Immunology* **7**, 93-104 (2007).
19. Galli, S.J., Kalesnikoff, J., Grimaldeston M.A., Piliponsky M.A., Williams C.M.M, Tsai, M. Mast cell s "Tunable" Efeector and Immunoregulatory cells: Recent Advances. . *Rev. Immunol* **23**, 749-786 (2005).

20. Reimer JM, E.M., Samollow PB, Hellman L. Extended substrate specificity of opossum chymase--implications for the origin of mast cell chymases. *Molecular immunology* **45**, 2116-2125 (2007).
21. Akira S, T.K. Toll-like receptor signalling. *Nature reviews Immunology* **4**, 499-511 (2004).
22. Marshall JS, J.D. Mast cells in innate immunity. *Journal Allergy Clinical Immunology* **114**, 21-27 (2004).
23. Leal-Berumen I., C.P., Marshall JS. IL-6 production by rat peritoneal mast cells is not necessarily preceded by histamine release and can be induced by bacterial lipopolisaccharide. *Journal of Immunology* **152**, 5468-5476 (1994).
24. Malaviya R, I.T., Ross E, Abraham SN. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* **381**, 21-22 (1996).
25. Echtenacher B, M.D., Hültner L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* **381**, 75-77 (1996).
26. Gilfillan AM, T.C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nature Reviews Immunol* **6**, 218-230 (2006).
27. Supajatura V, U.H., Nakao A, Akira S, Okumura K, Ra C, Ogawa H. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *The Journal of Clinical investigation* **109**, 1351-1359 (2001).
28. Supajatura V, U.H., Nakao A, Okumura K, Ra C, Ogawa H. Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *Journal of Immunology* **167**, 2250-2256 (2001).
29. Matsushima, H.Y., N., Matsue, H & Shimada, S. TLR-3, TLR-7 and TLR-9 mediated production of proinflammatory cytokines and chemokines from murine connective tissue type skin derived mast cell but not from bone marrow derived mast cell. *Journal of Immunology* **173**, 531-541.
30. Akira S, U.S., Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801 (2006).
31. Kawai T, A.S. TLR signaling. *Nature Cell Death and Differentiation* **13**, 816-825 (2006).
32. Gay NJ, G.M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annual Review of Biochemistry* **76**, 141-165 (2007).
33. Madigan T.M., Martinko M. J., Parker J. *Brock, Biology of microorganisms*, Edn. 8va. (Spain, PRENTICE HALL, INC, 2001).
34. Triantafilou M, T.K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends in Immunology* **23**, 301-304 (2002).
35. Kawai T, A.S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends in Molecular Medicine* **13**, 460-469 (2007).
36. Boggon TJ, E.M. Structure and regulation of Src family kinases. *Nature Oncogene* **23**, 7918-7927 (2004).
37. Kovárová M, T.P., Arudchandran R, Dráberová L, Rivera J, Dráber P. Structure-function analysis of Lyn kinase association with lipid rafts and initiation of early

- signaling events after Fcepsilon receptor I aggregation. *Molecular and cellular biology* **21**, 8318-8328 (2001).
38. Stefanová I, C.M., Horak EM, Wahl LM, Bolen JB, Horak ID. Lipopolysaccharide induces activation of CD14-associated protein tyrosine kinase p53/56lyn. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 20725-20728 (1993).
  39. Herrera-Velitz, P.a.R.E., Neil. Bacterial Lipopolysaccharide Induces the Association and Coordinate Activation of p53/56 lyn and Phosphatidylinositol 3- Kinase in Human Monocytes. *Journal of Immunology* **156**, 1157-1165 (1996).
  40. Stefanová I, H.V., Ansoategui IJ, Knapp W, Stockinger H. GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases. *SCIENCE* **254**, 1016-1019 (1991).
  41. Orlicek SL, H.J., English BK. The src family-selective tyrosine kinase inhibitor PP1 blocks LPS and IFN-gamma-mediated TNF and iNOS production in murine macrophages. *Shock* **12**, 350-354 (1999).
  42. Hernandez-Hansen V, M.G., Lowell CA, Wilson BS, Oliver JM. The Src kinase Lyn is a negative regulator of mast cell proliferation. *Journal of Leukocyte Biology* **75**, 143-151 (2004).
  43. Neininger A, K.D., Kotlyarov A, Winzen R, Eckert R, Volk HD, Holtmann H, Kollias G, Gaestel M. MK2 targets AU-rich elements and regulates biosynthesis of tumor necrosis factor and interleukin-6 independently at different post-transcriptional levels. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 3065-3068 (2002).
  44. Zaru R, R.N., Gaestel M, Arthur JS, Watts C. The MAPK-activated kinase Rsk controls an acute Toll-like receptor signaling response in dendritic cells and is activated through two distinct pathways. *Nature Immunology* **8**, 1227-1235 (2007).
  45. Fujioka S, N.J., Schmidt C, Sclabas GM, Peng B, Uwagawa T, Li Z, Evans DB, Abbruzzese JL, Chiao PJ. NF-kappaB and AP-1 connection: mechanism of NF-kappaB-dependent regulation of AP-1 activity. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 7806-7819 (2004).
  46. Ghosh S, H.M. New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nature Reviews* **8**, 837-848 (2008).
  47. Chen LY, Z.B., Zhao M, Liu FT, Huang S, Pan ZK. Involvement of protein tyrosine kinase in Toll-like receptor 4-mediated NF-kappa B activation in human peripheral blood monocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **284**, 607-613 (2003).
  48. Medvedev AE, P.W., Shoefelt J, Rhee SH, Chen H, Basu S, Wahl LM, Fenton MJ, Vogel SN. Role of TLR4 tyrosine phosphorylation in signal transduction and endotoxin tolerance. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 16042-16053 (2008).
  49. Funakoshi-Tago M, T.K., Sonoda Y, Tominaga S, Kasahara T. TRAF6 and C-SRC induce synergistic AP-1 activation via PI3-kinase-AKT-JNK pathway. *European Journal of Biochemistry* **270**, 1257-1268 (2003).